

Université de Montréal

**Impact de la litière à base de fumier recyclé sur la propagation  
des parasites gastro-intestinaux, dans l'environnement des  
bovins laitiers ainsi que dans le lait**

par Marlen Irlena Lasprilla Mantilla

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires option microbiologie

Avril 2019

© Marlen Irlena Lasprilla Mantilla, 2019

Université de Montréal

Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Ce mémoire intitulé*

**Impact de la litière à base de fumier recyclé sur la propagation  
des parasites gastro-intestinaux, dans l'environnement des  
bovins laitiers ainsi que dans le lait**

*Présenté par*

Marlen Irlena Lasprilla Mantilla

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Mariela Segura**  
Président-rapporteuse

**Christopher Fernandez Prada**  
Directeur de recherche

**Simon Dufour**  
Codirecteur

**Marcelo Gottschalk**  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail était d'étudier la présence des parasites les plus courants associés au tube digestif des bovins dans la litière de fumier recyclé (LFR), ainsi que la capacité des procédures de préparation actuelles de la LFR à éliminer ces agents pathogènes. Nous avons également évalué si ces parasites pouvaient être récupérés dans le lait provenant du réservoir de lait des fermes utilisant ce système de litière. Enfin, nous avons étudié si la distribution de ces parasites différerait dans le fumier de vaches logées sur une LFR par rapport à celle des vaches logées sur un système de litière plus conventionnel, c'est-à-dire la litière à base de paille.

Vingt-sept fermes LFR et 61 fermes témoins ont été recrutées pour l'étude. Des échantillons de fumier de la fosse de fumier et du lait de la citerne ont été récupérés dans des fermes qui utilisaient la litière à base de paille et dans des fermes qui utilisaient la litière LFR. De plus, dans les troupeaux LFR, nous avons récupéré des échantillons de la fraction solide du fumier après extraction du liquide, de la litière LFR avant utilisation, ainsi que de la LFR utilisée. Les parasites ont d'abord été détectés par flottation en double centrifugation en présence de sulfate de zinc afin de mettre en évidence la présence de protozoaires, puis par flottation en présence de sucre, selon la technique de Wisconsin modifiée, pour l'évaluation des nématodes. Les parasites du genre *Cryptosporidium* ont été identifiés, d'une part par détection et séquençage de leur ADN, et d'autre part par PCR nichée et séquençage d'une partie du gène codant pour la petite sous-unité de leur ARNr.

Nos résultats ont révélé une présence élevée de parasites des genres *Cryptosporidium* spp. (*C. parvum*, *C. andersoni* et *C. meleagridis*, identifiés par PCR) et *Eimeria* spp. (principalement *E. bovis* et *E. zuernii*) dans les deux types d'exploitations. Une proportion significativement plus grande d'échantillons de fumier provenant d'exploitations à base de litière LFR était positive à *Cryptosporidium* spp. par rapport au fumier de fermes utilisant la litière de paille.

Les oocystes des deux genres de protozoaires (*Cryptosporidium* spp. et *Eimeria* spp.) ont été trouvés à chaque étape de la préparation / transformation de la LFR, ce qui montre que les stratégies « non standardisées » actuelles de préparation de la LFR ne garantissent pas la destruction des parasites protozoaires.

En termes de risque zoonotique, nous avons décrit une présence importante de *Cryptosporidium parvum* dans des exploitations traditionnelles (32/61) et dans des explorations de LFR (24/27). De façon positive, aucun parasite n'a été détecté dans les échantillons de lait du réservoir, ni par analyse microscopique ni par méthode moléculaire, ce qui garantit la sécurité des consommateurs.

**Mots clés :** bovins laitiers, litière de fumier recyclé, parasites protozoaires, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp.

## ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the presence of most common bovine digestive tract-associated parasites in recycled manure bedding (RMS), and the ability of current RMS preparation procedures to eliminate these pathogens. We also assessed if any of these parasites could be retrieved in bulk milk from dairies using this bedding system. Finally, we studied if the distribution of these parasites would differ in manure of cows housed on RMS bedding compared to that of cows housed on a more conventional bedding system, straw-bedding.

Twenty-seven RMS farms and 61 control farms were recruited for the study. Samples of manure from the manure pre-pit and milk from the bulk tank were recovered from straw-based bedding farms and RMS-based ones. In addition, in RMS herds we recovered samples from the manure's solid fraction after liquid extraction, RMS bedding before use, and RMS bedding in use. Parasites were firstly detected by double-centrifugation zinc-sulfate flotation to highlight the presence of protozoa, and modified Wisconsin sugar flotation for the appraisal of nematodes. *Cryptosporidium* parasites were determined by nested-PCR amplification and sequencing of a portion of the gene encoding the small subunit rRNA.

Our results revealed, a high presence of *Cryptosporidium* spp. (*C. parvum*, *C. andersoni* and *C. meleagridis*, identified by PCR) and *Eimeria* spp. (mainly *E. bovis* and *E. zuernii*) parasites in both types of farms. A significantly larger proportion of manure samples from RMS-bedded farms were positive for *Cryptosporidium* spp. parasites compared to manure of straw-bedded farms. Both *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. oocysts were found at every step of RMS preparation/transformation, showing that current 'non-standardized' strategies for preparing RMS do not guarantee the destruction of protozoan parasites.

In terms of zoonotic risk, we depicted an important presence of *Cryptosporidium parvum* in 32/61 traditional and 24/27 RMS farms. No protozoan parasites were found in any sample derived from bulk milk, neither by microscopic analyses or molecular methods, which represent a guarantee for consumers: safety.

**Keywords:** Dairy cattle, recycled manure solids bedding, protozoan parasites, *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp.

## **TABLE DES MATIÈRES**

<b>RÉSUMÉ</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b>	<b>12</b>
<b>DÉDICACE</b>	<b>14</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
<b>2 REVUE DE LITTÉRATURE</b>	<b>19</b>
2.1 SYSTÈME DE PRODUCTION LAITIÈRE AU CANADA	20
2.1.1 Utilisation de la litière	21
2.2 LITIÈRE DE FUMIER RECYCLÉ	21
2.2.1 Méthodes d'obtention de la litière de fumier recyclé	22
2.2.1.1 Déshydratation par moyens physiques	23
2.2.1.2 Transformations microbiologiques	24
2.2.1.3 Le compostage	25
2.2.2 Avantages potentiels de l'utilisation de la litière de fumier recyclé	25
2.2.3 Risques présents par l'utilisation de la litière de fumier recyclé	26
2.2.3.1 Risques pour la santé animale	27
2.2.3.2 Risques sur la santé humaine	27
2.2.3.3 Risques sur la qualité des aliments	27
2.3 PARASITES GASTRO-INTESTINAUX LES PLUS FRÉQUENTS DANS LES TROUPEAUX LAITIERS AU CANADA	28
2.3.1 Présentation des parasites gastro-intestinaux sur les fermes laitières.	28
2.3.1.1 Présentation sous-clinique des parasites gastro-intestinaux.	29
2.3.1.2 Présentation clinique des parasites gastro-intestinaux.	30
2.3.2 Diagnostic	31
2.3.3 Contrôle	31
2.3.4 Traitement	32

2.4	<i>Cryptosporidium</i> spp.	32
2.4.1	Description du parasite	32
2.4.1.1	Historique	32
2.4.1.2	Taxonomie et classification	34
2.4.1.3	Morphologie	35
2.4.1.4	Cycle de vie	37
2.4.1.5	Principales espèces de <i>Cryptosporidium</i> spp. chez les bovins	38
2.5	RÉSISTANCE DES OOCYSTES DANS L'ENVIRONNEMENT	40
2.6	MODES DE TRANSMISSION	41
2.7	SIGNES CLINIQUES	42
2.7.1	Signes cliniques chez les bovins	44
2.7.2	Signes cliniques chez les humains	46
2.8	RISQUES ENVIRONNEMENTAUX	48
2.8.1	Facteurs de risque	50
2.8.1.1	Âge	50
2.8.1.2	Porteurs asymptomatiques	51
2.8.1.3	Taille du troupeau et logement des troupeaux	51
2.8.1.4	Condition de salubrité	52
2.8.1.5	Rongeurs et insectes	52
2.9	ASPECT ZOONOTIQUE	53
2.10	PRÉVALENCE	53
2.10.1	Prévalence chez les bovins	54
2.10.2	Prévalence chez les humains	58
2.11	MÉTHODES DE DIAGNOSTIC	59
2.11.1	Méthodes de purification et de concentration	60
2.11.2	Méthodes de coloration	60
2.11.3	Méthodes immunologiques	61
2.11.4	Méthodes en utilisant la biologie moléculaire	62
2.12	TRAITEMENT ET CONTRÔLE	64
<b>3</b>	<b>HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS</b>	<b>68</b>
3.2	HYPOTHÈSE	69
3.3	OBJECTIFS	69
<b>4</b>	<b>MATÉRIAUX, MÉTHODES ET RÉSULTATS</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>101</b>





## LISTE DES TABLEAUX

### REVUE DE LITTÉRATURE

<b>Tableau 1.</b> Les parasites les plus fréquents chez les bovins au Canada.	14
<b>Tableau 2.</b> Classification taxonomique de <i>Cryptosporidium</i> spp	20
<b>Tableau 3.</b> Espèces de <i>Cryptosporidium</i> spp.	21
<b>Tableau 4.</b> Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> spp. chez les bovins (laitiers et/ou de boucherie)	40
<b>Tableau 5.</b> Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> spp. chez les humains en fonction de leur système immunitaire et de leur localisation géographique.	43

### MATÉRIAUX, MÉTHODES ET RÉSULTATS

<b>Table 6.</b> Parasitic agents identified in dairies using straw bedding (n = 61) and recycled solid manure bedding (RMS; n=27).	72
<b>Table 7.</b> Predicted median egg count (i.e., least square mean estimates in number of oocysts per gram of materials) in manure, manure solid fraction after separation, recycled manure solid (RMS) bedding prior to use, and recycled manure bedding at the end of the use cycle for different common bovine digestive tract parasites.	73
<b>Table 8.</b> Mean, median, and range of oocysts count (per gram of manure) in manure from straw-bedded vs. recycled manure solid (RMS) cows for the most common parasites.	74

## LISTE DES FIGURES

### REVUE DE LITTÉRATURE

- Figure 1.** Schéma de l'élaboration de litière à base de solides recyclés de fumier 9
- Figure 2.** Cycle de vie de *Cryptosporidium* spp 22

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
BLAST :	Basic Local Alignment Search Tool
BZ :	Benzimidazole
C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O :	Formule chimique du crésol
CDC :	Centre de contrôle des maladies
CINZ :	Code international de nomenclature zoologique
DHI :	« Dairy Herd Improvement »
ELISA :	« Enzyme-linked immunosorbent assay »
ENESST:	Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail
FAE :	Formaline-acetate d'éthil
FE :	Formaline-éther
g :	Gramme
GINs :	Gastrointestinal nematodes
Gr. Sp.:	Gravité spécifique
LFR :	Litière de Fumier Recyclée
Log :	Fonction logarithmique naturelle
LV :	Imidazotiazole / Tetrahydropyrimidine
Min. :	Minute
ml :	Millilitre
ML :	Lactones macrocycliques
MZN :	Modified Ziehl-Neelsen
NaCl :	Formule chimique du chlorure de sodium
NB :	Distribution binomiale négative
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PBS :	« Phosphate-buffered saline »
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase
PPP :	Période de prépatance
QC :	Province de Québec, Canada

rARN :	Acide ribonucléique ribosomal
RFLP :	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RMS :	Recycled Maure Solid
Spp. :	Sous-espèce
SSU :	Petite sous-unité de l'ARNr
VIH-SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquise
ZnSO <sub>4</sub> :	Formule moléculaire du Sulfate de Zinc
µg :	Microgramme
°C :	Degré Celsius
µl :	Microlitre

## DÉDICACE

À mon Dieu tout puissant, car sans Lui rien de tout cela n'aurait été possible.  
Avec tout mon amour, à ma mère Rosa Marlene, pour être présente à mes côtés pour me soutenir et m'encourager à poursuivre mes rêves, même lorsque le chemin devient difficile.

À mon père Henry, même s'il n'est pas auprès de moi, car j'ai toujours senti dans mon cœur, tout son amour, sa force et son enthousiasme, ce qui m'a permis de ne pas m'affaiblir. Que Dieu le garde dans sa sainte gloire « Papito ».

À mon frère Henry René, pour sa compagnie, son sacrifice, sa patience et sa compréhension dans cette étape importante de ma vie.

À mon frère Jorge Andrés, à mes belles sœurs Laura et Natalia et à mes neveux Mafe, Titis et Dieguito, pour leur amour et leur soutien, car malgré la distance, j'ai toujours pu compter sur eux.

Au Dr Christopher Fernandez-Prada, à qui je ne remercierai jamais assez de m'avoir offert cette opportunité et d'avoir rendu possible cette grande réalisation dans ma vie professionnelle. Merci beaucoup pour votre patience et votre soutien.

Au Dr Simon Dufour, pour m'avoir offert son aide et ses connaissances.  
À tous mes amis, pour leur aide inconditionnelle, leur patience et leur compréhension.  
Et à tous ceux qui ont directement ou indirectement rendu possible ce triomphe.

Marlen.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier à l'Université de Montréal, Op+Lait et le Gremip pour avoir rendu possible ce projet, ainsi que la Dre Karine Thivierge et le comité du conseil académique, les doctresses Rebecca Guy, Josée Harrel et Mariela Segura.

De manière très particulière, j'exprime ma sincère gratitude à mon directeur de recherche, le Dr Christopher Fernandez-Prada, professeur adjoint du département de pathologie et de microbiologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, pour son excellente disposition, sa direction, sa collaboration et son temps de dévouement à la réalisation de ce projet de recherche.

À mon codirecteur, le Dr Simon Dufour, professeur au département de pathologie et de microbiologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Montréal et directeur scientifique de Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait, pour avoir partagé ses connaissances et aidé au développement du projet.

À mes collègues de laboratoire de recherche, Noélie Douanne, Audrey Corbeil, Chloé Rosa Teijeiro, Victoria Wagner et Wilmer Martinez, pour leur collaboration et leur camaraderie. À Aida Minguez par sa collaboration dans l'élaboration des illustrations et mise en forme de la mémoire. Mais surtout à mon ami et collègue, Joan Peña, pour son amitié, sa patience, ses conseils et son aide.

Au centre de diagnostic de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, en particulier à l'équipe du laboratoire de parasitologie, Marie-Ève Caron, Fannie Damour, Paola Gallego et Denis St-Martin.

À Annie Fréchette, pour sa collaboration dans le recrutement des fermes et dans la collecte des échantillons, ainsi qu'aux producteurs laitiers qui ont participé à cette étude.

Et enfin à tous ceux qui, pour leur aide, leurs conseils et leur collaboration personnelle et académique, ont contribué au développement de ce projet de recherche.

## **1 INTRODUCTION**



La litière de fumier recyclé (LFR) est utilisée comme litière depuis les années 70 en Amérique du Nord (Carroll et Jasper, 1978). Au cours des dernières années, la LFR a suscité l'intérêt des producteurs laitiers au Canada, devenant une alternative intéressante à la litière traditionnelle en raison de sa disponibilité sur place et de son association avec le confort des vaches (Husfeldt et al., 2012b, Leach et al., 2015). Alors que différentes approches ont été développées afin de garantir la sécurité des animaux et des producteurs (Fournel et al., 2019), des incertitudes importantes subsistent quant aux risques associés à la LFR. Les recherches sur les effets de la LFR sur la santé et le bien-être des animaux sont encore rares et la seule maladie dont les conséquences ont été étudiées en détail est la mammite due aux infections bactériennes. De cette manière, différentes études ont mis en lumière les populations bactériennes présentes et persistantes (même après un processus de compostage) dans la LFR, notamment *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. ou *Escherichia coli*, entre autres (Hogan et al., 1999, Sorter et al., 2014, Leach et al., 2015, Cole et Hogan, 2016 et Rowbotham et Ruegg, 2016). De plus, une étude récente a montré que la numération bactérienne des agents pathogènes de la mammite dans les LFR compostées était comparable à celle du fumier recyclé frais lorsqu'il était utilisé comme litière (Cole et Hogan, 2016).

La plupart des productions laitières ont subi une transformation au cours de la seconde moitié du 20e siècle et, par conséquent, les animaux ont commencé à être hébergés à l'intérieur toute l'année à l'aide de différents systèmes en constante évolution (Bewley et al., 2017). Ce changement a considérablement réduit l'exposition des animaux aux parasites nématodes gastro-intestinaux qui contaminent les pâturages, puisqu'ils sont incapables d'achever leur cycle de vie chez les bovins en confinement. De nouvelles menaces infectieuses telles que les parasites protozoaires, principalement *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. et *Eimeria* spp. (coccidies), qui sont moins fréquemment observés dans les systèmes de production basés sur les pâturages, considérant les caractéristiques propres à leur cycle de vie (Vande Velde et al., 2018). Les pertes économiques précises associées à ces parasites n'ont pas été examinées en détail dans les productions laitières, mais elles incluent le coût du traitement et du contrôle de l'entérite, une plus faible conversion alimentaire et une baisse de la productivité laitière, ainsi que des pertes dues à la mort des animaux (Olson et al., 1995, Mark-Carew et al., 2010, Sudhakara Reddy et al., 2015,

Zechner et al., 2016, Thomson et al., 2017). Il est important de noter que les preuves actuelles indiquent que les ruminants constituent un réservoir potentiel du pathogène zoonotique *Cryptosporidium* spp., à partir duquel les humains sont contaminés par de la nourriture et de l'eau contaminées ou par contact direct avec du bétail (Robertson et al., 2010, Gormley et al., 2011, Pumipuntu et Piratae, 2018). Les LFR utilisées comme litière sont préparés en séparant une fraction du liquide du fumier des vaches suivies ou non d'un processus de compostage de la fraction la plus solide. De manière inquiétante, les LFR pourraient être une source potentielle de transmission de *Cryptosporidium* spp. (en particulier dans les LFR non compostées), car les animaux infectés peuvent transmettre jusqu'à 10 milliards d'oocystes par gramme de matières fécales (O'Handley et al., 1999) et ces oocystes sporulés sont très résistants dans l'environnement en raison de leur paroi unique riche en liaisons disulfure (Carey et al., 2004).

L'hypothèse de ce projet est que l'utilisation de solides de fumier recyclé comme litière peut causer la propagation de plusieurs agents parasitaires et affecter la santé et la productivité des bovins laitiers ou encore la santé des consommateurs.

L'objectif de la recherche actuelle était de déterminer si les parasites les plus courants associés au tube digestif des bovins survivraient aux procédures de préparation de la litière LFR utilisées dans les fermes du Québec. Un autre objectif important était de déterminer si certains de ces parasites, en particulier les pathogènes zoonotiques tels que *Cryptosporidium* spp., pouvaient être récupérés dans le lait du réservoir provenant de fermes utilisant ce système de litière (soit par contamination des glandes mammaires, soit, plus vraisemblablement, par contamination du lait pendant la récolte). Un objectif secondaire était d'évaluer si la distribution de ces parasites différerait dans le fumier des vaches logées sur une litière LFR par rapport à celui des vaches logées sur un système de litière plus conventionnel, comme la litière en paille.

## **2 REVUE DE LITTÉRATURE**

## **2.1 SYSTÈME DE PRODUCTION LAITIÈRE AU CANADA**

L'industrie laitière canadienne est composée d'animaux rigoureusement sélectionnés au niveau génétique et performance afin d'assurer la qualité des produits. Les activités de recherche et de développement sur les produits laitiers et les méthodes de production sont le fruit d'alliances stratégiques établies entre les producteurs, les transformateurs, les universités et les centres de recherche et surveillance fédérales et provinciales qui collaborent pour assurer la vigueur et le dynamisme du secteur (Centre canadien d'information laitière).

Des normes, des stratégies et des protocoles nationaux de biosécurité très stricte appliqués à l'ensemble de la chaîne de production, de transformation et de transport (de la ferme jusqu'aux consommateurs), contribuent à l'excellente réputation des produits laitiers canadiens, dont les objectifs sont de protéger les ressources animales et la mise en œuvre des programmes nationaux d'éradication de graves maladies du bétail. Plus de 75% des troupeaux laitiers sont inscrits aux différents programmes de contrôle, ces vaches produisent en moyenne 10 291 kg de lait par période de lactation (305 jours) avec une teneur moyenne de 3,95% en matière grasse et 3,25% en protéines. Cependant, le Canada n'est pas un grand exportateur de produits laitiers, sa production est destinée principalement aux marchés intérieurs (Centre canadien d'information laitière).

Le secteur laitier canadien offre une gamme variée de lait et de produits laitiers en plus de jouir d'une excellente renommée mondiale. L'industrie laitière canadienne se classe au deuxième rang du secteur agricole et vient juste derrière le secteur de la viande rouge (Centre canadien d'information laitière). Les principaux produits laitiers canadiens pour l'exportation sont le fromage (plus de 1000 variétés), les produits à base de lactosérum, du lait entier et écrémé en poudre et les concentrés de protéines de lait, où l'Amérique du Nord est la principale destination des exportations (121,7 millions de dollars par année). Depuis quelques années, la production laitière a subi plusieurs transformations au Canada. En effet, le nombre moyen de vaches par ferme laitière canadienne est passé de 37 en 1988 à 61 en 2016 et le nombre de producteurs laitiers est passé de 36 445 en 1988 à 11 280 en 2016, cela montre qu'il y a moins de fermes, mais chacune exploite un plus grand nombre de vaches (Commission canadienne du lait et Leblanc, 2012).

### **2.1.1 Utilisation de la litière**

Dans l'industrie laitière, l'utilisation de litières est fréquente pour offrir aux vaches un lieu plus confortable, propre et sec pour qu'elles se reposent, ce qui diminue le niveau de stress et améliore la productivité. Il existe deux types de litières : organiques (la sciure de bois, la paille, le copeau de bois, la rafle de maïs et le fumier recyclé entre autres) et inorganiques (le sable). Les matériaux organiques contiennent des éléments nécessaires pour la croissance et le développement de divers micro-organismes qui peuvent être hautement pathogènes, contrairement aux matériaux inorganiques qui ne possèdent pas ces éléments. Cependant, quand la litière inorganique est en contact avec la matière organique (la matière fécale et l'urine), il y aura de tout de même croissance et développement de micro-organismes pathogènes (Bramley et Neave, 1975 et Cornell Waste Management Institute, 2010).

## **2.2 LITIÈRE DE FUMIER RECYCLÉ**

Actuellement, la protection de l'environnement, la prévention de la contamination des eaux et la conservation des sols sont des priorités dans les exigences des productions d'élevage; donc, tout ce que facilite et améliore la gestion des déjections d'élevage doit être considéré comme un bénéfice (Saña et Soliva, 2006).

En 1970, dans les zones arides et chaudes de l'ouest des États-Unis, c'était le début de l'utilisation de matériel obtenu à partir de la séparation physique du lisier (fumier recyclé solide) comme litière pour le bétail laitier (Keys et al., 1976 et Timms, 2008c). Au cours des dernières années, la capacité technique de produire ces matières sèches a été améliorée par l'emploi de machines de haute performance comme les presses mécaniques (à vis ou à rouleaux par exemple). Ces améliorations ont renforcé et facilité la manutention des matériaux et l'incorporation des techniques comme le compostage qui vise à réduire les risques sanitaires en diminuant le nombre de bactéries et d'autres agents pathogènes (Carroll et Jasper, 1978). Cela a permis pour l'Europe d'adopter cette technique sous différentes conditions climatiques (Leach et al., 2015, Zähler et al., 2009, Feiken et Van Laarhoven, 2012 et Marcher et Pedersen, 2015).

Malgré cette nouvelle technique qui apporte divers bénéfices pour les producteurs laitiers, elle continue de préoccuper par ses risques potentiels sur la santé des animaux et

sur la santé publique qui seraient causés par l'éventuelle propagation d'agents pathogènes (des bactéries et des parasites entre autres), cependant le problème est qu'il n'existe pas beaucoup de rapports, de recherches ou de données qui confirment pleinement ou réfutent le risque potentiel de son utilisation (Leach et al., 2015).

Il est évident que le fumier est un matériel hétérogène (Saña et Soliva, 2006) où la fraction solide se compose principalement de fibres non digérées (Menear et Smith, 1973). Le fumier de bétail est un sous-produit animal de catégorie 2; en Europe le règlement CE 1069/2009 définit des règles strictes d'utilisation pour minimiser les risques sanitaires éventuels en ce qui concerne la santé publique et animale (European Commission, 2009). Par exemple, en attendant les recherches sur ce sujet, le Royaume-Uni et le Scottish Office ont permis une utilisation de cette litière sous des conditions contrôlées en appliquant des stratégies de surveillance étroite sur les effets de la santé du troupeau. Dans d'autres pays (pays de Galles et d'Irlande du Nord) son utilisation est interdite depuis 2015 (Leach et al., 2015).

### **2.2.1 Méthodes d'obtention de la litière de fumier recyclé**

L'utilisation de fumier recyclée comme litière pour les vaches laitières devient une alternative populaire, de cette façon, différentes méthodes de préparations ont été appliquées sur des fermes laitières commerciales au Canada et au Québec. La méthode de recyclage du fumier consiste à retirer une partie de la fraction liquide et à utiliser la fraction solide résiduelle comme litière. Cette litière recyclée peut être utilisée la journée même après l'extraction ou être compostée partiellement sur plusieurs journées.

La base scientifique pour une gestion optimale de la litière recyclée est limitée et parfois contradictoire (Zehner et al., 1986 et Harrison et al., 2008). Le développement de micro-organismes pathogènes dans cette litière peut être affecté directement par les conditions climatiques (principalement l'humidité), ainsi que par la saison de l'année (Leach et al., 2014 et Larney et al., 2000). Selon son caractère hygroscopique (elle a une grande capacité d'absorption d'eau), la litière recyclée doit être entreposée sous abri et utilisée uniquement dans des bâtiments aérés (Leach et al., 2014 et Misselbrook et Powell, 2005).

L'humidité de la litière recyclée dépend de la taille des particules du fumier (plus les particules sont petites, plus l'humidité est élevée) et de la profondeur du lit (plus le lit est profond, plus l'humidité est élevée) (Bramley et Neave, 1975 et Cornell Waste Management Institute, 2010).

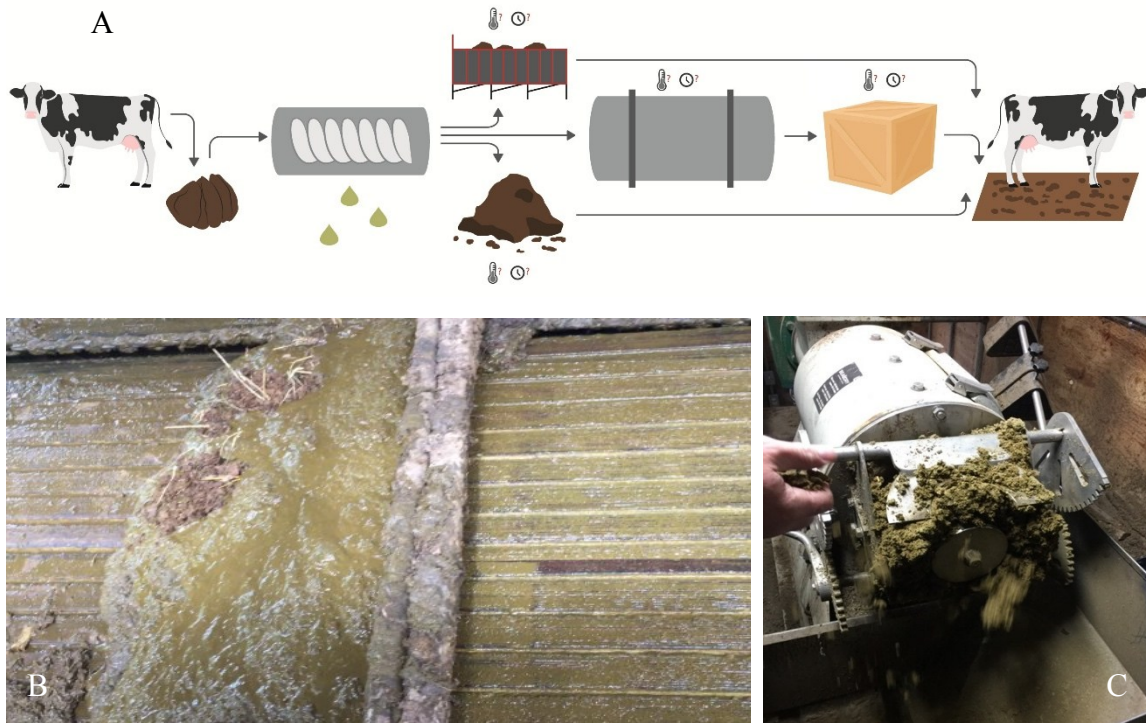
Les méthodes de contrôle d'agents pathogènes incluent le compostage des matières solides de fumier à l'air libre ou dans un réacteur de compostage, l'aération des boues, le traitement anaérobie (digestion), l'addition d'acide paracétique ou le traitement thermique (chaleur); où les plus fréquemment utilisés sont le compostage et la digestion (Heinonen-Tanski et al., 2006 et Bishop et al., 1981).

Les déjections d'élevage subissent diverses transformations comme la décomposition, le chauffage, le séchage et l'humidification. L'éleveur peut intervenir sur quelques processus pour obtenir un produit final de qualité, soit la déshydratation et certains des processus biologiques (Angelet, 1985 et Saña et Soliva, 1987).

#### 2.2.1.1 Déshydratation par moyens physiques

L'utilisation d'équipement complexe est habituellement nécessaire pour séparer la fraction liquide de la fraction solide du fumier (Figure 1). Cette séparation peut être effectuée par des méthodes simples comme l'action de la gravité : le fumier des couloirs est poussé jusqu'au tas de fumier par des moyens mécaniques comme par l'utilisation de râteaux mécaniques (figure 1B) ou pelles assemblées au tracteur (Saña, 2004).

L'équipement permet la séparation des fractions solides et liquides du fumier. Ce type de séparation nécessite une contribution énergétique, par exemple la centrifugation ou le tamisage à pression (Figure 1C). Après la déshydratation deux fractions sont obtenues, la fraction liquide et la fraction solide, cette dernière est constituée par de petites particules homogènes d'aspect poreux (Lloreda, 2004 et Saña, 2004).



**Figure 1.** (A) Schéma de l'élaboration de litière à base de solides recyclés de fumier. La litière compostée est produite selon l'une des trois méthodes suivantes : séparation des solides du fumier dans un digesteur anaérobie ; séparation des solides du fumier dans un composteur à tambour ; où séparation des solides du fumier sans transformation subséquente. (B) Système mécanique pour le transport du fumier dans la fosse à partir de laquelle la litière recyclée est préparée. (C) Dans ce cas, le fumier recycle est produit en séparant les solides de fumier sans autre transformation subséquente. (Schéma : Aida Minguez Menendez. Photos : Marlen Irlena Lasprilla Mantilla).

### 2.2.1.2 Transformations microbiologiques

Généralement, les transformations microbiologiques sont produites spontanément dû au contenu riche en matière organique dégradabile et en éléments essentiels. Les facteurs importants dans le cycle de décomposition de la matière organique sont la température (la température affecte directement la croissance microbienne et diffère selon les climats) et la concentration en oxygène (Leach et al., 2014).

L'activité microbienne est plus importante lorsque la température est plus élevée, jusqu'à la température maximale de 50°C. À partir de cette température, une diminution de l'activité microbienne est observée, alors qu'il n'y a aucune activité microbienne significative entre 60 et 65°C. Par contre, lorsque la température diminue, l'activité microbienne recommence et la concentration d'oxygène augmente le rythme de transformation. La vitesse de transformation est plus élevée lorsque la présence d'oxygène



est plus abondante. Dans certaines situations temporaires, il n'y a pas de transformation microbienne, que ce soit à cause de la présence d'inhibiteurs microbiens, de matières très sèches et/ou de pH extrêmes (Angelet, 1985, Saña et Soliva, 1987 et Soliva, 2001).

### 2.2.1.3 Le compostage

Actuellement, le compostage est considéré comme une biotechnologie écologique simple et polyvalente, même si ses origines sont très antiques. L'objectif principal est d'obtenir un matériel stable et résistant à la dégradation microbienne en contrôlant la concentration d'oxygène et la température optimales afin d'éviter l'activité microbienne et les mauvaises odeurs. Les avantages du compostage sont multiples, c'est une technique économique qui réduit le volume et la masse des déchets, facilite son entreposage, permet une meilleure utilisation agricole et plus flexible, en plus de minimiser le risque sanitaire inhérent que les déjections représentent (Saña et Soliva, 2006, Rynk, 2001 et Soliva, 2001).

### **2.2.2 Avantages potentiels de l'utilisation de la litière de fumier recyclé**

Avant d'adopter cette technique, une analyse économique doit être faite pour évaluer l'état financier et les besoins de la ferme. L'investissement implique l'équipement, le temps de gestion et les coûts de fonctionnement et de maintenance en face des coûts d'achat et de gestion des litières conventionnelles (Leach et al., 2014 et Rynk, 2001).

La litière recyclée est plus accessible (physiquement plus facile à obtenir et moins dispendieuse) et les coûts sont moindres en comparaison avec la litière traditionnelle. Également, ce type de litière offre plus de confort aux animaux puisqu'elle est douce et non-abrasif. Les vaches préfèrent le confort de cette litière. (Leach et al., 2014, Keys et al., 1976, Adamski et al., 2011 et Feiken et Van Laarhoven, 2012), en outre, l'utilisation de la LFR principalement dans les lits profonds diminue les lésions au niveau du jarret. (Brenninkmeyer et al., 2013, Husfeldt et Endres, 2012, Leach et al., 2014 et Zähler et al., 2009). De plus, une amélioration de l'état de propreté des animaux est observée (Leach et al., 2014, Hippen et al., 2007, Timms, 2008b et Feiken et Van Laarhoven, 2012); cependant, la propreté visuelle ne signifie pas l'absence d'agents pathogènes (Endres et Husfeldt, 2012).

Husfeldt et collaborateurs (2012) et Sorter et collaborateurs (2014), ont rapporté que l'utilisation de litières profondes avec un remplacement fréquent peut aider à augmenter le confort physique des vaches, ainsi que le contrôle d'agents pathogènes.

### **2.2.3 Risques présents par l'utilisation de la litière de fumier recyclé**

L'utilisation de la litière recyclée comporte plusieurs risques potentiels pour la santé animale, la santé humaine, la productivité de la ferme et la qualité des produits à cause de la présence possible d'agents pathogènes qui peuvent survivre au processus de compostage. Par exemple, les bactéries capables d'affecter l'intégrité du pis de la vache ou la présence de parasites comme le *Cryptosporidium* spp., qui causent des pertes économiques, de la morbidité et de la mortalité chez le bétail (principalement les nouveau-nés) (Bradley et al., 2014).

*Cryptosporidium* spp. est l'un des plus importants et dangereux parasites zoonotiques retrouvés chez les vaches laitières. En effet, les oocystes sont capables de survivre dans l'environnement et de supporter les traitements désinfectants standards. Certaines des espèces de *Cryptosporidium* spp. ont une large gamme d'hôtes et peuvent être transmis aux humains par contact direct avec des animaux ou par l'ingestion d'eau et de nourriture contaminées par les oocystes.

L'utilisation de la LFR chez le bétail peut augmenter le développement et la persistance de la résistance microbienne. Cela aurait des conséquences pour la santé humaine et animale (Habing et al., 2012).

L'entreposage de la LFR n'est pas conseillé à long terme, surtout lorsque le taux d'humidité est élevé (Feiken et Van Laarhoven 2012). La LFR n'est pas homogène, car un échantillon de fumier d'une extrémité du conteneur a un âge et une évolution différente de celui placé dans une autre extrémité du conteneur et peut avoir différentes caractéristiques basées sur plusieurs facteurs; comme le climat, la température, l'humidité, l'activité microbienne et le temps d'entreposage (Leach et al., 2014).

La LFR subit des transformations, comme la décomposition de sa matière organique par les micro-organismes, le chauffage grâce à l'énergie libérée dans cette décomposition, le séchage par la même énergie ou par l'action du soleil ou du vent, l'humidification par la pluie et les pertes de composés gazeux par l'évaporation (Saña et

Soliva, 2006). Toutes ces transformations peuvent favoriser la présence et l'évolution de plusieurs agents pathologiques (Angelet, 1985).

#### 2.2.3.1 Risques pour la santé animale

Les études et les rapports ne peuvent pas établir un lien direct entre l'utilisation de la LFR et l'incidence de maladies infectieuses chez les animaux. Les conditions où il y a plus de données de risques théoriques qui peuvent associer les problèmes sanitaires avec la litière recyclée sont relatives à : la santé du pis – la mammite (Bramley et Neave, 1975, Carroll et Jasper, 1978 et Hogan et al., 1989), la paratuberculose ou maladie de Johne (Harrison et al., 2008, Bonhotal et al., 2011, Timms, 2008a et Pronto et Gooch, 2009) et la boiterie (Husfeldt et Endres, 2012, Wells et al., 1993, Von Keyserlingk et al., 2012, Timms, 2008b, Adamski et al., 2011 et Ostrum et al., 2008) .

#### 2.2.3.2 Risques sur la santé humaine

Il n'y a pas beaucoup de données ni de recherches sur le sujet pour évaluer l'impact de l'utilisation de la LFR chez les bovins sur la santé humaine. Cela met en lumière l'importance de la prévention et de la biosécurité, comme les bonnes techniques d'hygiène personnelle à la ferme et l'utilisation d'équipements de protection pour les travailleurs agricoles. Pour les produits destinés à la consommation, le processus de pasteurisation et la microfiltration du lait permettent d'atténuer les risques de santé pour les consommateurs (Leach et al., 2015).

#### 2.2.3.3 Risques sur la qualité des aliments

Les microorganismes transférés de la LFR vers le lait peuvent affecter ses propriétés de conservation, s'ils survivent à la technique de pasteurisation et de microfiltrage (Leach et al., 2015, Driehuis et al., 2012 et Driehuis et al., 2014). Les principaux microorganismes trouvés et les plus persistants sont les bactéries, notamment *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. et l'*Escherichia coli* entre autres, responsables de la mammite bactérienne chez les vaches laitières qui affectent la qualité du lait (Hogan et al., 1999, Sorter et al., 2014, Leach et al., 2015, Cole et Hogan, 2016 et Rowbotham et Ruegg, 2016).

## **2.3 PARASITES GASTRO-INTESTINAUX LES PLUS FRÉQUENTS DANS LES TROUPEAUX LAITIERS AU CANADA**

Parmi les différents facteurs qu'affectent la production animale, les maladies d'origine parasitaire (compte tenu de leurs taux élevés de morbidité) occasionnent des effets nocifs importants sur la santé et le développement physique des animaux (Almada, 2015, Levine, 1968 et Soulsby, 1965), ce qui se reflète par une baisse considérable de la production (Cordero del campillo et al., 1999, Soulsby, 1987 et Roeber et al., 2013).

Les parasites qui produisent les plus grandes pertes économiques à l'industrie sont les parasites gastro-intestinaux (Entrocasso, 1988), dues à la mortalité des veaux dans les cas graves d'infection, à l'altération de la conversion alimentaire, en occasionnant une diminution du gain de poids et en altérant significativement la production de viande et de lait (Craig, 2018, Gómez Arriagada, 2000, Wenks, 1970, Schroder et Swan, 1979, Almada, 2015, Kassai, 1999 et Taylor et al., 2007).

L'infection et/ou la maladie par parasites gastro-intestinales vont varier selon l'espèce, l'âge du ruminant et son environnement. Craig, 2018 et Kyriazakis et Houdijk, 2006, affirment que les parasites affectent principalement les animaux plus jeunes y compris les nouveau-nés. Ainsi, l'efficacité de la production de la ferme dépend fondamentalement du soin que les veaux reçoivent dans les premiers mois de vie (Boch et Supperer, 1982, Almada, 2015).

Les espèces de parasites gastro-intestinaux les plus communes chez les bovins appartiennent au phylum des nématodes, trématodes, cestodes et protozoaires où il y a une grande variété d'espèces dans chacun de ces groupes (Tableau 1).

### **2.3.1 Présentation des parasites gastro-intestinaux sur les fermes laitières.**

La présence de parasites n'est pas synonyme de maladie parasitaire. La plupart des pertes économiques sont sous la forme sous-clinique et non sous la forme clinique de la maladie. De façon générale, les parasites gastro-intestinaux chez les bovins ont un effet direct sur le système digestif des animaux à cause de l'attachement des parasites à la paroi intestinale qui provoque la perte d'intégrité des cellules épithéliales de l'intestin (Craig, 2018, Kassai, 1999 et Taylor et al. 2007). La présentation sous-clinique occasionne une diminution dans la production laitière (de 1-2 litres de lait / vache / jour) (Almada, 2015).

### 2.3.1.1 Présentation sous-clinique des parasites gastro-intestinaux.

Les manifestations sous-cliniques les plus importantes retrouvées chez les bovins, sont la malnutrition en raison de la diminution de l'appétit et de la consommation ce qui va causer une perte de poids et altérer la conversion alimentaire s'en suit une concentration d'azote insuffisante pour le métabolisme de protéines et une hypoalbuminémie due à la perte de protéines plasmatiques dans l'intestin (Barker, 1973, Kassai. 1999, Taylor et al. 2007, Charlier et al. 2017 et Coop et Kyriazakis. 1999).

**Tableau 1.** Parasites les plus fréquents chez les bovins au Canada. Adapté Foreyt, 2003, Zajac et Conboy, 2006 et Bowman, 2009.

PHYLUM	ESPÈCES	DIMENSIONS (µm)	PPP* (j)
Nématodes	<i>Bunostomum phlebotomum</i>	106x46	52-68
	<i>Capillaria bovis</i>	45-50x22-25	
	<i>Cooperia</i> spp.	80-100x40-50	21
	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	300-360	28
	<i>Haemonchus placei</i>	70-85x41-48	26-28
	<i>Nematodirus filicollis</i>	175-260x106-110	14-21
	<i>Nematodirus helvethianus</i>	160-230x85-121	14-21
	<i>Nematodirus spathiger</i>	175-260x106-110	14-21
	<i>Oesophagostomum radiatum</i>	70-76x36-40	32-42
	<i>Ostertagia ostertagi</i>	80-85x40-45	21
	<i>Strongyloïdes</i> spp.	40-60x20-25	7-9
	<i>Trichostrongylus axei</i>	79-92x31-41	19-23
	<i>Trichuris colubriformis</i>	70-101x39-47	15-23
	<i>Trichuris discolor</i>	60-73x25-35	42-70
Trématodes	<i>Fasciola hepatica</i>	130-150x60-90	60-90
	<i>Fascioloides magna</i>	109-168x75-96	150
	<i>Paramphistomum cervi</i>	114-176x73-100	103-115
Cestodes	<i>Moniezia benedeni</i>	56-75	37-40
	<i>Moniezia expansa</i>	56-67	37-40
Protozoaires	<i>Cryptosporidium</i> spp.	4-5	4
	<i>Eimeria bovis</i>	23-34x17-23	7
	<i>Eimeria zuernii</i>	15-22x13-18	7
	<i>Giardia</i> spp. : trophozoïtes kystes	11-19x7-10 7-16x4-10	7

Une autre conséquence d'une infection par des parasites gastro-intestinaux est le déséquilibre du métabolisme minéral, comme la diminution dans l'absorption et le dépôt de calcium, de phosphore et de magnésium dans l'os. Ce déséquilibre peut produire une réduction dans le développement du muscle squelettique des jeunes animaux avec des implications dans la production, puisque la taille du squelette déterminera les performances de croissance musculaire (Sykes et al., 1977 et Reveron et al., 1974). Il y a aussi une répercussion directe sur la reproduction en raison du retard dans le développement génital, une réduction de la région abdominale basse (région pelvienne) et une diminution des taux de gestation, entre autres (Sykes et al., 1975).

#### 2.3.1.2 Présentation clinique des parasites gastro-intestinaux.

Plusieurs manifestations cliniques sont dues aux parasites gastro-intestinaux chez les bovins. La sévérité des lésions dépend de différents facteurs, comme les caractéristiques des animaux (l'âge, l'espèce, et l'état général), la gestion du bétail (le plan nutritionnel, le plan vaccinal et le plan de vermifugation) et les caractéristiques des parasites présents (l'espèce, l'étape du développement et sa localisation dans l'hôte) entre autres (Roeber et al., 2013, Wimmer et al., 2004, Kassai, 1999 et Taylor et al. 2007).

Globalement, dans le début de l'infection par les parasites gastro-intestinaux, il y a d'abord inflammation de la muqueuse intestinale, destruction morphologique et fonctionnelle des cellules épithéliales de l'intestin, suivi de l'augmentation de la perméabilité intestinale et de diarrhée. Celle-ci peut être de légère à complètement aqueuse, ce qui provoque la déshydratation et la détérioration de l'état général des animaux infectés, provoquant un affaiblissement du système immunitaire et favorisant le risque d'entrée d'agents pathogènes bactériens et/ou viraux (Reveron et al., 1974, Sykes et al., 1975, Sykes et al., 1977 et Charlier et al., 2017).

Quand les animaux ont un système immunitaire affaibli, une perte d'appétit est notée (anorexie), entraînant la malnutrition; dans les cas plus graves, les animaux peuvent arriver jusque l'émaciation. Il convient de noter que plusieurs espèces de parasites gastro-intestinaux sont fortement attachés à la paroi intestinale, entraînant des ulcères et des saignements intestinaux, menant à l'anémie à cause de la perte progressive de sang (Kassai, 1999 et Taylor et al. 2007).

### **2.3.2 Diagnostic**

Un diagnostic précis des parasites gastro-intestinaux est essentiel pour mettre en œuvre les procédures de contrôle parasitaire plus efficaces à la ferme. Les méthodes traditionnelles peuvent être dispendieuses et longues (Gasser, 2006 et MAFF, 1986).

L'identification par microscopie d'œufs et/ou de larves de parasites gastro-intestinaux dans les selles des animaux (différentes techniques de flottation et/ou la culture et différenciation de larves), sont les méthodes les plus utilisées pour le diagnostic, bien qu'elles ne donnent pas une classification taxonomique précise à cause de leurs faibles sensibilité et spécificité (Gasser, 2006). Dans les dernières années, l'utilisation des techniques moléculaires ont aidé à améliorer l'identification des parasites, celles-ci sont souvent plus précises et permettent identifier le genre et l'espèce des parasites gastro-intestinaux (Saiki et al., 1988 et Gasser, 2006).

Par ailleurs, il existe d'autres méthodes diagnostiques moins courantes, comme les méthodes immunologiques et biochimiques, ainsi que le diagnostic post-mortem pour identifier le nombre de parasites présents dans le tube digestif (Roeder et al., 2013).

### **2.3.3 Contrôle**

La principale méthode de contrôle des agents pathogènes est l'implémentation et l'utilisation stricte des techniques de biosécurité dans la ferme. Le contrôle efficace des parasites combine une gestion adéquate des animaux avec l'usage stratégique d'antiparasitaires ciblant les différentes caractéristiques des parasites, des animaux et des conditions de l'environnement (Sievers et Alocilla, 2007, Craig, 2018, Almada, 2015).

L'utilisation de différents produits chimiques pour la désinfection ou simplement le changement des conditions physiques des espaces pour nettoyer (laver à fond à l'eau chaude ou l'altération du pH, en augmentant l'acidité) peuvent aider à diminuer la présence de parasites dans sa forme infectante présente dans l'environnement. L'utilisation de l'ammoniac en tant que produit biocide destiné à l'hygiène vétérinaire peut prévenir les infections parasitaires dans le bétail, ainsi que le lysol (1%), le sulfate de cuivre (10%), l'iode (1%) et la formaline (5%), semblent être effectifs contre parasites comme les nématodes, les trématodes et les cestodes (Valera et Aguilera, 2007).

L'utilisation de bichlorure de mercure, l'hypochlorite de sodium (1,25%), le phénol (5%), le crésol (0,5%) et le formaldéhyde peuvent arriver à diminuer le nombre d'oocystes présents dans la ferme, mais avec une efficacité limitée (Valera et Aguilera. 2007).

### **2.3.4 Traitement**

Généralement, le traitement des parasites gastro-intestinaux repose sur l'utilisation de médicaments antihelminthiques (Coles, 2002). Actuellement, les trois principales familles des médicaments anthelminthiques pour le traitement des parasites gastro-intestinaux, sont : i) les benzimidazoles (BZ), dont l'albendazole est couramment utilisé, ii) les lactones macrocycliques (ML) y compris l'ivermectine et la moxidectine, iii) et les imidazotiazoles/tetrahydropyrimidine (LV) comprenant le lévamisole et le pyrantel (Charlier, 2017, Besier et Love, 2003, Hoste et Torres-Acosta, 2011 et Craig, 2018).

Dans le cas des protozoaires, l'utilisation de coccidiostatiques avec les sulfonamides, sont les médicaments les plus courant pour le traitement des coccidies, mais les sulfonamides ne sont pas complètement efficaces et ont une toxicité élevée (Valera et Aguilera, 2007).

## **2.4 *Cryptosporidium* spp.**

*Cryptosporidium* spp. est un organisme parasitaire unicellulaire de distribution mondiale, qui peut affecter l'intestin de presque toutes les espèces d'animaux vertébrés. Sa transmission est principalement pour voie fécale orale (Xiao, 2010 et Cacciò et Widmer, 2014), provoquant diarrhées qui peuvent être de légères jusque sévères avec épisodes de déshydratation. *Cryptosporidium* spp. affecte significativement la santé des animaux les plus jeunes dans les premiers 6 mois de vie; les animaux adultes agissent comme porteurs asymptomatiques (Keeton et Navarra, 2018).

### **2.4.1 Description du parasite**

#### **2.4.1.1 Historique**

En 1907 Ernest Edward Tyzzer trouvait dans les glandes gastriques des souris communes un nouveau parasite, qu'il a nommé *Cryptosporidium muris* à cause de l'hôte chez lequel il a été découvert (Tyzzer, 1907). Dans les années subséquentes, il a étudié les



principales caractéristiques du nouveau parasite comme le cycle de vie et sa transmission (Baillargeon. 2004). Quelques années plus tard, en 1912, une autre nouvelle espèce de *Cryptosporidium* spp. (*Cryptosporidium parvum*) étaient découvertes par Tyzzer dans le petit intestin des souris communes (Tyzzer, 1912). Durant les années 50, *Cryptosporidium* spp. était lié, à des maladies diarrhéiques chez les volailles et les dindonneaux (Slavin, 1955), ainsi qu'en 1971 et 1976 a été associé également à des maladies diarrhéiques chroniques chez les bovins (Garza Almaza et Morales Vallarta, 2002, Barer et Wrigth, 1990, Panciera et al., 1971 et Morin et al., 1976). En 1976, *Cryptosporidium* spp. a été signalé pour première fois chez les humains. En 1978, il a été montré que les patients infectés par *Cryptosporidium* spp. avaient éliminé les oocystes infectieux par les matières fécales. Jusqu'à présent, le diagnostic repose sur la démonstration de la présence des oocystes dans les selles (Pohlenz et al., 1978a). Dans la même année (1978) en Iowa aux États-Unis, une étude a reconnu différentes espèces de *Cryptosporidium* spp. comme agents entéropathogènes importants chez les veaux (Pohlenz et al., 1978b). Entre 1982 et 1983, *Cryptosporidium* spp. a été rapporté dans les patients sans problèmes immunologiques avec épisodes sévères de diarrhée (Garza Almaza et Morales Vallarta, 2002).

Dans les années 90, l'importance de *Cryptosporidium* spp. chez les patients dont le système immunitaire est compromis est reconnue et il est évident que ce parasite peut contaminer les sources d'eau et ainsi propager des oocystes sporulés infectieux (Cacciò et Widmer, 2014).

Dans les années suivantes, deux événements distincts ont influencé significativement la conscientisation de l'importance de ces parasites et des maladies qu'ils causent : i) L'épidémie de VIH-SIDA et la cryptosporidiose comme une infection opportuniste potentiellement grave chez les personnes atteintes du sida (Cacciò et Widmer, 2014) et ii) l'épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique qui a eu lieu à Milwaukee (Wisconsin – États-Unis) en 1993 (MacKenzie et al., 1994). De même, en 1993, la première flambée de *Cryptosporidium* spp. par transmission alimentaire, s'est produit au Maine, aux États-Unis, dû à la consommation de cidre de pomme contaminé par des oocystes infectieux (Laberge et al., 1996).

Par la suite, l'introduction de la PCR pour le diagnostic de *Cryptosporidium* spp. a mis en évidence sa présence constante dans le bétail, affectant particulièrement les animaux plus jeunes, ainsi que son potentiel zoonotique. Après 2004, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a inclus le *Cryptosporidium* spp. dans la liste de maladies négligées à cause du risque d'infection pour les personnes immunodéprimées, les enfants de moins de 5 ans et les personnes âgées (Cacciò et Widmer, 2014).

L'avènement des outils moléculaires pour la caractérisation et l'analyse phylogénétique de *Cryptosporidium* spp. a révolutionné la compréhension de sa taxonomie, cela a aidé à une meilleure compréhension de sa biologie, son épidémiologie et l'importance des diverses espèces de *Cryptosporidium* liées à la santé publique (Xiao et al. 1999a, Xiao et al., 2004 et Fayer, 2010).

#### 2.4.1.2 Taxonomie et classification

*Cryptosporidium* spp. est un organisme unicellulaire protozoaire zoonotique qui infecte des microvillosités épithéliales de l'appareil gastro-intestinal de diverses espèces de vertébrées y compris l'homme (Upton et al. 1985 et Fayer et Ungar. 1986). *Cryptosporidium* spp. appartient au phylum *Apicomplexa* (Tableau 2). Les parasites de ce phylum ont des caractéristiques similaires, comme la possession d'un complexe apical à un certain stade de leurs cycles de vie (Cacciò et Widmer, 2014 et Levine, 1988).

Malgré les similitudes, *Cryptosporidium* spp. montre plusieurs particularités qui le distinguent des autres coccidies. Ceux-ci incluent : i) développement endogène sur la surface apicale de la cellule hôte (emplacement intracellulaire, mais extra-cytoplasmiques); ii) la fixation du parasite à la cellule hôte : une organelle multimembraneuse est formée à la base de la vacuole parasitophore pour faciliter l'absorption des nutriments provenant de la cellule hôte; iii) la présence de deux types morpho-fonctionnels d'oocystes; un de paroi épaisse (infection d'hôte par ingestion/inhalation) et un autre de paroi mince (auto-infection chez l'hôte infesté) (Cacciò et Widmer, 2014); iv) les oocystes du *Cryptosporidium* spp. sont les plus petits de toutes les coccidies gastro-intestinales (4-6 µm) et en plus ne dispose pas de structures morphologiques telles que sporocyste, micropyle et granules polaires (Tzipori et Widmer, 2000 et Petry, 2004) et v) la grande résistance à presque tous les agents

anticoccidiens et antiprotozoaires testés jusqu'à présent (Blagburn et Soave, 1997; Cabada et White, 2010 et Baillageon, 2004).

**Tableau 2.** Classification taxonomique de *Cryptosporidium* spp. Adapté de O'Donoghue, 1995, Chermette, 1997, Nichols, Campbell, et Smith, 2003 et Luján Zanaro et Garbossa. 2008.

CLASSIFICATION	NOM
<b>Règne</b>	Protiste
<b>Phylum</b>	<i>Apicomplexa</i>
<b>Classe</b>	<i>Sporozoasida</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Coccidiasina</i>
<b>Ordre</b>	<i>Eucoccidiorida</i>
<b>Sous-ordre</b>	<i>Eimeriorina</i>
<b>Famille</b>	<i>Cryptosporidiidae</i>
<b>Genre</b>	<i>Cryptosporidium</i>

Le genre *Cryptosporidium* spp. est formé de 25 espèces acceptées conformément à la spécificité par l'hôte, sa pathogénicité, sa morphologie et sa constitution génomique (Tableau 3). Plus de 40 génotypes différents en hôtes vertébrés ont été décrits. Le statut taxonomique de *Cryptosporidium* spp. évolue rapidement et de nombreux génotypes sont susceptibles d'être officiellement décrits comme espèces dans le futur (Cacciò et Widmer, 2014, Xiao, 2010, Plutzer et Karanis, 2009; Ng et al., 2011).

#### 2.4.1.3 Morphologie

Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont sphériques et leur taille peut varier entre 4 et 6 µm, selon l'espèce (Schmidt et Roberts, 2000). *Cryptosporidium* spp. ne dispose pas des caractéristiques morphologiques distinctives pour sa différenciation au microscope (Cacciò et Widmer, 2014). Dû à ce manque il est courant d'utiliser l'espèce de l'hôte où ils ont trouvé et sa localisation comme critère d'identification (tableau 3) (Fayer et al, 1990).

À l'heure actuelle, cette taxonomie a été remise en question, compte tenu des diverses études sur la transmission croisée, l'infectivité et les sites d'infection dans les différentes espèces d'hôtes (Fayer et al. 1990 et O'Donoghue. 1995). C'est pour cela que l'utilisation de techniques moléculaires telles que la PCR contribue à la clarification et à la

différenciation réelle de *Cryptosporidium* spp., en tenant compte de ses critères morphologiques, de sa spécificité chez les hôtes, ainsi que de ses caractéristiques phylogénétiques (Monis et Thompson, 2003 et Xiao et al., 2004).

**Tableau 3.** Espèces de *Cryptosporidium* spp. Adapté O'Donoghue, 1995, Nichols et al., 2003, Zanaro et Garbossa, 2008, Smith et al., 2005, Xiao et Fayer, 2008 et Cacciò et Widmer, 2014.

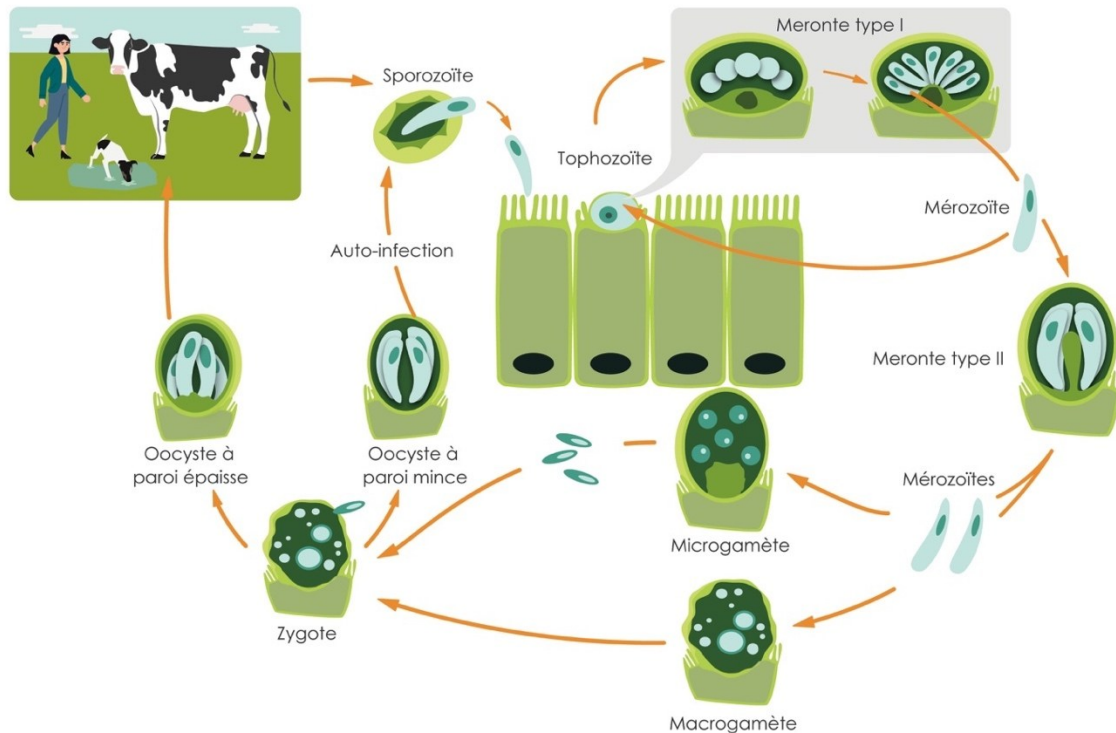
NOM	TAILLE DES OOCYSTES (µm)	SITE D'INFECTION	HÔTE HABITUEL	AUTEURS
<i>C. andersoni</i>	5,0-6,5 x 6,0-8,1	Abomasum	Bovins et chameaux	Lindsay et al., 2000
<i>C. baileyi</i>	4,6 x 6,2	Trachée, bourse de Fabricius, cloaque	Poulets et dindes	Current et al., 1986
<i>C. bovis</i>	4,76-5,35 x 4,17-4,76	Petit intestin	Bovins	Fayer et al., 2005
<i>C. canis</i>	4,95 x 4,71	Petit intestin	Chiens, humains	Fayer et al., 2001
<i>C. felis</i>	4,5 x 5,0	Petit intestin	Chats, parfois humains	Iseki, 1979
<i>C. galli</i>	8,5-8,8 x 6,2-6,4	Proventricule	Poulets et autres oiseaux	Pavlašek, 1999
<i>C. hominis</i>	4,5 x 5,5	Petit intestin	Humains et autres primates	Morgan-Ryan et al., 2002
<i>C. meleagridis</i>	4,0-4,5 x 4,6-5,2	Petit intestin	Dindes, autres oiseaux et humains	Slavin, 1955
<i>C. molnari</i>	4,72 x 4,47	Glandes gastriques	Poissons	Alvares-Pellitero et al. 2002
<i>C. muris</i>	5,6 x 7,4	Glandes gastriques	Rongeurs et mammifères	Tyzzler, 1907
<i>C. parvum</i>	4,5 x 5,5	Petit intestin	Ruminants (bovins, moutons et chèvres) et humains	Tyzzler, 1912
<i>C. saurophilum</i>	Non rapporté	Non rapporté	Lézards	Koudela et al., 1998
<i>C. serpentis</i>	4,8-5,6 x 5,6-6,6	Glandes gastriques	Lézards et serpents	Levine, 1980
<i>C. suis</i>	5,05 x 4,41	Petit intestin	Porcs	Ryan et al., 2004
<i>C. wrairi</i>	4,0-5,0 x 4,8-5,6	Petit intestin	Cobayes	Vetterling et al., 1971

La composition génotypique de *Cryptosporidium* spp. peut présenter certaines variations en raison de différents facteurs, tels que la recombinaison génétique au stade de la reproduction sexuée au cours du cycle de vie, ainsi que du type d'hôte et de la pression sélective de l'environnement où il est présent (Nina et al., 1992). C'est pourquoi, en dépit des similitudes morphologiques et génétiques entre les différentes souches de *Cryptosporidium* spp., des différences significatives de virulence et d'antigénicité sont observées (Thompson et Lymbery., 1996).

#### 2.4.1.4 Cycle de vie

Le cycle de vie de *Cryptosporidium* spp. (Figure 3) est direct et monoxénique (Chen et al. 2002 et Fayer et al. 1990). *Cryptosporidium* spp. infecte le petit intestin distal (Upton et Current. 1985 et Tyzzer. 1912) causant altérations morphologiques des cellules épithéliales, entraînant atrophie des villosités ainsi qu'une entérite grave chez les individus susceptibles (Pohlenz et al. 1978a et Pohlenz et al. 1978b).

Certain des espèces de *Cryptosporidium* spp. ont une large gamme d'hôtes qui peuvent être infectés de manière aéroportée (Balderrama-Carmona et al., 2014), par contact direct avec les animaux infestés ou par l'ingestion d'eau ou de la nourriture contaminés avec les oocystes sporulés. La transmission de *Cryptosporidium* spp. est principalement par la voie fécale orale (Fayer et Ungar. 1986). Après l'ingestion des oocystes par l'hôte, les oocystes sporulent dans le tractus gastro-intestinal, libérant les sporozoïtes infectieux (quatre sporozoïtes pour chaque oocyste) (Chen et al. 2002). Les sporozoïtes sont attachés à la membrane apicale des cellules épithéliales de l'hôte à cause de récepteurs à la surface des cellules de l'hôte et par les facteurs spécifiques d'attachement à la surface des sporozoïtes (Baillargeon. 2004).



**Figure 2.** Cycle de vie de *Cryptosporidium* spp. Auteur de la figure : Aida Mínguez Menéndez (©2019).

L'adhésion du sporozoïte à la membrane apicale d'hôte provoque la formation de la vacuole parasitophore superficielle (protrusion de la membrane cellulaire d'hôte autour du sporozoïte du fait de la réorganisation de l'actine dans le cytosquelette des cellules hôte), les sporozoïtes envahissants gardent une localisation intracellulaire, mais extracytoplasmique. Plus tard, ils deviennent des trophozoïtes (Chen et LaRusso. 2000, Chen et al. 2002 et Baillargeon. 2004).

Les trophozoïtes mûrissent et se reproduisent de manière asexuée (mérogonie) pour produire et ultérieurement libérer les mérozoïtes dans la lumière intestinale où ils vont envahir d'autres cellules épithéliales de l'intestin. Par la suite, les mérozoïtes également mûrissent et subissent une différenciation sexuelle (gamogonie) pour devenir des gamétocytes (les microgamètes masculins et les macrogamètes féminins), la forme capable de reproduction sexuée du parasite (Current et Garcia. 1991 et Baillargeon. 2004).

Quand les macrogamètes sont fertilisés par les microgamètes, les zygotes sont obtenus et se développeront en oocystes (chaque oocyste contient quatre sporozoïtes infectieux), et peuvent être de deux types différents : Environ 80% des zygotes vont devenir des oocystes qui vont être excrétés dans les selles, ces oocystes ont une paroi épaisse, sont sporulés et pleinement infectieux avant d'être excrété (Current et Garcia. 1991). Les veaux peuvent expulser de  $10^6$  à  $10^7$  oocystes/g de selles (Angus et al. 1990), tandis que, leurs mères dans la période de mise bas peuvent évacuer entre 500 et 900 oocystes/g de fèces (Faubert et Litvinsky. 2000, Scott et al. 1994 et Baillargeon. 2004). La paroi épaisse confère à l'oocyste la protection nécessaire pour résister aux menaces de l'environnement, où ils peuvent rester infectieux pendant de longues périodes de temps, en étant responsables de la transmission du parasite d'un hôte à l'autre, soit par contact direct et/ou par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par ces oocystes infectieux (Current et Garcia. 1991). Environ le 20% restant des zygotes se développent en oocystes de paroi mince, qui vont rester dans l'intérieur d'hôte et sont les responsables de l'auto-infection parasitaire (Chen et al. 2002, O'Donoghue. 1995 et Current et Garcia. 1991).

#### 2.4.1.5 Principales espèces de *Cryptosporidium* spp. chez les bovins

*Cryptosporidium muris* (5,6  $\mu\text{m}$  x 7,4  $\mu\text{m}$ ) (Luján Zanaro et Garbossa. 2008) : Il a été décrit comme un parasite protozoaire trouvé pour la première fois dans les glandes

gastriques de la souris commune (Tyzzer, 1907 et Tyzzer 1910). En raison de sa grande spécificité d'hôte, il peut affecter l'homme (Katsumata et al. 2000, Guyot et al. 2001, Gatei et al. 2002, Gatei et al. 2003, Gatei et al. 2006, Tiangtip et Jongwutiwes 2002, Palmer et al. 2003, Muthusamy et al. 2006 et Al-Brikan et al. 2008), ainsi qu'à diverses espèces animales, tant en laboratoire (Iseki et al. 1989) que naturellement y compris les bovins (Fayer 2010; Feng et al. 2011).

*Cryptosporidium parvum* (4,9  $\mu\text{m}$  x 4,4  $\mu\text{m}$ ) (Luján Zanaro et Garbossa. 2008) : Il a été découvert dans le petit intestin des souris communes (Tyzzer. 1912). Par la suite, il été retrouvé chez plus de 150 espèces d'animaux (Fayer. 2010). Toutefois, il est considéré qu'il affecte principalement les bovins, les ovins et les humains (Xiao et Ryan 2008 et Fayer. 2010).

*Cryptosporidium andersoni* (5,0-6,5  $\mu\text{m}$  x 6,0-8,1  $\mu\text{m}$ ) (Luján Zanaro et Garbossa. 2008) : Il infecte l'abomasum et a été décrit comme une des espèces des coccidies plus fréquentes chez les bovins dans le monde entier (Robertson et al., 2014) ; bien qu'il soit parfois présent chez les ovins, les caprins, les chameaux et les humains (Fayer. 2010, Feng et al. 2011, Leoni et al. 2006, Morse et al. 2007 et Waldron et al. 2011). Initialement, *Cryptosporidium andersoni* a été identifié comme *Cryptosporidium muris*, mais dans l'année 2000, Lindsay et collaborateurs, l'a décrit comme une nouvelle espèce, basée sur la localisation des étapes endogènes dans l'abomasum, sa gamme d'hôtes et la distinction génétique dans les locis multiples (Lindsay et al. 2000).

*Cryptosporidium hominis* (4,5  $\mu\text{m}$  x 5,5  $\mu\text{m}$ ) (Luján Zanaro et Garbossa. 2008) : Espèce trouvée principalement chez l'homme. À l'origine, il était connu sous le nom de *Cryptosporidium parvum* de génotype H ou 1 (humain) qu'affecte les humains et les primates non humains (Morgan et al. 1998 et Morgan et al. 1996). En 2002, il a été classé comme nouvelle espèce, sur la base des différences génétiques (16 locis génétiques) et des différences biologiques entre les isolats humains et bovins (Morgan-Ryan et al. 2002). Expérimentalement, il peut infecter les veaux, les agneaux et les porcelets (Morgan-Ryan et al. 2002 et Xiao et al. 2002). Naturellement, il a parfois été trouvé dans des dugongs, des bovins, des chèvres et des marsupiaux (Morgan et al. 2000, Park et al. 2006, Fayer. 2010, Abeywardena et al. 2012 et Ryan et Power 2012).

*Cryptosporidium bovis* (4,76-5,35  $\mu\text{m}$  x 4,17-4,76  $\mu\text{m}$ ) (Luján Zanaro et Garbossa. 2008) : Il a une large distribution géographique et affecte principalement les veaux (Feng et al. 2007). Il est identifié comme *Cryptosporidium* génotype Bovine B (Xiao et al. 2002). Elle a été déclarée nouvelle espèce en raison de sa distinction génétique entre les rRNA 18S, HSP70 et les locis d'actine (Fayer et al. 2005).

## 2.5 RÉSISTANCE DES OOCYSTES DANS L'ENVIRONNEMENT

Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont extraordinairement résistants dans l'environnement en raison de sa paroi riche en liaisons disulfure (Carey et al., 2004), ils peuvent rester au sol et dans l'eau pendant plusieurs mois, conservant leur pathogénicité. Nonobstant, leur viabilité peut être affectée lorsqu'ils sont exposés à des températures extrêmes (plus de 65°C ou moins de -20°C) (Naciri et al. 1999 et Campbell et al. 1982). Également, les oocystes peuvent survivre aux désinfectants les plus courants utilisés dans les hôpitaux, les laboratoires et les traitements d'eau potable et de récréation (Campbell et al. 1982 et Rose et al. 1997).

Campbell et collaborateurs (1982) évaluaient la viabilité des oocystes dans sept désinfectants différents en utilisant la microscopie et l'incubation orale chez les souris. L'étude a montré que l'utilisation de ces désinfectants aux temps utilisés (10 secondes, 2 heures et 18 heures) ne causait pas de changements significatifs dans le nombre d'oocystes, cependant leur potentiel infectieux chez les souris était sérieusement affecté par l'utilisation de la formaline (10%) et de l'ammoniac (5%) (Campbell et al. 1982).

Une étude effectuée par Rochelle et collaborateurs (2004) dans laquelle ils utilisaient une lumière ultraviolette (dose moyenne de 7,6 mJ / cm<sup>2</sup>) pour le contrôle et l'inactivation antigénique d'agents pathogènes, y compris *Cryptosporidium parvum* (isolat Iowa), présents dans l'eau potable, a révélé l'inactivation de 99,9% des oocystes de *Cryptosporidium parvum*, démontrant ainsi la sensibilité de ce parasite à la désinfection à la lumière ultraviolette; en plus, les oocystes irradiés n'ont pas retrouvé leurs propriétés infectieuses. D'autres études sur *Cryptosporidium* spp. ont montré une inactivité de 96,4% (rang de 92-98%) suite à une exposition aux rayons UV. De plus, la réactivation de l'infectivité des oocystes *Cryptosporidium* spp. est peu probable pendant que les conditions habituelles de stockage et de distribution d'eau sont maintenues. Cela démontre ainsi la



capacité de *Cryptosporidium parvum* à réparer certains dommages causés par l'irradiation aux rayons ultraviolets. (Rochelle et al. 2004).

De même, d'autres études ont confirmé l'efficacité de l'utilisation de la lumière ultraviolette dans l'eau potable pour l'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium parvum*, obtenant des résultats très similaires : 99,99% d'inactivation des oocystes avec une dose de 19 mJ/cm<sup>2</sup> (Bukhari et al. 1999), 99,9% d'inactivation des oocystes avec une dose de 25 mJ/cm<sup>2</sup> (Craik et al. 2001) et 99% d'inactivation des oocystes avec une dose de 6 mJ/cm<sup>2</sup> (Mofidi et al. 2001).

Nonobstant, des études plus précises manquent sur l'impact du rayon UV sur d'autres espèces importantes de *Cryptosporidium* spp. Également, on ignore quel est l'effet précis d'inactivation des oocystes, soit en les tuant par l'irradiation, soit en produisant simplement des dommages qui retardent son infectivité, tandis que l'oocyste se régénère par le biais de la restauration des dimères de thymine, ce qui rétablit son infectiosité (Morita et al. 2002, Oguma et al. 2001 et Nickoloff et Hoekstra 1998).

## 2.6 MODES DE TRANSMISSION

La cryptosporidiose peut être acquise par diverses voies de transmission de façon horizontale. La première et principale voie de transmission de *Cryptosporidium* spp. est la voie directe : le contact direct avec la source de contamination des oocystes sporulés infectieux (l'hôte infectieux) des individus susceptibles sans la présence d'intermédiaires, tels que la transmission entre animaux, la transmission entre humains et la transmission zoonotique. (Des animaux aux humains) (Xiao. 2010 et Cacciò et Widmer. 2014 et Fayer et Ungar. 1986).

La deuxième voie de transmission de *Cryptosporidium* spp. est la voie indirecte, où la contagion se produit entre la source des oocystes sporulés infectants et l'hôte susceptible et agit par : i) l'air ; sa transmission se fait par voie aérienne par les oocystes infectieux en suspension dans l'air et la porte d'entrée est généralement le système respiratoire. La température, l'humidité relative et la surpopulation facilitent sa dissémination (Balderrama-Carmona et al., 2014). ii) par des véhicules de transmission, parmi lesquels l'eau; cela se produit, lorsque les eaux de surface entrent en contact avec des oocystes sporulés infectieux (Xiao. 2010 et Cacciò et Widmer. 2014), en contaminant ainsi des sources telles que les

rivières et les lacs, les eaux récréatives (Campbell et al. 1982 et Rose et al. 1997), les eaux utilisées pour l'irrigation des légumes, principalement pour ceux destinés à consommation crue et le réseau public d'approvisionnement en eau, affectant ainsi l'eau potable, l'eau pour préparer la nourriture et l'eau pour laver les ustensiles de cuisine, dans le cas des humains (Current et Garcia. 1991). Tout type d'aliment est susceptible d'être contaminé par des oocystes infectieux de *Cryptosporidium* spp., soit par contact direct avec les matières fécales infestées, soit par tout autre véhicule transportant les oocystes lors de leur manipulation (irrigation, lavage ou préparation). Parmi les aliments, on peut citer les légumes, la viande, le lait (principalement le lait cru) et les produits laitiers, entre autres (Laberge et al., 1996, Djuretic et al., 1997, Harper et al., 2002 et Deng et Cliver, 1999). Les fomites (vecteurs passifs – Real Academia Nacional de Medicina, 2012 –); tout objet, matériel ou instrument ayant été en contact avec les oocystes infectieux de *Cryptosporidium* spp. et n'ayant pas fait l'objet d'une désinfection stricte, est considéré comme une source active de dissémination des oocystes (Caccio et Widmer, 2014 et Xiao. 2010). iii) le sol; comme mentionné précédemment, les oocystes de *Cryptosporidium* spp. ont une grande résistance à rester infectieux dans l'environnement, grâce aux caractéristiques spéciales de leur paroi (Carey et al., 2004).

Il n'y a pas d'études qui rapportent si *Cryptosporidium* spp. peut être transmis de façon verticale (par la voie placentaire).

## 2.7 SIGNES CLINIQUES

Le parasite protozoaire *Cryptosporidium* spp. affecte principalement les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal des vertébrés et représente l'une des causes les plus fréquentes de diarrhée chez les animaux et chez l'homme dans le monde (Cacciò et Widmer, 2014). La dose infectante pour la plupart des espèces de *Cryptosporidium* varie de 10 à 500 oocystes sporulés infectieux (Messner et Berger, 2016).

La période d'incubation de la maladie symptomatique est d'environ 7 jours (entre 1 et 14 jours) et la maladie se résorbe généralement, avec une durée moyenne de 6 à 9 jours (avec une durée maximale de 120 jours dans quelques cas rares) (Hunter et al., 2007 et Robertson et al., 2002). Les rechutes sont courantes et 1 à 5 épisodes supplémentaires ont été rapportés entre 40 et 70% des cas chez l'homme (Hunter et al., 2004b).

Selon le cycle de vie de *Cryptosporidium* spp., une fois que les sporozoïtes sont libérés dans la lumière intestinale, ils adhèrent principalement aux entérocytes (les oocystes peuvent se propager vers des sites extra-intestinaux envahissant d'autres tissus), entraînant des modifications morphologiques, physiologiques, fonctionnelles et enfin, sa destruction, qui provoque une atrophie partielle et une fusion des villosités de la muqueuse intestinale, diminue la surface d'absorption (Soulsby, 1987, Atías, 1998, Cordero del Campillo et al., 1999, Fayer et Xiao, 2008, Del Coco et al., 2009, Neira et al., 2013, Cacciò et Widmer, 2014).

Les différentes étapes du cycle de vie du parasite déplacent le bord des microvillosités, entraînant la perte de la surface intestinale, où la taille des villosités est réduite, tandis que la longueur des cryptes intestinales augmente en raison de l'accélération de la division cellulaire, pour compenser la mort des entérocytes (Gookin et al, 2002, Smith et al., 2007). Cette hyperplasie des cryptes intestinales est formée de nouvelles cellules moins fonctionnelles, moins absorbantes et avec moins de production enzymatique qui contribuent à la survenue du syndrome de malabsorption (Soulsby, 1987, Cordero del Campillo et al., 1999, Botero et Restrepo, 2003, Del Coco et al., 2009), laissant l'intestin sensible à la croissance bactérienne, aggravant encore le tableau clinique (Atías, 1998, Del Coco et al., 2009).

La balance de l'absorption et de la sécrétion de l'intestin est affectée par l'altération de la perméabilité de l'épithélium (augmentation de la perméabilité intestinale) due à la modification des jonctions cellulaires (Cordero del Campillo et al., 1999). La sévérité des modifications morphologiques de la muqueuse épithéliale intestinale est en corrélation directe avec le nombre de parasites présents au site d'infection (Fredes Martínez, 2015). Cependant, l'ensemble de ce qui précède n'est qu'un des mécanismes pour générer une diarrhée sécrétoire et inflammatoire, car elle est considérée comme multifactorielle et que tous les facteurs de causalité n'ont pas encore été complètement clarifiés. La diarrhée peut également être provoquée par un effet direct du parasite et de ses produits sur la muqueuse épithéliale, par un effet indirect dû à la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte et/ou même en tant que mécanisme spécifique de la participation présumée d'une entérotoxine produite par le parasite (Neira et al., 2013, Fredes Martínez, 2015).

Le mécanisme par lequel le parasite *Cryptosporidium* spp. peut se propager et envahir d'autres épithéliums extra-intestinaux tels que les reins et les voies respiratoires est encore inconnu, bien que l'on soupçonne que, dans le système respiratoire, cette invasion est liée à l'entrée des oocystes par voie aérogène (Atías, 1998, Cordero del Campillo et al., 1999, Mercado et al., 2007, Neira et al., 2013, Fredes Martínez, 2015).

La composition antigénique des oocystes de *Cryptosporidium* spp. n'est pas statique et peut être modifiée par divers facteurs (comme la recombinaison génétique des gamogonies au cours de la reproduction sexuée dans le cycle de vie), en fonction du type et des caractéristiques de l'hôte, et par d'autres facteurs relatifs à l'environnement (comme la réaction à la pression sélective exercée par l'environnement), c'est pourquoi la sévérité de la symptomatologie de la même souche peut provoquer des signes cliniques différents selon les environnements (Morgan et al., 1996).

La gravité et la durée de la diarrhée due à *Cryptosporidium* spp. varient considérablement (Fayer et al., 1998). Les patients souffrant de cryptosporidiose (animaux et/ou humains), peuvent avoir une diarrhée aqueuse, parfois abondante, parfois muqueuse, mais rarement sanglante, avec résolution spontanée chez les individus immunocompétents, mais l'infection peut être chronique et potentiellement mortelle pour ceux qui sont immunodéprimés (Hunter et al., 2007).

### **2.7.1 Signes cliniques chez les bovins**

*Cryptosporidium* spp. c'est un parasite omniprésent chez les bovins. La cryptosporidiose affecte les bovins à presque tous les stades de leur vie, mais sont les veaux nouveau-nés qui courent le plus de risques (De Graaf et al., 1999 et Naciri et al., 1999). Selon plusieurs études, le parasite *Cryptosporidium* spp. est considéré comme le principal agent entéropathogène responsable de la diarrhée néonatale, avec un taux de morbidité et de mortalité élevé chez les veaux de moins de 3 semaines, y compris les nouveau-nés. (Joachim et Dausgschies, 2004, Radostits, 2001, Naciri et al., 1999, De la Fuente et al., 1998 et Moore et Zeman, 1991).

Certaines observations suggèrent que les veaux pourraient être exposés aux oocystes de *Cryptosporidium* spp. au début de leur vie, même juste après la naissance, sachant que pendant la période du vêlage les vaches adultes augmentent de manière

significative, l'excrétion d'oocystes dans les selles (Naciri et al., 1999 et Fauber et Litvinsky 2000).

Une fois que le parasite a pénétré dans l'organisme de l'animal, il atteint l'intestin et adhère aux cellules intestinales, ce qui provoque des altérations morphologiques et fonctionnelles de la muqueuse épithéliale intestinale, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale accompagnée d'un transit rapide, ce qui déclenche une vaste symptomatologie gastro-intestinale, dont la caractéristique principale est la diarrhée, généralement aqueuse, abondante et sans mucus ni sang, les animaux perdent de grandes quantités d'eau, d'électrolytes, de minéraux et d'autres nutriments essentiels pour un développement optimal menant à la déshydratation qui, en fonction de la pathogénicité et du statut immunitaire du veau, peuvent être graves, voire mortelles (Fayer et Ungar, 1986, Fayer et al, 1990, Fayer et al., 1998).

La déshydratation causée par la diarrhée sévère, entraîne une détérioration de l'état général des animaux infestés, de la fatigue et, dans certains cas, une prostration, ce qui affaiblit le système immunitaire et augmente le risque d'infections par des agents pathogènes concomitants. Dans les cas plus graves, la mort du veau peut survenir. Il est également très courant, que les animaux souffrent de douleurs abdominales, de perte d'appétit (dans certains cas d'anorexie), de perte de poids, diminution de la conversion alimentaire et malnutrition, ce qui retardera sa croissance (Fayer et al., 1990, Zanaro et Garbossa, 2008).

La pathogénicité, l'antigénicité et la sensibilité ou la résistance à différents médicaments peuvent être influencés par la variabilité génotypique au sein des souches de *Cryptosporidium* spp. ainsi que, par des facteurs spécifiques au parasite, à l'hôte et à l'environnement où ils se produisent (Thompson et Lymbere, 1996, Fayer et al., 1998, Pozio et al., 1992 et Baillargeon, 2004). La gravité, la durée des symptômes cliniques et l'évolution de la maladie dépendent également de nombreux facteurs, tels que l'accès insuffisant des nouveau-nés au colostrum et l'exposition à d'autres microorganismes pathogènes. Les animaux affectés qui survivent développent une immunité protectrice, mais peuvent montrer une réduction durable de la productivité, bien que peu d'études soutiennent cette théorie (Daugshies, 2011).

La présentation asymptomatique de la cryptosporidose (principalement chez les veaux âgés de plus de 3 mois et chez les adultes) affecte directement la rentabilité des exploitations d'élevage. Ces animaux présentent une diminution de la consommation de la nourriture, qui se traduit par une nutrition insuffisante, une diminution de la conversion alimentaire, une faible prise de poids, un retard de croissance dû à une altération du métabolisme des minéraux et des problèmes de reproduction tels que le retard de développement du système reproducteur et diminution du pourcentage de grossesses (Baillargeon, 2004, Cacciò et Widmer, 2014).

### **2.7.2 Signes cliniques chez les humains**

Reconnu comme une des causes de maladie diarrhéique (initialement chez les animaux -Tyzzer et al., 1907-) et plus tard chez l'homme (Nime et al., 1976), d'évolution grave et potentiellement fatale.

Lors de l'épidémie de *Cryptosporidium* spp. à Milwaukee en 1993, la population en général et les organismes gouvernementaux ont pris conscience de l'importance clinique de la cryptosporidose (MacKenzie et al., 1994 et Hunter et Syed, 2001), il avait été estimé que la période d'incubation variait entre 3 et 7 jours et variait selon le groupe de population touché, étant plus courte chez les personnes âgées (5 à 6 jours) par rapport aux enfants (7 jours) et aux adultes (8 jours) (Naumova et al., 2003).

Dans des cas naturels, l'étendue de la période d'incubation varie entre quelques heures à plusieurs jours. Cela peut être dû à différents facteurs, tels que la dose d'oocystes que l'hôte a ingéré, les anomalies dans l'incubation des parasites, l'immunité possible de l'hôte due à des expositions antérieures, les différences phénotypiques parmi les isolats parasitaires ou simplement l'erreur dans l'estimation du temps écoulé entre l'exposition aux oocystes et le début des symptômes (Chappel et al., 2006).

Selon des infections expérimentales à *Cryptosporidium* spp. chez des volontaires humains sains, effectuées par Okhuysen et collaborateurs (1996), Chappel et collaborateurs (2006 et 2011), la période d'incubation moyenne était estimée à 5 à 7 jours, pour les espèces de *Cryptosporidium* les plus répandues chez l'homme (*Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*).

La cryptosporidose peut avoir une présentation asymptomatique (Pettoello-Mantovani et al., 1995, Davies et al., 2009, Hellard et al., 2000, Al-Harhi, 2004, Al-Mekhlafi et al., 2011 et Masarat et al., 2012). Bien qu'on ne sache pas encore pourquoi certaines personnes ne présentent pas les symptômes classiques (diarrhée), il est possible que certaines espèces/génotypes moins communes de *Cryptosporidium* spp. présents chez l'homme soient peu pathogènes et plus répandues qu'on ne le pense (Cacciò et Widmer, 2014). Une autre possibilité serait que, dans le cas de personnes constamment exposées au parasite, telles que celles vivant dans des zones fortement endémiques, elles puissent présenter des symptômes bénins ou être complètement asymptomatiques en raison d'une exposition continue et développement d'une immunité contre le parasite (Esteban et al., 1998).

La présentation clinique et symptomatique de la cryptosporidiose comprend la diarrhée, les douleurs abdominales, les nausées et/ou les vomissements, une fièvre légère, l'anorexie, le malaise, la fatigue, la perte de poids, la déshydratation et dans quelques cas rares des troubles respiratoires (Fayer et Ungar, 1986 et Casemore, 1990). La diarrhée peut être soudaine et généralement aqueuse et abondante et peut parfois contenir du mucus. Les symptômes peuvent durer environ 3 semaines, mais certains patients ont une diarrhée chronique entre 1 et 2 mois. Tout au long de la maladie, les patients éliminent les oocystes dans les matières fécales, même après l'arrêt des symptômes, pendant 7 jours en moyenne (étendue de 1 à 15 jours) (Jokipii et Jokipii, 1986).

Les patients qui présentent un risque élevé de contracter ce parasite et présentant la plus grande sévérité de la maladie (diarrhée sévère, propagation vers des sites extra-intestinaux et dans le pire des cas pouvant entraîner la mort) sont les patients immunodéprimés, tels que les enfants de moins de 5 ans, les personnes âgées, les personnes atteintes de maladies débilitantes graves, les personnes ayant subi une greffe d'organe ou de moelle osseuse, les personnes atteintes de cancer et les personnes atteintes du VIH-SIDA. Chez les patients immunocompétents (en bonne santé), il s'agit d'une gastro-entérite aiguë autolimitante (Cacciò et Widmer, 2014).

Dans les zones où *Cryptosporidium* spp. est endémique, la diarrhée chronique chez les jeunes enfants peut entraîner une malnutrition et une détérioration physique et mentale

affectant leur croissance, leur développement cérébral et leurs fonctions cognitives (Guerrant et al., 1999 et Jex et al., 2011).

Le système immunitaire des personnes âgées est fragile et sa capacité à résister aux facteurs environnementaux stressants est considérablement réduite en raison de divers changements biologiques et physiologiques associés à l'âge. Cela les rend très vulnérables aux agents pathogènes. En présence d'une maladie aiguë, comme dans le cas de la cryptosporidiose, le patient gériatrique présente une anorexie, une perte de poids, une malnutrition, un syndrome d'émaciation et une sarcopénie (Minaglia et al., 2019 et Morley et al., 2017).

Chez les personnes dont le système immunitaire est très affaibli, comme dans le cas des personnes ayant subi une greffe, des personnes en phase terminale de cancer et/ou atteintes du VIH-SIDA, elles contractent une infection grave, persistante et potentiellement mortelle. Les parasites peuvent se répandre dans le tractus gastro-intestinal et envahir d'autres systèmes, tels que les voies respiratoires et hépatobiliaires (Ma et Soave, 1983 et Navin et Juranek, 1984).

On sait peu sur les conséquences à moyen et à long terme de la cryptosporidiose, car l'épithélium intestinal se rétablit généralement après la résolution des symptômes. Cependant, il a été rapporté que, chez certains patients immunocompétents, des symptômes pourraient survenir à moyen terme, tel que fatigue, perte d'appétit, perte de poids, vomissements, douleurs abdominales et diarrhée (Cacciò et al., 2009). Les autres symptômes associés à la cryptosporidiose sont les maux de tête, les douleurs oculaires et les douleurs articulaires (Hunter et al., 2004a).

## **2.8 RISQUES ENVIRONNEMENTAUX**

*Cryptosporidium* spp. représente un risque grave pour les jeunes animaux et pour les humains. Les animaux positifs pour *Cryptosporidium* spp. (symptomatiques et asymptomatiques) excrètent de grandes quantités d'oocystes dans les fèces et c'est important de se rappeler que ces oocystes sont infectieux même peu de temps avant d'être excrétés, ce qui favorise leur pathogénicité (Current et Garcia, 1991). Les élevages sont considérés comme une source importante de contamination du sol et des sources d'eau (Brasseur, 1997 et Mathison et Ditrich, 1999), principalement lorsque les matières fécales



sont épanchées directement dans l'environnement de la ferme sans tenir compte de la contamination de l'environnement, exposant les populations vulnérables avoisinantes à un risque d'infection (Widmer, 1998 et Howe et al., 2002).

Dans les années 90, l'importance de *Cryptosporidium* spp. chez les patients immunodéprimés est reconnue (Soares. 2003), il devient évident que *Cryptosporidium* spp. peut contaminer le sol et les sources d'eau, propageant ainsi des oocystes sporulés infectieux, augmentant le risque d'infection chez les individus sensibles (humains et animaux) (Cacciò et Widmer, 2014).

Les oocystes atteignent le sol soit par l'élimination irresponsable des excréments positifs de *Cryptosporidium* spp. des fermes d'élevage (Widmer, 1998 et Howe et al., 2002). L'eau joue un rôle fondamental dans la répartition des oocystes et dans la propagation de la cryptosporidiose. En temps de pluie, de dégel et d'inondations, l'eau entraîne les oocystes présents dans le sol et les eaux de surface et les achemine vers les rivières et les lacs, entraînant une invasion de sources d'eau y compris l'eau potable, les fossés d'irrigation pour les cultures destinées à la consommation humaine et animale et les eaux récréatives (Brasseur, 1997, Cacciò et Widmer, 2014 et Mathison et Ditrich, 1999).

Le risque environnemental le plus important est la contamination des eaux de surface, la répartition d'oocystes infectieux par l'action de l'eau étant responsable de l'apparition d'épisodes de cryptosporidiose dans les zones de population de faible endémicité et participe, avec d'autres facteurs, au maintien d'un niveau endémique élevé de ce parasite, compte tenu de la résistance des oocystes aux méthodes de désinfection traditionnelles utilisées (Cacciò et Widmer, 2014).

À travers diverses études, les facteurs de risque les plus significatifs sur le plan statistique ont été mis en évidence, notamment : contacts avec des personnes/animaux diarrhéiques (principalement des jeunes enfants et des veaux), voyages dans des pays d'endémie, pratique de sports nautiques (en piscine ou dans des sources naturelles telles que des rivières et des lacs) et consommation d'eau non bouillie, de la crème glacée et des légumes crus (Roy et al., 2004, Hunter et al., 2004a, Lake et al., 2007 et Robertson et al., 2002).

### 2.8.1 Facteurs de risque

Les recherches sur les différentes épidémies de *Cryptosporidium* spp., y compris les cas sporadiques, ont permis de mieux comprendre les facteurs de risque et les sources d'infection (Cacciò et Widmer, 2014).

Les facteurs de risque qui permettent de perpétuer la présence de *Cryptosporidium* spp. dans presque tous les environnements (l'eau, le sol, les cultures, les zones urbaines et les zones agricoles, entre autres) sont très variés. Certains de ces facteurs sont l'urbanisation accélérée, la surpopulation des établissements humains, l'expansion de la pauvreté, les migrations incontrôlées (des humains et des animaux), la facilité et la rapidité des déplacements (voyages nationaux et/ou internationaux), le mouvement grandissant des animaux entre les fermes d'élevage, le manque d'assainissement de l'environnement et le manque de gestion adéquate de l'élimination des déchets animaux et humains. Ces facteurs qui, ajoutés au manque de conscientisation des gouvernements, des établissements de santé et de la population sur l'importance sanitaire, sociale et économique que représente ce parasite, font que *Cryptosporidium* spp. représente une menace sérieuse de portée mondiale, qui ne discrimine pas la population (humaine ni la population animale), la région géographique ou le degré de développement socioculturel (Cacciò et Widmer, 2014). Les techniques de génotypage permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de *Cryptosporidium* spp. dans différents contextes géographiques, saisonniers et socio-économiques (Cacciò et Widmer, 2014).

Parmi les facteurs de risque qui affectent directement les élevages, on peut citer :

#### 2.8.1.1 Âge

L'exposition précoce est le facteur de risque le plus important pour les veaux (Baillargeon, 2004). Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. ont pu être détectés dans les matières fécales des animaux âgés de 2 à 3 jours, ce qui suggère que leur contagion s'est produite juste après la naissance (Xiao et Herb, 1994 et Quilez et al., 1996). Selon certaines études, il a été observé que le fait de laisser les veaux avec leur mère pendant de longues périodes dans les enclos de mise bas pourrait augmenter le risque de transmission du nouveau-né (Quigley et al., 1994 et Mohammed et al., 1999).

### 2.8.1.2 Porteurs asymptomatiques

Le fait que les porteurs asymptomatiques de *Cryptosporidium* spp. constituent une source constante d'élimination des oocystes infectieux à la ferme ne peut être sous-estimé (Quilez et al., 1996). Scott et collaborateurs (1994), utilisant des techniques de flottation (Sheather) et de coloration (Ziehl-Nielsen), ont établi qu'une vache adulte de boucherie pouvait excréter un grand nombre des oocystes dans leurs selles (moyenne de 900 oocystes / gramme / jour) (Scott et al., 1994).

Les vaches adultes augmentent l'excrétion d'oocystes pendant la période de vêlage, augmentant ainsi la population parasitaire qui contaminera plus tard les nouveau-nés (Castro-Hermida et al., 2002), même si ceux-ci ont été séparés de leur mère quelques heures après la naissance. Cela suggère que le contact direct des nouveau-nés avec leur mère et avec leur environnement à la naissance suffit à infecter les veaux (Castro-Hermida et al., 2002, Faubert et Litvinsky, 2000).

Faubert et Litvinsky (2000) ont comparé l'excrétion d'oocystes chez les vaches adultes avant, pendant et après la période de vêlage (125, 500 et 250 oocystes / gr, respectivement), constatant une augmentation significative de l'élimination au cours de la période de vêlage (500 oocystes / gr), ce qui peut être attribué à la réduction de la production de lymphocytes T pendant cette période (Faubert et Litvinsky, 2000).

Nonobstant, des études ultérieures ont contredit ce fait et suggérant qu'il est important de réévaluer les études précédentes, au moyen des techniques moléculaires, pour avoir une idée plus précise de l'augmentation de l'excrétion d'oocystes par les vaches à la période de mise bas, ainsi que pour l'identification génotypique de *Cryptosporidium* spp. (Scott et al., 1994, Scott et al., 1995, Santin et al., 2004 et Baillargeon, 2004).

### 2.8.1.3 Taille du troupeau et logement des troupeaux

La taille du troupeau affecte considérablement la prévalence du parasite dans les élevages (Scott et al., 1995), plus la densité de la population animale est élevée, plus le pourcentage d'excrétion d'oocystes est important (Santin et al., 2004 et Scott et al., 1995).

Le surpeuplement des animaux, principalement des veaux, peut constituer un facteur de risque important pour la propagation du parasite, du fait que chaque individu est une source potentielle d'infection pouvant contaminer les autres (Angus et al., 1990,

Mohammed et al., 1999, Atwill et al., 1999), cependant, il n'y a pas assez de recherche sur ce sujet qui puisse prouver ou réfuter cette hypothèse (Castro-Hermida et al., 2002, Faubert et Lidvinsky, 2001).

#### 2.8.1.4 Condition de salubrité

Considérant que, le moyen le plus efficace de contrôler la charge élevée d'oocystes présents dans les exploitations est la biosécurité, les conditions sanitaires ont une valeur fondamentale pour contrôler la propagation du parasite (Angus et al., 1990, Mohammed et al., 1999, Dauschies, 2011, Sievers et Alocilla, 2007, Almada, 2015 et Valera et Aguilera, 2007).

La mise en œuvre d'un lavage et d'une désinfection stricts (de préférence avec des produits à base de crésol -Valera et Aguilera, 2007, Shahiduzzaman et al., 2010, Dauschies, 2011-) peut réduire considérablement la prévalence des oocystes infectieux présents à la ferme, où les salles d'accouchement et les enclos pour nouveau-nés devraient être la priorité (Maldonado-Camargo et al., 1998). Il est important d'éviter le transport mécanique des oocystes grâce à l'utilisation d'outils utilisés dans des zones contaminées. (Baillargeon, 2004).

Au moment du nettoyage, en utilisant des balais ou des pelles, les oocystes peuvent se propager de manière aérogène et s'accumuler sur les plafonds, les murs, les portes, les fenêtres et les autres structures et équipements présents sur la ferme. Dans les sols en ciment, il est recommandé de laver à l'eau sous pression pour éviter cette propagation (Maldonado-Camargo et al., 1998T et Faubert et Litvinsky).

#### 2.8.1.5 Rongeurs et insectes

Les rongeurs et les insectes (principalement les coprophages) sont un facteur important de propagation de l'infection dans les exploitations et leurs environs, soit comme hôtes, excréant les oocystes dans leurs matières fécales, soit comme vecteurs mécaniques, transportant le parasite sur ses corps ou sur ses pattes (Faubert et Litvinsky, 2000, Mathison et Ditrich, 1999 et Graczyk et al., 1999T).

## 2.9 ASPECT ZOONOTIQUE

*Cryptosporidium* spp. est un parasite zoonotique à haut risque, non seulement pour les animaux d'élevage (principalement les bovins), mais également pour la population humaine, en raison de la mortalité élevée qui peut survenir principalement chez les personnes dont le système immunitaire est déprimé, comme les enfants, les personnes âgées et les personnes avec atteintes de maladies graves et/ou débilitantes (VIH-SIDA et cancer) (Chen et al., 2002, MacKenzie et al., 1994, et Cacciò et Widmer 2014); cependant, plusieurs études menées dans le monde entier ont montré que *Cryptosporidium* spp. pouvait toucher n'importe qui, quel que soit son statut immunitaire. Il a été constaté que les personnes immunocompétentes souffraient de diarrhée aiguë, de vomissements, de fièvre et de douleurs abdominales (Current et al., 1985, et DuPont et al., 1995).

Sachant que, les bovins sont considérés comme la principale source d'infection chez l'homme (Robertson et al., 2010, Gormley et al., 2011 et Pumipuntu et piratae, 2018), les personnes qui présentent le plus grand risque d'infection sont celles qui restent en contact permanent avec eux et leurs matières fécales, que contiennent généralement un grand nombre d'oocystes infectieux, c'est le cas des ouvriers responsables des soins des animaux des fermes bovines, ainsi que des vétérinaires et des producteurs (Fayer et Ungar 1986, Pohjola et al. 1986, Gait et al., 2008, Jex et Gasser, 2010 et Grinberg et al. 2011). Ces oocystes contaminent les installations, ainsi que l'outillage, les instruments et d'autres éléments utilisés dans l'élevage (Cacciò et Widmer 2014).

## 2.10 PRÉVALENCE

Le parasite *Cryptosporidium* spp. a une distribution cosmopolite et son épidémiologie est complexe en raison de ses multiples voies de transmission (Cacciò et Widmer, 2014). *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium hominis* (indiscernables morphologiquement) ont été trouvés chez plus de 152 espèces de mammifères, y compris l'homme (Fayer et al. 2000). Près de 60% des rivières et des lacs au l'Amérique du Nord sont contaminés avec les oocystes de ces parasites. Des études épidémiologiques ont montré la présence des différentes d'espèces de *Cryptosporidium* dans un certain nombre de sources d'eau potable et récréative. (LeChevallier et Norton. 1995).

### 2.10.1 Prévalence chez les bovins

*Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium andersoni*, sont les espèces les plus fréquentes chez les bovins dans le monde, signalées dans plus de 95 pays, y compris au Canada (Budu-Amoako et al., 2012a et Robertson et al., 2014).

La prévalence de *Cryptosporidium* spp. dans les troupeaux laitiers canadiens est estimée entre 55 et 100% (Gison et al., 1997b, Budu-Amoako et al., 2012a), et varie d'une province à l'autre (Baillargeon, 2004), où la prévalence de *Cryptosporidium parvum* dans les fermes laitières du Québec est de 88,7% (Ruest et al., 1998).

Une proportion importante de veaux (44%) âgés de 3 à 4 jours a été rapportée excrétaant de grandes quantités d'oocystes dans leurs matières fécales (Mohammed et al., 1999, Snodgrass et al., 1980 et Xiao et Herd, 1994), ce qui est apparemment lié à l'augmentation considérable de l'excrétion d'oocystes par les vaches adultes pendant la période de mise bas (Faubert et Litvinsky, 2000).

En 1997 une étude canadienne à partir d'échantillons prélevés sur 15 sites différents, a montré que 20% des veaux de plus de 3 jours excrétaient des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans leurs fèces (Olson et al., 1997b).

D'autres rapports sur la prévalence de *Cryptosporidium* spp. dans des fermes situées au Canada avaient des résultats très similaires parmi eux, au Québec (88% sur 505 fermes laitières) (Ruest et al., 1998), en Colombie-Britannique, au Canada (59% sur 386 laitiers dans 20 fermes) (Olson et al., 1997a) et dans l'Ontario du Sud-Ouest (40,6% des 500 laitiers dans 51 fermes) (Trotz-Williams et al., 2005).

Dans le tableau 4, plusieurs cas rapportés dans le monde sont décrits.

**Tableau 4.** Prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les bovins (laitières et/ou boucherie). Cacciò et Widmer, 2014.

EMPLACEMENT	ÂGE	N° D'ANIMAUX/FERME OU EMBLEMMENT	PRÉVALENCE	MÉTHODE DE DIAGNOSTIC*	IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE/ ESPÈCES OU GÉNOTYPE (% ÉTUDIÉ)	RÉFÉRENCE
Angleterre et pays de Galles	<u>Prewriteaned</u> Immature Adulte	116/troupeaux liés à la cryptosporidiose humaine	81% 58% 19%	M	18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (77%) <i>C. bovis</i> (5%) <i>C. andersoni</i> (16%) Sans identification (2%)	Smith et al. 2010
Angleterre et pays de Galles	≤ 3 mois	229 veaux laitiers et de boucherie/Laboratoire de diagnostic	45%	M	18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (91%) <i>C. bovis</i> (2%) Sans identification (7%)	Featherstone et al. 2010a
Australie, NSW	Veaux	196/20 troupeaux	74%	Mo	18s rRNA and GP60/ <i>C. parvum</i> (59%) <i>C. bovis</i> (20%) <i>C. ryanae</i> (10%) Sans identification (1%)	Ng et al. 2012
Brésil	≤30 jours	196/troupeaux laitiers	11%	Mo	18s rRNA and GP60/ <i>C. parvum</i> (33%) <i>C. bovis</i> (5%) <i>C. ryanae</i> (10%) <i>C. andersoni</i> (10%) Sans identification (42%)	Meireles et al. 2011
Canada	>3 jours	104 bétails/15 emplacements géographiques canadiens	20%	M, O	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Olson et al. 1997
Canada - Québec	Veaux	5 veaux de chacune des 505 fermes laitières	88,7%	O (coloration de Ziehl-Nielsen)	<i>C. parvum</i>	Ruest et al. 1998
Canada	Colostrum	98/21 fermes laitières 138/21 fermes laitières	27,6% 2,17%	M, E, O (IF)	<i>C. parvum</i>	Baillargeon, 2004
Canada	<2 mois 2-6 mois >6 mois	752/20 troupeaux laitiers	17% 14% 15%	M	18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (5%) <i>C. bovis</i> (51%) <i>C. ryanae</i> (17%) <i>C. andersoni</i> (27%)	Budu-Amoako et al. 2012a
Canada	≤6 mois >6 mois	739/20 troupeaux de bœuf	18% 15%	M	18s rRNA et HSP70/ <i>C. parvum</i> (24%) <i>C. bovis</i> (20%) <i>C. ryanae</i> (7%) <i>C. andersoni</i> (49%)	Budu-Amoako et al. 2012b
Chine	0-8 semaines	801/8 troupeaux	21%	M	18s rRNA et GP60/ <i>C. parvum</i> (31%) <i>C. bovis</i> (38%) <i>C. ryanae</i> (11%)	Wang et al. 2011b

\* (M) Microscopie, (E) ELISA, (Mo) Moléculaire, (O) Other.

						<i>C. andersoni</i> (7%) Infections mixtes (12%)	
Chine	0->48 mois	2.056/14 troupeaux laitiers	19%	M		18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (48%) <i>C. bovis</i> (16%) <i>C. andersoni</i> (29%) <i>C. hominis</i> (6%) <i>C. serpentis</i> (1%)	Chen et Huang, 2012
Égypte	<6 semaines	96/2 troupeaux laitiers	30%	M		18s rRNA et COWP/ <i>C. parvum</i> (93%) <i>C. andersoni</i> (7%)	Amer et al. 2010
Égypte	1 jour – 3 mois >3 mois – 1 an >1 – 2 ans >2 ans	593	30% 13% 13% 5%	O		18s rRNA et GP60/ <i>C. parvum</i> (65%) <i>C. bovis</i> (4%) <i>C. ryanae</i> (14%) Infections mixtes (17%)	Helmy et al. 2013
Espagne	3-4 jours 6-15 jours	30 fermes laitières et de boucherie	44,4% 76,7%	M		<i>C. parvum</i>	Quilez et al. 1996
Espagne	≤21 jours	61 diarrhéiques/27 troupeaux	49%	M		18s rRNA et GP60/ <i>C. parvum</i> (100%)	Diaz et al. 2010a
Espagne	Néonatal Génisse Vaches	649/non précisée	61% 15% 8%	M		18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (56%) <i>C. andersoni</i> (23%) Sans identification (21%)	Castro-Hermida et al. 2011a
France	4 – 21 jours Veaux diarrhéiques	440/189 fermes bovines	55,6% 43,4%	E		<i>C. parvum</i>	Lefay et al. 2000
Hongrie	Veaux	79 diarrhéiques/52 troupeaux	49%	M		18s rRNA et GP60/ <i>C. parvum</i> (95%) <i>C. ryanae</i> (5%)	Plutzer and Karanis, 2007
Inde	0 – 2 mois 3 – 12 mois >12 mois	180/2 troupeaux laitiers	20% 14% 4%	M		18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (29%) <i>C. bovis</i> (38%) <i>C. ryanae</i> (14%) <i>C. andersoni</i> (14%) <i>C. suis</i> -like (5%)	Khan et al. 2010
Inde	<3 mois	461/divers	16%	M		18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (100%)	Maurya et al. 2013
Iran	1 – 20 semaines	272/15 troupeaux laitiers	19%	M		18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (73%) <i>C. bovis</i> (8%) <i>C. andersoni</i> (18%) Souches atypiques (2%)	Keshavarz et al. 2009

\* (M) Microscopie, (E) ELISA, (Mo) Moléculaire, (O) Other.



Italie	0 jours – < 12 mois	2.024/248 troupeaux laitiers et de boucherie	8%	E, M	COWP et GP60/ <i>C. parvum</i> (100%)	Duranti et al. 2009
Japon	3 – 48 jours	80 diarrhéiques/ différents troupeaux	75%	Mo	18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (53%) <i>C. bovis</i> (2%) Sans identification (45%)	Karanis et al. 2010
Malaisie	1 jour – ≤ 4,5 mois > 4,5 – 12 mois	250/16 troupeaux	31% 23%	Mo	18s rRNA et GP60/ <i>C. parvum</i> (17%) <i>C. bovis</i> (25%) <i>C. ryanae</i> (15%) <i>C. andersoni</i> (20%) Infections mixtes (6%) Sans identification (17%)	Muhid et al. 2011
Nigéria	2 – 365 jours	194/20 troupeaux	16%	Mo	18s rRNA/ <i>C. bovis</i> (45%) <i>C. ryanae</i> (26%) <i>C. andersoni</i> (16%) Infections mixtes (13%)	Maikai et al. 2011
Northern Ireland	< 1 mois	779 diarrhéiques/ Laboratoire de diagnostic	37%	M	18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (95%) <i>C. bovis</i> (4%) <i>C. ryanae</i> (1%)	Thompson et al. 2007
Roumanie	1 – 30 jours	258 diarrhéiques/9 troupeaux laitiers	25%	M	18s rRNA et GP60/ <i>C. parvum</i> (100%)	Imre et al. 2011
Suède	≤ 2 mois 4 – 12 mois Vaches	1.202/50 troupeaux laitiers	52% 29% 6%	M	18s rRNA et GP60/ <i>C. parvum</i> (14%) <i>C. bovis</i> (75%) <i>C. ryanae</i> (9%) <i>C. andersoni</i> (2%)	Silverlås et al. 2009b, Silverlås et al. 2010b
USA 7 États	5 jours – 2 mois 3 – 11 mois	971/15 troupeaux laitiers	50% 20%	M	18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (50%) <i>C. bovis</i> (28%) <i>C. ryanae</i> (16%) <i>C. andersoni</i> (6%)	Santín et al. 2004
USA 7 États	12 – 24 mois	571/14 troupeaux laitiers	12%	Mo	18s rRNA/ <i>C. parvum</i> (6%) <i>C. bovis</i> (35%) <i>C. ryanae</i> (15%) <i>C. andersoni</i> (43%) <i>C. suis</i> (1%)	Fayer et al. 2006
USA 20 États	6 – 18 mois	819/49 troupeaux de boucherie	20%	Mo	18s rRNA/ <i>C. bovis</i> (23%) <i>C. ryanae</i> (9%) <i>C. andersoni</i> (68%)	Fayer et al. 2010

\* (M) Microscopie, (E) ELISA, (Mo) Moleculaire, (O) Other.

### 2.10.2 Prévalence chez les humains

Selon la séroprévalence (présence d'IgG anti-cryptosporidiens), le 80% des Nord-Américains auraient été infectés par *Cryptosporidium parvum* (Weir, 2001) et le 90% dans les pays en voie de développement (Samaille, 1996), sans prendre en considération des cas non diagnostiqués (Soares. 2003).

Après de plusieurs études coprologiques effectuées chez les humains, le taux d'infection était estimé entre 2,2 et 24% (Tableau 5), où l'infection est plus importante chez les individus immunodéprimés et/ou dans les pays avec mauvaises conditions sanitaires comme aussi avec le contact très proche avec les animaux, comme le case des quelque tribus Africaines qui dors avec leurs troupeaux (Guerrant, 1997 et Soares. 2003).

**Tableau 5.** Prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les humaines en fonction de sa condition immunitaire et de la classification du pays. Guerrant, 1997.

CONDITION IMMUNITAIRE	CLASSIFICATION DU PAYS	PORTEUR SYMPTOMATIQUE	PORTEUR ASYMPTOMATIQUE
<b>Immunocompétents</b>	Pays industrialisés	2,2% (0,26-22%)	0,2% (0-2,4%)
	Pays en voie de développement	6,1% (1,4-40,9%)	1,5% (0-7,5%)
<b>Malades VIH-SIDA</b>	Pays industrialisés	14% (6-70%)	0% (0-0%)
	Pays en voie de développement	24% (8,7-48%)	5% (4,9-5,3%)

Une étude faite par Patel et ses collaborateurs (1998), en utilisant la technique polymorphisme à locus unique (single-locus polymorphism) pour caractériser les génotypes de *Cryptosporidium* spp. trouvées dans une population spécifique d'humains et de bovins. Ils ont montré que les humains présentent principalement le type H (humain) (actuellement *Cryptosporidium hominis* -Morgan et al. 1998 et Morgan et al. 1996-), mais peuvent avoir aussi une infection mixte avec le type H (humain) et le type C (bovin), tandis que chez les bovins, le type C (bovin) est le plus courant sans aucune présence du type H (humain) (Patel et al. 1998).

L'application de techniques de génotypage dans des études épidémiologiques a montré que la majorité des cas de cryptosporidiose chez l'homme (> 90%) est due à *Cryptosporidium hominis* et à *Cryptosporidium parvum* (Xiao, 2010); cependant, d'autres

espèces de *Cryptosporidium* ont également été découvertes, mais avec une prévalence plus faible, tel que *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium canis*, *Cryptosporidium felis*, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Cryptosporidium viatorum* et d'autres génotypes qui n'ont pas encore de statut taxonomique (Cacciò et Widmer, 2014, Putignani et Menichella, 2010 et Morgan et al., 2000D).

## 2.11 MÉTHODES DE DIAGNOSTIC

Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont parmi les plus petits du phylum Apicomplexa et manquent de particularités morphologiques pour identifier précisément leurs espèces, donc, c'est clair que sa morphologie seule ne permet pas sa différenciation (Fall et al. 2003).

Les techniques de diagnostic utilisées pour identifier *Cryptosporidium* spp. sont de type confirmatoire; puisque son principal objectif est déterminer la présence ou l'absence du parasite. Car la diarrhée est la manifestation clinique caractéristique de la cryptosporidose, il est connu que ce parasite n'est pas le seul agent pathogène responsable de sa production (complexe diarrhéique néonatal chez les veaux), par conséquent, il est nécessaire d'utiliser des techniques de diagnostic de laboratoire précises pour identifier pleinement sa présence en tant qu'agent causal de la maladie (Fayer et Ungar, 1986).

En général, après la découverte de *Cryptosporidium* spp., diverses techniques de diagnostic seront utilisées pour les identifier. Des efforts croissants sont faits pour accroître la spécificité, la sensibilité, la valeur prédictive et la précision des nouveaux tests, afin de fournir un diagnostic plus fiable aux producteurs. Dans les années 70, le diagnostic de *Cryptosporidium* spp. n'était possible que par la détection du parasite par l'histopathologie du tissu intestinal de l'animal atteint (Current et al, 1983). Dans les années 80, après des progrès dans la connaissance de la biologie du parasite et le développement de différentes techniques de diagnostic, il est possible de détecter sa présence dans les matières fécales d'individus malades (Fayer et al, 1990, et Barriga, 2002). Déjà dans les années 90, la première PCR avait été mise au point pour le diagnostic de *Cryptosporidium* spp. à partir de fèces ; depuis lors, plusieurs techniques de PCR ont été développées pour la détection des oocystes, à la fois à partir d'échantillons cliniques humains et animaux et d'échantillons environnementaux (Fayer et Xiao, 2008).

Actuellement, il existe différentes techniques pour le diagnostic du *Cryptosporidium* spp., celles-ci peuvent varier en termes de sensibilité, spécificité, disponibilité, simplicité et coûts, offrant ainsi aux producteurs un large éventail de solutions de remplacement en fonction de leurs besoins et leurs capacités (Dauguschies, 2011, Cacciò et Widmer, 2014). Aujourd'hui, les techniques les plus couramment utilisées peuvent être regroupées en quatre catégories : i) Méthodes de purification et de concentration, ii) Méthodes de coloration, iii) Méthodes immunologiques et iv) Méthodes en utilisant la biologie moléculaire (Zanaro et Garbossa, 2008 et Baillergeon, 2004 Daugschies, 2011).

### **2.11.1 Méthodes de purification et de concentration**

Les techniques de concentration par flottation les plus communément utilisées sont celles qui utilisent des solutions saturées de sucre (Sheather), de sel (NaCl - gr. sp. 1,27) et de sulfate de zinc (ZnSO<sub>4</sub> - gr. sp. 1,18 ou 1,2) (Current et Garcia, 1991). Les techniques de concentration par sédimentation, les plus souvent utilisées sont, sédimentation dans Formaline-Éther (FE) et dans formaline-acétate d'éthyl (FAE) (Current et Garcia, 1991). La sensibilité de ces techniques varie, de sorte que lorsque la charge parasitaire présente dans les fèces est faible, la sensibilité du test est affectée. Cependant, elles constituent actuellement les techniques de diagnostic les plus courantes, en raison de leurs bas coûts, de leurs résultats rapides, de leur disponibilité et de leur facilité d'accès (Zanaro et Garbossa, 2008 et Baillergeon, 2004).

### **2.11.2 Méthodes de coloration**

En raison de la difficulté d'identifier les oocystes de *Cryptosporidium* spp. au microscope à l'aide des techniques de base, il est nécessaire de mettre en œuvre des mesures offrant une meilleure distinction ; par conséquent, les techniques de coloration ont été incluses au diagnostic. Généralement, les méthodes de coloration différentielles sont appliquées en fonction des propriétés de coloration alcool-acide résistante de la membrane des oocystes, parmi ces techniques figurent la méthode de coloration par la chaleur (Ziehl-Nielsen modifiée) et la méthode froide (Kingoun) (Zanaro et Garbossa, 2008, Daugschies, 2011, Atías, 1998, Barriga, 2002 et Neira et al., 2013). En comparant la sensibilité et la

spécificité de ces deux techniques, aucune différence majeure n'est observée (Baillargeon, 2004,).

L'utilisation de colorants fluorogènes tels que la rhodamine et l'auramine (l'auramine-rhodamine, l'auramine-carbol-fushin et l'acridine orange (Casemore, 1985, Heine, 1982. et Zanaro et Garbossa, 2008) facilitent la détection des oocystes au microscope (Daugochies, 2011D). Pour la technique de coloration négative de Heine, il est recommandé d'utiliser des selles fraîches ou, à défaut, des conserver dans la formaline 10%, mais la sensibilité de la technique peut être affectée (Heine, 1982 et Current et al, 1990).

Toutes ces techniques de coloration nécessitent beaucoup de travail et de temps pour être exécutées et pour obtenir les résultats. En outre, leur sensibilité et leur spécificité sont variées, car elles dépendent de la consistance des matières fécales (plus les matières fécales sont liquides, plus facile d'identifier les oocystes), la qualité de l'échantillon, le temps écoulé entre la collecte et le développement de l'analyse et du mode de conservation et finalement, l'expertise du personnel du laboratoire qui traitera l'échantillon est également très importante (Fayer et al., 2000, Hanscheid et al., 2008 et Baillargeon, 2004T).

### **2.11.3 Méthodes immunologiques**

Plusieurs techniques immunologiques ont été développées, telles que l'agglutination de particules de latex ou l'hémagglutination passive inversée (Reverse Passive Hemagglutination Assay), ainsi que l'utilisation d'anticorps monoclonaux et polyclonaux marqués avec des substances fluorescentes (Fayer et al., 2000, Garcia et al., 1987). Dans la plupart des cas, ils constituent un bon outil pour détecter les oocystes, même lorsque la charge parasitaire est faible dans les échantillons, avec sensibilité et spécificité élevées; toutefois, ces techniques dépendent directement de facteurs tels que la qualité et la consistance du prélèvement, ainsi que de la méthode de concentration préliminaire (Garcia et al., 1987). De plus, elles peuvent présenter des réactions croisées avec d'autres micro-organismes (Fayer et al., 2000, Baillargeon, 2004 et Daugochies, 2011). Dans le cas de l'utilisation de cette technique pour le diagnostic de *Cryptosporidium* spp. dans des échantillons humains, il est nécessaire de prendre en compte le fait que les lipides présents

dans leurs selles réduisent la sensibilité de la technique (Weber et al., 1992, Weber et al., 1991).

La technique immunologique de capture d'antigène (ELISA), repose fondamentalement sur la détection des antigènes des oocystes de *Cryptosporidium* spp. (Siddons et al., 1992). Actuellement, plusieurs laboratoires produisent et commercialisent différents types de trousse permettant d'effectuer le test ELISA rapidement et facilement, permettant ainsi d'établir un diagnostic de confirmation de la présence du parasite (Aarnaes et al., 1994, Newman et al., 1993 et Aznaro et Garbossa, 2008), avec une sensibilité et une spécificité qui oscille entre 66,3% et 83,3% (Newman et al., 1993). Cependant, de même que les techniques de coloration et que les autres techniques immunologiques, la sensibilité et la spécificité dépendent de la qualité et de la consistance de l'échantillon, ainsi que des outils diagnostiques offerts par les laboratoires. Il est également nécessaire de prendre en compte, que dans les grands troupeaux, le coût de cette technique peut être très élevé (Zanaro et Garbossa, 2008).

#### **2.11.4 Méthodes en utilisant la biologie moléculaire**

L'apparition des nouvelles techniques de biologie moléculaire a facilité la détection et le diagnostic de *Cryptosporidium* spp. L'application des méthodes de génotypage basée sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) a révélé la présence persistante du parasite chez les animaux, en particulier dans les plus jeunes animaux et l'importance de la transmission zoonotique (Cacciò et Widmer, 2014).

Actuellement, l'utilisation de la technique PCR est la méthode la plus appropriée pour le diagnostic de *Cryptosporidium* spp., chez les individus avec de présentation symptomatique ou asymptomatique de la maladie et dans des échantillons prélevés dans l'environnement ou très dilués, par exemple dans l'eau (Hallier-Soulier et Guillot, 1999), car elle est très sensible à la détection d'une très faible quantité d'oocystes présents dans le prélèvement; permettant ainsi non seulement de confirmer ou d'exclure la présence du parasite, mais également de fournir des données importantes sur la variabilité génétique, telles que l'espèce, le génotype et les sous-génotypes (Dauguschies, 2011).

Les techniques de coprologie classiques ne fournissent pas un pourcentage élevé de sensibilité ni de spécificité pour confirmer, sans possibilité d'erreur, la présence ou

l'absence du parasite (faux positifs et faux négatifs). En effet, *Cryptosporidium* spp. ne présente pas des signes pathognomoniques qui le différencient des autres agents entéropathogènes puisque le signe clinique principal est une diarrhée non hémorragique. Il provoque une excrétion élevée d'oocystes dans les matières fécales (Cordero del Campillo et al., 1990, Santín et al., 2004TD, Fayer et Xiao, 2008, Del Coco et al., 2009, Cacciò et Widmer, 2014, Botero et Restrepo, 2003 et Neira et al., 2013). De plus, en raison de sa taille microscopique, *Cryptosporidium* spp. nécessite la mise en œuvre de techniques de diagnostic facilitant son identification. De plus, la pathogénicité de *Cryptosporidium* spp. variant considérablement en fonction du génotype et du sous-génotype (entre autres facteurs), c'est pour cela qu'il est nécessaire d'identifier avec précision le parasite responsable de la maladie. Pour cette raison, les techniques moléculaires sont idéales pour le diagnostic et le suivi épidémiologique des foyers de maladies, en connaissant l'agent causal de manière précise (Cordero del Campillo et al., 1999, Cacciò et Widmer, 2014).

Plusieurs techniques basées sur l'utilisation de la PCR ont été décrites pour le diagnostic de la cryptosporidose, notamment la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel, la "Nested-PCR", ciblant le gène "18S rRNA" (SSU – Small-Subunit Ribosomal RNA gene 40S), qui compte au moins 20 copies pour le parasite *Cryptosporidium* spp. et possède à la fois des régions conservées et des régions hypervariables. Ce gène présente une homogénéité de 99% entre les différentes espèces du parasite (Xiao, 2010). Et le gène "Gp60" (gène de la glycoprotéine de 60 KDa) (Nichols et al., 2003 et Iqbal et al., 2012), ce gène, le GP60 permet une large identification de *Cryptosporidium* spp., y compris des génotypes et des sous-génotypes, et c'est largement utilisé parce qu'il contient plusieurs régions, présentant des taux de mutation élevés, notamment une région microsatellite hypervariable. Une autre technique basée sur la PCR est la "Neste-PCR-RFLP (Nested-PCR-restriction fragment length polymorphism)", utilisée pour détecter des faibles densités d'oocystes dans des échantillons, son utilisation est recommandée, entre autres, pour l'identification d'oocystes dans l'eau (Nichols et al., 2003). Le succès de la technique PCR est fortement lié à la concentration des oocystes présents dans l'échantillon, ainsi qu'à la technique utilisée pour l'extraction et la purification de l'ADN, ces étapes sont nécessaires pour éliminer les inhibiteurs (Di Pinto et Tantillo, 2002)

Les méthodes de diagnostic moléculaire constituent sans aucun doute la technique du laboratoire la plus utile pour le diagnostic précis de *Cryptosporidium* spp. Cependant, les inconvénients qu'elle présente sont le long temps nécessaire pour obtenir des résultats, de plus, des procédures minutieuses sont nécessaires pour l'extraction de l'ADN, ainsi que des contrôles internes adéquats; de même, les inhibiteurs enzymatiques devraient être éliminés des échantillons, parce qu'ils réduisent l'activité de la polymérase Taq ainsi que les limites de détection, et finalement, les coûts élevés de ces techniques ne sont pas toujours justifiés pour le diagnostic de routine dans les exploitations commerciales (Dauguschies, 2011, Di Pinto et Tantillo, 2002 Zanaro et Garbossa, 2008).

## 2.12 TRAITEMENT ET CONTRÔLE

La diarrhée est la principale cause de décès dans le monde. *Cryptosporidium* spp. est considéré comme la principale cause de diarrhée au niveau mondial, son contrôle et son traitement reposent principalement, sur la prévention et la gestion des symptômes, car les médicaments et les vaccins qui sont destinés pour éliminer le parasite ne semblent pas être très efficaces et une surveillance étroite est nécessaire de la part des éleveurs et de la population en général pour empêcher la propagation et la perpétuation du parasite dans l'environnement (Cacciò et Widmer, 2014).

La recherche fondamentale a généré une grande quantité d'informations sur de nombreux aspects de la biologie de *Cryptosporidium* spp., mais ces connaissances n'ont pas eu d'impact décisif sur les progrès réalisés dans la production de vaccins, de médicaments ou de désinfectants efficaces (Cacciò et Widmer, 2014).

À l'heure actuelle, il n'existe aucun agent totalement efficace pour l'élimination du *Cryptosporidium* spp. malgré les efforts considérables (Dauguschies, 2011 et Chen et al., 2002). Certaines mesures que les producteurs et les vétérinaires peuvent mettre en œuvre pour réduire un peu la gravité de la maladie, ainsi que le nombre d'oocystes présents dans les zones de risque accru, sont les suivantes: i) la stimulation du système immunitaire par l'exposition précoce aux antigènes des nouveau-nés, afin de les aider à faire face à la gravité de la maladie à son point le plus critique et ii) à la mise en œuvre stricte de mesures de biosécurité, telles que le nettoyage et la désinfection des installations de la ferme, où les



enclos destinés aux vaches, ainsi que les enclos des nouveau-nés devraient être la priorité (Daugochies, 2011D).

Désinfectants chimiques à base de crésol ( $C_7H_8O$ ) (disponibles dans le commerce dans plusieurs pays du monde, y compris le Canada), auquel est composé organique appartenant au groupe des méthylphénols contenant 3 formes isomères différentes : le crésol (Ortho) (CNESST), le Crésol (Para-) (CNESST) et le Crésol (Meta-) (CNESST), qui peuvent inactiver les oocystes (Shahiduzzaman et al., 2010). Cependant, plusieurs troupeaux conventionnels n'ont pas rapporté des résultats efficaces suite à l'utilisation de ces produits, probablement en raison du niveau élevé de contamination attribué au grand nombre d'oocystes que les animaux porteurs du parasite excrètent dans leurs matières fécales (animaux malades et en bonne santé) (Zanaro et Garbossa, 2008). Considérant que la dose infectante de *Cryptosporidium* spp. est très basse et que la période d'incubation est relativement courte, l'élimination du parasite par l'utilisation de produits chimiques ne donne pas de résultats totalement satisfaisants, principalement dans les exploitations où la prévalence est élevée (Keidel, 2004).

Parmi les médicaments commercialisés dans le monde pour le traitement de la cryptosporidiose bovine, le lactate d'halofuginone, est l'un d'entre eux (Halocur®, du laboratoire Intervet®) il est un antiprotozoaire, dérivé du groupe des quinazolinones (polyhétérocycliques comportant de l'azote) et doit être administrés aux veaux au cours de la première semaine de vie pour obtenir un contrôle métaphylactique. Toutefois, selon diverses études sur le terrain, ils indiquent que l'utilisation de ce médicament ne produit pas l'élimination totale du parasite et que les veaux peuvent présenter les symptômes de la maladie, principalement la diarrhée (Keidel 2004 et Baillargeon, 2004).

Il est probable que la localisation intracellulaire du parasite dans l'hôte, lui offre la protection nécessaire pour survivre à l'attaque des différents médicaments anticoccidiens traditionnels. Aussi que, les caractéristiques particulières de la paroi épaisse des oocystes présents dans l'environnement, lui permettant de survivre à l'action des désinfectants couramment utilisés (Zanaro et Garbossa, 2008, 45T, Neira et al., 2013).

Nonobstant, il est intéressant de noter que l'utilisation combinée d'halofuginone lactate chez les animaux et la désinfection des enclos avec le crésol, peuvent avoir des effets acceptables sur le contrôle du parasite pendant la période de risque le plus élevé chez

les veaux (les premières deux semaines de vie). Cependant, dans certains cas, quand les veaux ont fini ce traitement (médicamenteux avec de l'halofuginone et désinfection d'enclos avec du crésol) ils avaient une plus grande sensibilité au parasite, que ceux n'ayant reçu aucun traitement et ayant contracté la maladie; suggérant qu'une exposition précoce au *Cryptosporidium* spp., pourrait aider au développement d'une certaine immunité, ce qu'expliquerait pourquoi la maladie est considérée comme moins sévère près les 3 premières semaines de vie du veau et même à l'âge adulte (Dauguschies, 2011).

En l'absence de médicaments curatifs efficaces contre la cryptosporidose, le traitement palliatif est le seul qui puisse être mis en œuvre chez les animaux malades pour tenter de lutter contre la maladie. La thérapie liquidienne est essentielle (réhydratation avec remplacement de l'électrolyte), de même que l'application des médicaments pour traiter les maladies concomitantes que peuvent avoir aux animaux, ce qui peut aggraver le tableau clinique et augmentant le pourcentage de mortalité (Zanaro et Garbossa, 2008 et Cacciò et Widmer, 2014).

Des enquêtes sur l'efficacité de l'immunité passive des veaux grâce à l'utilisation de colostrum ont révélé que celle-ci ne semble pas offrir une protection statistiquement significative aux nouveau-nés en ce qui concerne les manifestations cliniques de la maladie ou le taux de morbidité (Fayer et al., 1989).

Après la découverte de *Cryptosporidium* spp. et la prise de conscience de ce que ce parasite représente pour la santé publique et la production animale, la recherche des solutions efficaces et durables au contrôle de l'infection est devenue un véritable défi. Après des décennies de recherche sur l'utilisation de médicaments capables de contrôler à la fois la présence du parasite et ses manifestations cliniques et après avoir expérimenté différents agents immunologiques et chimiothérapeutiques in vitro et in vivo sur des modèles animaux et dans des essais sur le terrain, aucun traitement curatif efficace n'a été obtenu contre *Cryptosporidium* spp. (Dauguschies, 2011).

De nombreux chercheurs ont travaillé au développement de vaccins et de médicaments pouvant protéger les veaux nouveau-nés contre la maladie, mais n'offrent pas les résultats escomptés (Baillargeon, 2004). Une étude expérimentale in vivo a montré qu'après avoir inoculé contre *Cryptosporidium parvum* un vaccin plasmidique chez les ovins et les caprins entre le troisième et le quatrième mois de gestation, une certaine

efficacité était obtenue chez les agneaux et les chevreaux (Cacciò et Widmer, 2014). De même, un test in vitro réalisé sur des bovins avec des nucléosides antiviraux a montré un effet direct sur la croissance du parasite, tandis qu'un autre test in vivo utilisant du décoquinate (Deccox® au laboratoire Zoetis®, un agent coccidiostatique, à la 4-hydroxyquinolone), a conclu qu'il n'avait pas d'effet sur le nombre d'oocystes excrétés dans les fèces des animaux ni sur le tableau clinique de la maladie chez les veaux (Moore et al., 2004)

Les études moléculaires de *Cryptosporidium* spp. peuvent être un outil précieux pour le développement de techniques de contrôle (médicaments, vaccins et désinfectants) De plus, des manipulations génétiques pourraient modifier l'ADN du parasite, affectant ainsi sa pathogénicité, son infectiosité et sa viabilité (Shahiduzzaman et al., 2010a et Shahiduzzaman et al., 2010b).

### **3 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

### **3.2 HYPOTHÈSE**

L'utilisation de solides de fumier recyclé comme litière peut causer la propagation de plusieurs agents parasitaires, et affecter la santé et la productivité des bovins laitiers ou encore la santé des consommateurs.

### **3.3 OBJECTIFS**

- I.** Déterminer si les parasites les plus courants associés au tube digestif des bovins survivent aux procédures de préparation de différentes LFR utilisées dans les fermes laitières du Québec ;
  
- II.** Déterminer si certains de ces parasites, en particulier les pathogènes zoonotiques (*Cryptosporidium* spp. principalement), peuvent être récupérés dans le lait de réservoir, provenant des fermes laitières utilisant ce système de litière ;
  
- III.** Évaluer si la distribution de ces parasites diffère dans le fumier et dans le lait des vaches logées sur une LFR par rapport à celui celle des vaches logées sur un système de litière plus conventionnel, comme la litière de paille.

## **4 MATÉRIAUX, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

## INTERPRETIVE SUMMARY

### **Impact of Recycled Manure Solids Bedding on the Spread of Gastro-Intestinal Parasites in the Environment of Dairies and Milk.**

**Lasprilla-Matilla.** The use of recycled manure solids as bedding for dairy cows has recently increased. However, information regarding the impact of this type of bedding on animals' health remains sparse. This study represents the first attempt to evaluate the parasite burden of these zoonotic pathogens of animal and human importance in farms using recycled bedding. Our results demonstrate that protozoan parasites are not eliminated through the recycling process and depict an elevated prevalence of zoonotic diarrheic pathogens in farms using recycled manure solids as bedding. This could lead to economic losses for farms, decreased animal well-being, and risk for public health.

***Impact of Recycled Manure Solid Bedding on Spread of Gastro-intestinal Parasites in the Environment of Dairies and Milk***

Marlen I. Lasprilla-Mantilla<sup>\*,†,‡</sup>, Victoria Wagner<sup>\*,†</sup>, Joan Pena<sup>\*,†</sup>, Annie Frechette<sup>\*,‡</sup>,  
Karine Thivierge<sup>§,#</sup>, Simon Dufour<sup>\*,‡</sup>, Christopher Fernandez-Prada<sup>1,\*,†,‡</sup>

\*Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec J2S 2M2 Canada

†Groupe de recherche sur les maladies infectieuses des animaux de production “GREMIP”, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec J2S 2M2 Canada

‡Regroupement de recherche Op+Lait, Saint-Hyacinthe, Quebec J2S 2M2 Canada

§Laboratoire de santé publique du Québec, Institut national de santé publique du Québec, 20045, chemin Sainte-Marie, Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec, Canada H9X 3R5.

#Institute of Parasitology, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, McGill University, Macdonald Campus, 21111, H9X 3V9 Canada

**<sup>1</sup> Corresponding contributor:** Christopher Fernandez-Prada, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal - Département de Pathologie et Microbiologie. Bureau 3119-4, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Quebec J2S 2M2 Canada; Tel: +1-514-343-6111 #32802 Email: [christopher.fernandez.prada@umontreal.ca](mailto:christopher.fernandez.prada@umontreal.ca)



## ABSTRACT

The primary aim of this work was to isolate common bovine digestive tract parasites in recycled manure bedding (RMS), as well as determine the ability of current RMS preparation procedures to eliminate these pathogens. Other objectives were to assess if any of the aforementioned parasites could be retrieved in bulk milk from dairies using RMS, and to study if the prevalence of these parasites differed among manure of cows housed on RMS versus on straw bedding. Twenty-seven RMS farms and 61 control farms were recruited for the study. Samples of manure from the pre-pit and milk from the bulk tank were recovered from straw-based bedding farms and RMS-based farms. In addition, samples from the manure solid fraction after liquid extraction, RMS before use, and RMS currently in use were recovered from RMS herds. Parasites were first detected by double-centrifugation zinc-sulfate flotation to enhance the isolation of gastrointestinal protozoa, and modified Wisconsin sugar flotation for the appraisal of gastrointestinal nematodes. *Cryptosporidium* parasites were confirmed by nested-PCR amplification and sequencing of a portion of the gene encoding the small subunit rRNA. Results revealed a high prevalence of *Cryptosporidium* spp. (*C. parvum*, *C. andersoni* and *C. meleagridis*, identified by PCR) and *Eimeria* spp. (mainly *E. bovis* and *E. zuernii*) parasites in both types of farms, with a larger proportion of manure samples from RMS-bedded farms testing positive for *Cryptosporidium* parasites compared to manure from straw-bedded farms. Both *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. oocysts were found at every step of RMS preparation/transformation, showing that current RMS preparation strategies do not guarantee the destruction of protozoan parasites. *Cryptosporidium parvum*, a potential zoonotic risk for professionals in close contact with livestock, was found to be present in 32/61 straw-bedded and 24/27 RMS farms. No protozoan parasites were found in any sample derived from bulk milk, neither by microscopy analysis nor molecular methods.

**Keywords:** Dairy cattle, recycled manure solids, protozoan parasites.

## 1. INTRODUCTION

Recycled manure solids (**RMS**) have been used as a bedding material since the 1970s in North America (Carroll and Jasper, 1978). In the last few years, RMS has attracted the interest of dairy producers in Canada as an alternative to straw bedding due to its on-site availability and its association with increased cow comfort (Husfeldt et al., 2012, Leach et al., 2015). Different approaches have been developed to produce RMS (Fournel et al., 2019), however, there are significant unknowns with respect to associated biological risks. Research on the effects of RMS on animal health and welfare is still sparse, and the only disease for which the consequences have been studied in detail is bacterial-borne mastitis. Studies have shed light on the bacterial populations in RMS, present even after composting, including *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. and *Escherichia coli* (Cole and Hogan, 2016, Rowbotham and Ruegg, 2016). Moreover, a recent study demonstrated that bacterial counts of mastitis pathogens in composted RMS were comparable with those in fresh recycled manure when used as free stall bedding (Cole and Hogan, 2016).

Most dairy productions underwent a major transformation during the second half of the 20<sup>th</sup> century, ending with animals housed indoors year round using different, continuously evolving systems. While it is true that this change reduced the exposure of dairy cows to pasture-contaminating gastrointestinal nematode (**GIN**) parasites, emergence of protozoan parasites, mainly *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and *Eimeria* spp. may be of increased risk to housed cattle (Vande Velde et al., 2018).

Economic losses associated with these parasites have not been studied in dairy cattle, but include the cost of treatment and control of enteritis, low feed conversion, and decreased milk productivity, as well as losses due to animal deaths (Olson et al., 1995, Mark-Carew et al., 2010, Sudhakara Reddy et al., 2015, Zechner et al., 2016, Thomson et al., 2017). Importantly, current evidence indicates that ruminants are a potential reservoir of zoonotic *Cryptosporidium* (Robertson et al., 2010, Gormley et al., 2011, Pumipuntu and Piratae, 2018). RMS is prepared by separation of the liquid fraction of manure and sometimes followed by composting of the solid fraction. RMS could be a potential transmission source of *Cryptosporidium* (especially non-composted RMS), as infected animals can pass up to 10 billion oocysts per gram of feces (O'Handley et al., 1999) which

are highly resistant in the environment due to their disulfide bond-rich wall (Carey et al., 2004).

The objective of this study was to investigate if the common bovine digestive tract parasites would survive RMS preparation procedures in Quebec's dairies and to assess if some of these parasites, especially those with zoonotic potential such as *Cryptosporidium* spp., could be retrieved in bulk milk from dairies using RMS. A secondary objective was to appraise if the prevalence of these parasites differed among manure of cows housed on RMS compared to that of cows housed on straw bedding.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***2.1. Study Design***

#### ***2.1.1 Farm Recruitment and Sampling.***

All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee for the Veterinary College of the University of Montréal (protocol 17-Rech-1886). Study design was an observational cross-sectional study where both exposure (use of RMS) and outcome (parasitic burden) were evaluated on a same visit. To be included, RMS farms needed to use RMS as primary bedding for lactating cows for at least six months before the beginning of the study. They also had to be located within 250 kilometers of the research facility (Saint-Hyacinthe, QC, Canada). Potential participating RMS herds were identified by contacting equipment dealers, veterinarians, and via social networks, and all owners identified were contacted to verify their participation in the study. Due to regional management practices, most RMS herds also participated in regular DHI program. However, given the relatively small number of RMS herds in the study area, RMS herds not participating in DHI program were not excluded. For comparison, farms using a more conventional bedding were recruited in the same area with the help of the Eastern Canada DHI association (Valacta Inc, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada) and were selected based on their exclusive use of straw bedding for at least six months. Farm visits were conducted between January and July 2018 in Quebec and Eastern Ontario. Samples of manure collected from the last indoor point before the manure pit and of milk from the bulk tank were recovered from straw-bedded farms and RMS herds. In addition, three extra samples were recovered from RMS herds: manure solid fraction after liquid extraction,

RMS before use, and RMS currently in use. The manure solid fraction was collected immediately upon exiting the equipment used for that extraction (e.g., screw press, roller press). Unused RMS samples were obtained directly from the equipment used to distribute the bedding (e.g., collecting from the mixer wagon as it was filling the stalls). For used RMS a random sample of five stalls was constituted. Two used-RMS samples were collected from the back-third of each stall, while avoiding collecting manure piles. All used RMS samples were mixed together in a plastic bag. All samples were collected by the research team, stored on ice, and brought back to Université de Montréal research facilities, where they were separated within 24 h of collection in various sub-samples for the different analyses. Briefly, 10 g of manure, 10 ml of milk, 15 g of manure solid fraction after liquid extraction, 15 g of unused RMS, and 15 g of used RMS were preserved at 4 °C for parasitological analyses. Parasitological analyses were conducted in triplicate at the Diagnostic Service of University of Montréal (Saint-Hyacinthe, QC, Canada; see below for description of analyses).

## ***2.2. Parasitology Tests***

### ***2.2.1. Parasite Isolation and Microscopy Analyses.***

To isolate and quantitate protozoa in samples, double-centrifugation zinc-sulfate flotation was employed (Bukhari and Smith, 1995). Modified Wisconsin sugar flotation was used to identify GIN eggs (Dryden et al., 2005). Briefly, for protozoal isolation: 2 mL of washed samples were added to 10 mL of ZnSO<sub>4</sub> (Ricca Chemical, USA) (specific gravity 1.180) and centrifuged at 1,050 × g for 2 min. Following centrifugation, 2 ml of fluid from the meniscus (containing the oocysts) was removed and washed three times in 1 × PBS pH 7.4 (with centrifugation at 1,650 × g for 5 min after each wash), and the pellet was resuspended to a final volume of 1 mL of 1 × PBS. For GIN isolation: samples were centrifuged at 1,650 × g for 5 min, resuspended in saturated sucrose (Fisher Chemical, Canada), centrifuged at 650 × g for 2 min, and flotation was performed for 1 h at room temperature. The coverslip was then removed and rinsed with 1 mL of 1 × PBS to collect the eggs. Finally, for analysis of milk samples, specimens underwent fat extraction and quantitative formalin ethyl acetate (Fisher Chemical, Canada) concentration (Zarlenga and Trout, 2004) followed by double centrifugation and zinc sulfate flotation.

Oocysts and eggs were identified and counted using a high-throughput multimode microscope (Cytation 5, Biotek, USA) using 20×, 40× and 60× objectives. Additionally, when *Cryptosporidium* spp. were isolated, or suspected, an additional Modified Ziehl-Neelsen microscopy was performed (Fayer et al., 2007). As parasites are not distributed homogeneously in samples, 3 independent replicates were processed and analyzed. Results of these 3 analyses were summed up to report a number of oocysts per gram of biological materials.

### **2.2.2. DNA extraction.**

To extract DNA, a modified protocol was performed using the QIAmp DNA Mini kit (Qiagen, Germany) (Thivierge et al., 2016). Total parasites recovered from ZnSO<sub>4</sub> flotation were resuspended in QIAmp AL buffer and submitted to 10 freeze-thaw cycles (1 min in liquid nitrogen and 2 min at 56 °C per cycle). Samples were centrifuged at 16,000 × g for 1 min and incubated with 200 µg/mL proteinase K at 56 °C overnight. Samples were centrifuged at 16,000 × g for 2 min, and 400 µL of supernatant was recovered and mixed with an equal volume of absolute ethanol prior to starting the spin column protocol (Qiagen, Germany). For each sample, the final elution product was recovered in a clean tube, quantified and assessed for purity using a NanoDrop system (Thermo Scientific, USA), and either used immediately for PCR amplification or stored at –20 °C until assay.

### **2.2.3. Nested-PCR and Random Fraction Length Polymorphism Analysis (RFLP).**

Species of *Cryptosporidium* parasites were determined by nested-PCR amplification, RFLP analyses, and sequencing of a portion of the gene encoding the small subunit rRNA (Nichols et al., 2003). The PCR products were fully sequenced in both directions with the secondary PCR primers used to produce the amplicons (FW: 5'-AAGCTCGTAGTTGGATTTCTG-3'; RV: 5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3') at the Molecular Diagnostic Service of the Veterinary College at University of Montréal (Saint-Hyacinthe, QC, Canada). Each gene sequence fragment was independently compared to GenBank and CryptoDB sequences of *Cryptosporidium* species by Basic Local Alignment Search Tool analysis (Benson et al., 2013). Sequences were aligned using

SeqMan Pro (DNASTAR, USA). The PCR positive specimens sequenced in the present study shared > 95 % identity with species AF308600, MH395839.1 and AF112574.1 in GenBank. Mixed populations within the same sample, characterized by overlaying chromatograms, were elucidated by PCR-RFLP analysis using the enzymes *VspI*, *DraI*, and *DdeI* (Nichols et al., 2003).

### 2.3. Statistical Analyses

#### 2.3.1. Parasites Survival through Recycled Manure Solids Preparation Procedures.

First, models were generated to predict how the oocyst count for a given parasite would be affected by the type of sample analyzed (i.e., manure, manure solid fraction following separation procedures, RMS prior to use in the stalls, or RMS collected in stalls just prior to replacement). A generalized mixed model was used with oocyst count of a given parasite as outcome, sample type as the sole fixed predictor, a random herd effect, and using a negative binomial (NB) distribution with a natural logarithm link. To ensure that the number of samples with a zero egg count was well modelled by the NB distribution, a Vuong test comparing the conventional NB to a zero-inflated NB distribution was conducted using the *Vuong.sas* macro (Vuong, 1989). Said Vuong test indicated that the NB distribution was favoured compared to the zero-inflated NB; NB distributions were, therefore, used in all models. The model was as follows:

$$Egg_{ij} = \text{Log}(\beta_0 + \beta_1 \text{Sample type}_{ij} + \varepsilon_{ij} + u_j)$$

Where  $Egg_{ij}$ , the count of oocysts for a given parasite (i.e., total *Eimeria* spp., *Eimeria bovis*, *Eimeria zuernii*, or *Cryptosporidium* spp.), for sample  $i$  from herd  $j$  was assumed to follow an NB distribution and was linked to fixed predictors through the natural logarithmic function ( $\text{Log}$ );  $\beta_0$  was the mean number of oocysts in the reference category (i.e., the intercept);  $\beta_1$  was a vector of coefficients for a set of dummy variables representing sample type (with manure as reference category);  $\text{Sample type}_{ij}$  was the type of biologic material (i.e., manure, manure solid fraction following separation procedures, RMS prior to use in the stalls, RMS collected in stalls just prior to replacement) for sample  $i$  from herd

$j$ ; and  $\varepsilon_{ij}$  and  $u_j$  were, respectively, the observation's and herd's residuals. Using that model, the sample type coefficients  $\beta$  could be interpreted, after exponentiation, as the relative increase or decrease in egg count for a given biologic material compared to a reference category (manure, in that case). Alternatively, the sum of  $\beta_0$  and of a given sample type coefficient can be exponentiated to illustrate the predicted median egg count for a given biologic material. When comparing sample types with one another, a Tukey-Kramer adjustment was used to account for multiple comparisons. Finally, in cases where the generalized mixed model could not converge, then a generalized model was used (thus ignoring clustering of observations per herd). These statistical computations were conducted using the GLIMMIX procedure of SAS 9.4 (SAS Institute Inc, Carry, NC, US) with a Gaussian quadrature estimation method using seven quadrature points (i.e., method=quad qpoints=7).

Next, it was estimated whether egg count for a given parasite in manure would be a significant predictor of egg count in unused RMS. To achieve this, a model similar to the generalized mixed NB model previously described was used, but without the herd random effect, and with the egg count in unused RMS as the outcome and the egg count in manure as the sole predictor. These statistical computations were conducted using the GENMOD procedure of SAS 9.4 (SAS Institute Inc, Carry, NC, US).

### ***2.3.2. Comparative Egg Counts by Bedding Type.***

To investigate whether counts of oocysts in manure would differ between herds bedding cows on RMS compared to straw, only one sample (i.e., one manure sample) was available per herd. Thus, a model similar to the generalized mixed NB model previously described was used, but without the random effect of the herd, and with type of bedding (RMS vs. straw) as the sole predictor. These statistical computations were conducted using the GENMOD procedure of SAS 9.4.

## **3. RESULTS**

### ***3.1. Herd recruitment and sampling***

Forty-nine RMS farms and 139 straw-bedded farms were identified and contacted to obtain more information. Twenty-seven RMS farms and 61 straw-bedded farms were

recruited for the study. Sixteen of the 27 RMS herds and all straw-bedded herds participated in regular DHI testing. Straw-bedded farms were milking 43 to 229 cows (median 65) and RMS farms were milking 55 to 900 cows (median 111). Twenty-four RMS farms simply extracted a fraction of the liquid (15 used a roller press system and 9 used an infinite screw system) and let the solid fraction mature in a pile or a container for various time periods (from 3 hours to 3 days), with the exception of one farm which used the solid fraction as bedding immediately after separation. Two farms used a screw press separator for extracting a fraction of the liquid and then composted the solid fraction using a mechanical drum. Finally, one farm used a biodigester followed by a screw press separation process. The maturation time of the bedding was highly variable between herds (hours to several days). Furthermore, the length of use in stalls before replacement was variable and was mainly a function of the stall design (i.e., shallow vs. deep bedding). When used as shallow bedding, farmers tended to replace it every twelve hours and, when used in deep stalls, it was added from once every other day to once every 8 days. The majority of control farms used straw as shallow bedding and therefore replaced it every twelve or twenty-four hours.

### ***3.2. Parasites identification***

A summary of isolated parasites is presented in Table 1. *Moniezia* spp. tapeworms (cestodes) were found in 8/61 straw-bedded and 1/27 RMS herds. Importantly, these parasites require the presence of the intermediate host, an oribatid mite, which has been described to be found in straw bedding (Irie et al., 2013). *Toxocara* spp. were isolated from one straw-bedded farm. No other types of metazoan parasites were isolated and bulk tank milk was negative for all species, including *Moniezia* and *Toxocara* (data not shown). Flotation analyses revealed a higher prevalence ( $P < 0.01$ ) of *Cryptosporidium*-like structures in manure from RMS herds (23/27; 85.2%) than straw herds (30/61; 49.2%). Also, this pathogen was isolated in 22/27 (81.5%), 23/27 (85.2%), and 26/27 (96.3%) RMS samples collected from the manure solids, bedding before use, and used bedding, respectively (Table 1). Samples containing *Cryptosporidium*-like structures were further investigated by PCR. PCR analysis identified three *Cryptosporidium* species: *C. parvum* in manure of 32/61 straw-bedded farms and 24/27 RMS farms; *C. andersoni* in 19/61 and



20/27 straw and RMS farms, respectively; and *C. meleagridis* in 4/61 and 1/27 straw and RMS farms, respectively. Isolation of both *C. parvum* and *C. andersoni* occurred in 18/61 and 16/27 straw and RMS farms, respectively. *Cryptosporidium parvum*, *C. andersoni* and *C. meleagridis* were co-detected in 1/61 and 4/27 straw-bedded and RMS farms, respectively. Pure infections were less frequent, with *C. parvum* in 13/61 and 4/27 straw and RMS farms, respectively, with *C. andersoni* found only in one farm using straw bedding.

*Eimeria* was isolated from 39/61 straw farms and in most RMS farms: in manure (21/27), manure solid fraction (24/27), RMS before use (22/27) and used RMS (22/27). The proportion of manure samples from RMS-bedded farms (77.8%) positive for *Eimeria* spp. was not statistically different from that of manure samples from straw-bedded farms (63.9%;  $P = 0.20$ ; Chi-square test). The proportion of manure samples from RMS-bedded farms positive for *Eimeria bovis* (37.0%) or *Eimeria zuernii* (14.8%) was not statistically different from that of manure samples from straw-bedded farms (21.3% for *Eimeria bovis*;  $P = 0.12$ ; and 9.8% for *Eimeria zuernii*;  $P = 0.50$ ; Chi-square test). *Giardia* spp. trophozoites and/or oocysts, were isolated from only one manure sample recovered from an RMS herd. This may be due to the environmental fragility of this parasite compared to *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp.

No protozoan parasites were found in any sample derived from bulk tank milk, neither by microscopy analysis nor molecular methods.

### **3.3. Parasites Survival through RMS Preparation Procedures**

Median egg counts for all parasite species did not differ between manure and any stage of RMS preparation or use (Table 2). Mean *Cryptosporidium* oocyst count (95% CI) per gram of materials across three replicates was 4.20 (1.54, 11.50), 2.20 (0.80, 6.04), 3.19 (1.22, 8.35) and 1.95 (0.75, 5.02), for manure, manure solid fraction, RMS before use and used RMS, respectively. See Table 2 for mean *Eimeria* spp. oocyst count (95% CI) per gram of materials. The count of oocysts of *Cryptosporidium* spp. in manure was not associated with counts in unused RMS ( $P = 0.84$ ). Similarly, counts of *Eimeria* spp. (when considered as a group) in manure were not associated with counts in unused RMS ( $P = 0.10$ ). Counts of *E. bovis* in manure, however, were associated with counts in unused RMS

( $P = 0.03$ ); an increase of 1 oocyst of *E. bovis* in manure resulted in 1.7 times (95% CI: 1.1, 2.8) more oocysts of that pathogen in unused RMS. Counts of *E. zuernii* in manure were not associated with counts in unused RMS ( $P = 0.61$ ).

#### ***3.4. Parasites Egg Counts in Manure for Herds Housing Cows on Recycled Manure Solids Compared to Straw Bedding***

Oocyst counts in manure of cows housed on straw bedding and on RMS are described in Table 3. Median estimated *Cryptosporidium* spp. egg count in manure obtained from RMS- and straw-bedded herds was not statistically different ( $P = 0.34$ ). Similarly, no difference was observed between RMS- and straw-bedded herds in median estimated counts of *Eimeria* spp. ( $P = 0.76$ ), nor in counts of *Eimeria bovis* ( $P = 0.69$ ) and *Eimeria zuernii* ( $P = 0.53$ ).

## **4. DISCUSSION**

RMS has many potential benefits, including increased cow comfort and on-site availability, making it a possible alternative to more traditional systems such as straw- or sand-based bedding (Leach et al., 2015). However, there are still many potential risks to animal and human health. Among these risks, different key pathogens (including bacteria, parasites, and viruses) should be considered in herds that use RMS (Leach et al., 2015). Bacterial populations in RMS have been studied, mainly due to their potential link to clinical mastitis (Leach et al., 2015, Bradley et al., 2018). However, parasite populations in RMS are not well understood, and no report to date has raised any concerns about parasite-related risk when using or working with RMS.

Our results revealed protozoan and metazoan parasites in both types of bedding. Metazoan parasites, such as lungworms and GIN, were less frequent (Table 1), mainly because the L3 stage (infective form) of these parasites is not able to complete its life cycle within confinement housing conditions (Kumar et al., 2013, Auld and Tinsley, 2014).

Regarding protozoan parasites, our analyses led to the isolation of *Giardia* spp., *Eimeria* spp. and *Cryptosporidium* spp. *Giardia* oocysts were only identified in manure from 1/27 RMS farms, which could be explained by a very low prevalence in Quebec's herds, by the age of the studied population (mostly adult cattle, which are less prone to

*Giardia* infections), or by the rapid degradation of the parasites in feces (e.g. 1 week in cattle feces according to (Olson et al., 1999), thus hindering the detection of the parasite in our samples). Coccidia occur in all breeds of cattle and, while the disease is seen more commonly in calves three weeks to six months of age, it may occur in yearlings and adults (Keeton and Navarre, 2018). Our analyses found *Eimeria* spp. in a majority of herds, regardless of bedding type (Table 1), which correlates with previous studies conducted in other regions of Canada (Radostits and Stockdale, 1980, Kennedy and Kralka, 1987). Our morphology study revealed two highly pathogenic *Eimeria* species, *E. bovis* and *E. zuernii*, mainly affecting calves aged up to 1 year. Infected calves frequently suffer from severe diarrhea, fever, abdominal pain, occasionally muscular tremors, convulsions and anemia, dehydration, weakness and anorexia, which leads to impaired performance, and sometimes, to the death of the animal. Asymptomatic cattle frequently act as a source of infection for calves, as fecal material containing oocysts may contaminate feed, water and soil (Keeton and Navarre, 2018). Consequently, RMS could represent a risk for calves if the oocysts present in the manure are not inactivated during the recycling process. That said, the low median oocyst counts observed in this study (Table 2) suggest that bedding would be a minimal source of potential infection. Our results revealed a significant increase in the number of *Eimeria* oocysts present in RMS before use (Table 2), which could be explained either by contamination by non-cattle coccidia (rodents, birds, etc.) or recontamination of the RMS induced by cows in the stalls.

*Cryptosporidium* parasites were found in 50% and 85-93% of straw-bedded and RMS farms, respectively. These high figures are in agreement with other studies which have reported prevalence values ranging from 55% to 100% in Canadian herds (Olson et al., 1997, Budu-Amoako et al., 2012a). The fact that *Cryptosporidium* was found in manure in a higher proportion of RMS herds compared to straw-bedded herds could be due to using manure solid as bedding materials. Indeed, *Cryptosporidium* oocysts are known to be very resistant, even in harsh environment. It is thus very unlikely that RMS preparation methods would lead to any significant reduction in oocysts counts. Nevertheless, the association observed could also be due, in part, to another extraneous factor. For instance, RMS and straw-bedded farms may have differed in term of DHI participation, herd size, season of sample collection, or for other reasons also linked to *Cryptosporidium* prevalence. To

investigate whether the obtained result could be solely due to confounding by another unmeasured characteristic, we computed the E-value described by VanderWeele and Ding (2017) using the package *EpisensR* (VanderWeele and Ding, 2017). This E-value is defined as the minimum strength of association, on the risk ratio scale, that an unmeasured confounder would need to have with both the exposure and the disease to fully explain a specific association. With the current data, a hypothetical confounder would have to increase the risk of cryptosporidiosis by a factor of 4.3 and be 4.3 times more present in RMS bedding to fully create the observed association. It is, thus, very unlikely that the observed association (i.e., more crypto in RMS farms) would be due to confounding by an extraneous unmeasured variable (e.g., herd size, age of the facilities, etc.).

*C. parvum* is typically found in pre-weaned calves and is responsible for acute diarrhea. Our results isolated *C. parvum* from a majority of farms, which is similar to the range of 40% to 88% reported in previous Canadian studies (Ruest et al., 1998, Trotz-Williams et al., 2005). *C. parvum* has frequently been linked to zoonotic transmission in personnel and professionals (e.g. veterinarians) who work with cattle (Gormley et al., 2011, Pumipuntu and Piratae, 2018). Moreover, there is evidence of an indirect path of zoonotic transmission from cattle to humans mediated by contaminated water sources, as reported in Prince Edward Island (Budu-Amoako et al., 2012b). These two routes of transmission could be favoured when using RMS that has not tested pathogen-free. We found *C. parvum* oocysts at all stages of RMS preparation, showing that this process has no potential effect on the reduction of the total number of parasites. In this study we did not evaluate the infectivity of the oocysts. However, environmental resistance of *Cryptosporidium* oocysts coupled with the fact that a large majority of RMS farms simply extracted a fraction of the liquid and then let the solid fraction mature in a pile or a container for various time periods (without any temperature or time threshold controls), makes it very likely that most oocysts remain infective. This could have two major implications: i) without having been tested for pathogens, RMS should not be used for calves, given that they are more likely to suffer from such infections. Several studies have shown that age is associated with *Cryptosporidium* infection, with young calves being the population at highest risk of infection (Santin et al., 2004, Maddox-Hyttel et al., 2006, Fayer et al., 2007); ii) since *C. parvum* can infect humans through fecal-oral contact or airborne dust particles

(Balderrama-Carmona et al., 2014) at doses as low as 10-30 oocysts (Messner and Berger, 2016), the oocyst counts found in this study suggest a potential risk of zoonotic infection when working with these RMS. Better protocol, including a validated composting process that guarantees total inactivation of these parasites, should be implemented on RMS farms.

*Cryptosporidium andersoni* was detected in 31% and 74% of straw- and RMS-based farms, respectively. This species has been described as one of the most frequent species of *Cryptosporidium* infecting cattle in Canada (Budu-Amoako et al., 2012a) and worldwide (Robertson et al., 2014). This parasite infects the gastric gland of the abomasum of older post-weaned calves, yearlings and adults. *Cryptosporidium andersoni* has been reported to reduce milk production in dairy cows by approximately 13% (Anderson, 1998). Future studies should formally target this issue and determine if the presence of *C. andersoni* in RMS farms is significant, and may cause a decrease in production at both the animal and herd levels. Finally, *C. meleagridis* has a wide host range, including cattle, but mainly infects birds (Gong et al., 2017), which makes authors suspect possible accidental transmission rather than a real infection, e.g. ingested oocysts that pass intact through the gastrointestinal tract or environmental contamination from free-living wild birds (Seva Ada et al., 2011).

Raw milk and raw milk products have been reported as the cause of several cases of human cryptosporidiosis, mainly by *C. parvum* (Laberge et al., 1996, Djuretic et al., 1997, Harper et al., 2002). However, this parasite was not retrieved from bulk tank milk in any of the sampled herds. Thus, the possibility of any mammary gland contamination or milk infection during harvesting is hypothesized to be low or nil.

As other study limitations, our transverse study design did not allow to record time order of occurrence between exposure and outcome. In our case, we could hardly imagine that many producers with a very high parasitic burden in their herd, may have recently decided to switch to a new bedding (RMS) to control this issue (rather than bedding-type being the cause for the parasite burden). Firstly, parasitic burden is very uncommonly investigated in Québec's dairies. Secondly, bedding (and even more RMS) would hardly be considered as a mean to control parasitic burden. Finally, we only considered herds having use a given type of bedding for at least 6 months prior to measuring the parasitic

burden. Another limitation is that RMS was only compared to straw-bedding, though straw-bedding is the most commonly use bedding in Québec's dairies.

## 5. CONCLUSIONS

This study represents the first attempt to evaluate the parasite burden in farms of the province of Quebec (Canada) using RMS. Despite the limitations discussed above, results show that RMS does not seem to have an impact on parasite diversity or frequency compared with straw-based bedding. However, current 'uncontrolled' strategies for preparing RMS do not guarantee the destruction of protozoan parasites, as oocysts are found at every step of RMS preparation/transformation; a process which is not standardized between farms. Considering the relatively high prevalence of *Cryptosporidium* parasites in RMS found in this study, including zoonotic *C. parvum*, further work is needed to evaluate the infectivity of oocysts and quantify the risk of environment-to-animal transmission (especially when RMS is used for calves), as well as the risk RMS poses to farm workers and to water supplies.

## Acknowledgements

This work was supported by Novalait Inc and Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (2017-LG-201835), by a Collaborative Research and Development grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; CRDPJ-499421-16), and by the Consortium de recherche – biosécurité industriel du Québec (2015-044-C17); C.F.P is supported by a NSERC Discovery Grant (RGPIN-2017-04480); S.D. is also supported by a NSERC Discovery Grant (RGPIN-435637-2013); A.F. and M.I.L.M. are both supported by NSERC-CREATE in milk quality scholarships. This research has been also supported by the Fonds du Centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (granted to C.F.P and K.T.) and the Canadian Foundation for Innovation ([www.innovation.ca](http://www.innovation.ca)), grant number 37324; awarded to CFP. Authors Contributions: conceptualization: MILM, AF, SD, CFP; formal analysis: MILM, KT, SD, CFP; experiments: MILM, JP, AF, SD; methodology: MILM, AF, SD, KT, CFP; writing – review & editing: MILM, VW, AF, KT, SD, CFP.

**Table 6.** Parasitic agents identified in dairies using straw bedding (n = 61) and recycled solid manure bedding (RMS; n=27).

Parasite	Straw-bedded farms Manure	RMS <sup>1</sup> -bedded farms			
		Manure	Manure solid fraction	RMS <sup>1</sup> before use	Used RMS <sup>1</sup>
<i>Cryptosporidium</i> spp.	30/61 (49.2%) <sup>a</sup>	23/27 (85.2%) <sup>b</sup>	22/27 (81.5%)	23/27 (85.2%)	26/27 (92.9%)
<i>Eimeria</i> spp.	39/61 (63.9%)	21/27 (77.8%)	24/27 (88.9%)	22/27 (81.5%)	22/27 (81.5%)
<i>E. bovis</i>	13/61 (21.3%)	10/27 (37.0%)	5/27 (18.5%)	5/27 (18.5%)	4/27 (14.8%)
<i>E. zuernii</i>	6/61 (9.8%)	4/27 (14.8%)	4/27 (14.8%)	3/27 (11.1%)	4/27 (14.8%)
<i>Giardia</i> spp.	-	1/27 (3.7%)	-	-	-
<i>Moniezia</i> spp.	8/61 (13.1%)	1/27 (3.7%)	1/27 (3.7%)	-	1/27 (3.7%)
<i>Toxocara</i> spp.	1/61 (1.6%)	-	-	-	-

<sup>1</sup>Recycled manure solids

a, b Columns with different superscripts differ ( $P < 0.05$ )

**Table 7.** Predicted median egg count (i.e., least square mean estimates in number of oocysts per gram of materials) in manure, manure solid fraction after separation, recycled manure solid (RMS) bedding prior to use, and recycled manure bedding at the end of the use cycle for different common bovine digestive tract parasites.

Biological materials	Estimated median egg count (95% CI) per gram of materials			
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Total <i>Eimeria</i> spp.	<i>Eimeria bovis</i> <sup>a</sup>	<i>Eimeria zuernii</i>
Manure	4.20 (1.54, 11.50)	0.24 (0.08, 0.77)	0.30 (0.08, 0.98)	0.02 (0.00, 0.13)
Manure solid fraction	2.20 (0.80, 6.04)	0.20 (0.07, 0.58)	0.12 (0.03, 0.38)	0.00 (0.00, 0.08)
RMS <sup>1</sup> before use	3.19 (1.22, 8.35)	0.58 (0.18, 1.80)	0.15 (0.05, 0.62)	0.00 (0.00, 0.08)
Used RMS <sup>1</sup>	1.95 (0.75, 5.02)	0.47 (0.15, 1.40)	0.13 (0.03, 0.47)	0.00 (0.00, 0.07)

<sup>a</sup> For the *Eimeria bovis* model, we could not obtain convergence of the generalized negative binomial mixed model and a generalized negative binomial model had to be used instead, thus ignoring clustering of observations by herds.

<sup>1</sup>Recycled manure solids.



**Table 8.** Mean, median, and range of oocysts count (per gram of manure) in manure from straw-bedded vs. recycled manure solid (RMS) cows for the most common parasites.

Parasite	Straw-bedded cows			RMS <sup>1</sup> -bedded cows		
	Mean	Median	Range	Mean	Median	Range
<i>Cryptosporidium</i> spp.	16.83	0.00	0.00-549.17	31.00	1.17	0.00-619.00
<i>Eimeria</i> spp.	0.75	0.00	0.00-19.17	0.90	0.00	0.00-6.00
<i>E. bovis</i>	0.10	0.00	0.00-2.83	0.30	0.00	0.00-3.00
<i>E. zuernii</i>	0.08	0.00	0.00-1.17	0.15	0.00	0.00-2.50

## REFERENCES

**Anderson, B. C. 1998.** Cryptosporidiosis in bovine and human health. *J Dairy Sci* 81(11):3036-3041.

**Auld, S. K. and M. C. Tinsley. 2014.** The evolutionary ecology of complex lifecycle parasites: linking phenomena with mechanisms. *Heredity* 114:125.

**Balderrama-Carmona, A. P., P. Gortares-Moroyoqui, L. H. Alvarez-Valencia, L. Castro-Espinoza, I. Mondaca-Fernandez, J. Balderas-Cortes Jde, C. Chaidez-Quiroz, and M. M. Meza-Montenegro. 2014.** Occurrence and quantitative microbial risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in soil and air samples. *Int J Infect Dis* 26:123-127.

**Benson, D. A., M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and E. W. Sayers. 2013.** GenBank. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue):D36-42.

**Bradley, A. J., K. A. Leach, M. J. Green, J. Gibbons, I. C. Ohnstad, D. H. Black, B. Payne, V. E. Prout, and J. E. Breen. 2018.** The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk – A cross sectional study of UK farms. *International Journal of Food Microbiology* 269:36-45.

**Budu-Amoako, E., S. J. Greenwood, B. R. Dixon, H. W. Barkema, and J. T. McClure. 2012a.** *Giardia* and *Cryptosporidium* on dairy farms and the role these farms may play in contaminating water sources in Prince Edward Island, Canada. *J Vet Intern Med* 26(3):668-673.

**Budu-Amoako, E., S. J. Greenwood, B. R. Dixon, L. Sweet, L. Ang, H. W. Barkema, and J. T. McClure. 2012b.** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* in humans on Prince Edward Island, Canada: evidence of zoonotic transmission from cattle. *Zoonoses Public Health* 59(6):424-433.

**Bukhari, Z. and H. V. Smith. 1995.** Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. *J Clin Microbiol* 33(10):2592-2595.

**Carey, C. M., H. Lee, and J. T. Trevors. 2004.** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res* 38(4):818-862.

Carroll, E. J. and D. E. Jasper. 1978. Distribution of enterobacteriaceae in recycled manure bedding on California dairies. *J Dairy Sci* 61(10):1498-1508.

**Cole, K. J. and J. S. Hogan. 2016.** Short communication: Environmental mastitis pathogen counts in freestalls bedded with composted and fresh recycled manure solids. *J Dairy Sci* 99(2):1501-1505.

**Djuretic, T., P. G. Wall, and G. Nichols. 1997.** General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Commun Dis Rep CDR Rev* 7(3):R41-45.

**Dryden, M. W., P. A. Payne, R. Ridley, and V. Smith. 2005.** Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Vet Ther* 6(1):15-28.

**Fayer, R., M. Santin, and J. M. Trout. 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Vet Parasitol* 145(3-4):260-266.

**Fournel, S., S. Godbout, P. Ruel, A. Fortin, M. Genereux, C. Cote, C. Landry, and D. Pellerin. 2019.** Production of recycled manure solids for bedding in Canadian dairy farms: I. Solid-liquid separation. *J Dairy Sci* 102(2):1832-1846.

**Gong, C., X. F. Cao, L. Deng, W. Li, X. M. Huang, J. C. Lan, Q. C. Xiao, Z. J. Zhong, F. Feng, Y. Zhang, W. B. Wang, P. Guo, K. J. Wu, and G. N. Peng. 2017.** Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China: a review. *Parasite* 24:1.

**Gormley, F. J., C. L. Little, R. M. Chalmers, N. Rawal, and G. K. Adak. 2011.** Zoonotic cryptosporidiosis from petting farms, England and Wales, 1992-2009. *Emerg Infect Dis* 17(1):151-152.

**Harper, C. M., N. A. Cowell, B. C. Adams, A. J. Langley, and T. D. Wohlsten. 2002.** Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Commun Dis Intell Q Rep* 26(3):449-450.

**Husfeldt, A. W., M. I. Endres, J. A. Salfer, and K. A. Janni. 2012.** Management and characteristics of recycled manure solids used for bedding in Midwest freestall dairy herds. *J Dairy Sci* 95(4):2195-2203.

**Irie, T., K. Sakaguchi, A. Ota-Tomita, M. Tanida, K. Hidaka, Y. Kirino, N. Nonaka, and Y. Horii. 2013.** Continuous *Moniezia benedeni* infection in confined cattle possibly maintained by an intermediate host on the farm. *J Vet Med Sci* 75(12):1585-1589.

**Keeton, S. T. N. and C. B. Navarre. 2018.** Coccidiosis in Large and Small Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 34(1):201-208.

**Kennedy, M. J. and R. A. Kralka. 1987.** A Survey of *Eimeria* spp. in Cattle in Central Alberta. *Can Vet J* 28(3):124-125.

**Kumar, N., T. K. S. Rao, A. Varghese, and V. S. Rathor. 2013.** Internal parasite management in grazing livestock. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology* 37(2):151-157.

- Laberge, I., M. W. Griffiths, and M. W. Griffiths. 1996.** Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *Int J Food Microbiol* 32(1-2):1-26.
- Leach, K. A., S. C. Archer, J. E. Breen, M. J. Green, I. C. Ohnstad, S. Tuer, and A. J. Bradley. 2015.** Recycling manure as cow bedding: Potential benefits and risks for UK dairy farms. *Vet J* 206(2):123-130.
- Maddox-Hyttel, C., R. B. Langkjaer, H. L. Enemark, and H. Vigre. 2006.** *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs--occurrence and management associated risk factors. *Vet Parasitol* 141(1-2):48-59.
- Mark-Carew, M. P., Y. Khan, S. E. Wade, S. Schaaf, and H. O. Mohammed. 2010.** Incidence of and risks associated with *Giardia* infections in herds on dairy farms in the New York City Watershed. *Acta Vet Scand* 52:44.
- Messner, M. J. and P. Berger. 2016.** *Cryptosporidium* Infection Risk: Results of New Dose-Response Modeling. *Risk Anal* 36(10):1969-1982.
- Nichols, R. A., B. M. Campbell, and H. V. Smith. 2003.** Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified nested PCR-restriction fragment length polymorphism assay. *Appl Environ Microbiol* 69(7):4183-4189.
- O'Handley, R. M., C. Cockwill, T. A. McAllister, M. Jelinski, D. W. Morck, and M. E. Olson. 1999.** Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 214(3):391-396.
- Olson, M. E., J. Goh, M. Phillips, N. Guselle, and T. A. McAllister. 1999.** *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst Survival in Water, Soil, and Cattle Feces. *Journal of Environmental Quality* 28:1991-1996.
- Olson, M. E., T. A. McAllister, L. Deselliers, D. W. Morck, K. J. Cheng, A. G. Buret, and H. Ceri. 1995.** Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am J Vet Res* 56(11):1470-1474.
- Olson, M. E., C. L. Thorlakson, L. Deselliers, D. W. Morck, and T. A. McAllister. 1997.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet Parasitol* 68(4):375-381.
- Pumipuntu, N. and S. Piratae. 2018.** Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. *Vet World* 11(5):681-686.
- Radostits, O. M. and P. H. Stockdale. 1980.** A brief review of bovine coccidiosis in Western Canada. *Can Vet J* 21(8):227-230.

**Robertson, L. J., C. Björkman, C. Axén, and R. Fayer. 2014.** Cryptosporidiosis in Farmed Animals. Pages 149-235 in *Cryptosporidium: parasite and disease*. S. M. Cacciò and G. Widmer, ed. Springer Vienna, Vienna.

**Robertson, L. J., B. K. Gjerde, and E. Furuseth Hansen. 2010.** The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. *Vet Parasitol* 171(1-2):140-145.

**Rowbotham, R. F. and P. L. Ruegg. 2016.** Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls. *J Dairy Sci* 99(8):6594-6608.

**Ruest, N., G. M. Faubert, and Y. Couture. 1998.** Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Quebec. *Can Vet J* 39(11):697-700.

**Santin, M., J. M. Trout, L. Xiao, L. Zhou, E. Greiner, and R. Fayer. 2004.** Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol* 122(2):103-117.

**Seva Ada, P., M. R. Funada, L. Richtzenhain, M. B. Guimaraes, O. Souza Sde, L. Allegretti, J. A. Sinhorini, V. V. Duarte, and R. M. Soares. 2011.** Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. *Vet Parasitol* 175(1-2):27-32.

**Sudhakara Reddy, B., S. Sivajothi, and V. C. Rayulu. 2015.** Clinical coccidiosis in adult cattle. *J Parasit Dis* 39(3):557-559.

**Thivierge, K., A. Iqbal, B. Dixon, R. Dion, B. Levesque, P. Cantin, L. Cedilotte, M. Ndao, J. F. Proulx, and C. P. Yansouni. 2016.** *Cryptosporidium hominis* Is a Newly Recognized Pathogen in the Arctic Region of Nunavik, Canada: Molecular Characterization of an Outbreak. *PLoS Negl Trop Dis* 10(4):e0004534.

**Thomson, S., C. A. Hamilton, J. C. Hope, F. Katzer, N. A. Mabbott, L. J. Morrison, and E. A. Innes. 2017.** Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res* 48(1):42.

**Trotz-Williams, L. A., B. D. Jarvie, S. W. Martin, K. E. Leslie, and A. S. Peregrine. 2005.** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can Vet J* 46(4):349-351.

**Vande Velde, F., J. Charlier, and E. Claerebout. 2018.** Farmer Behavior and Gastrointestinal Nematodes in Ruminant Livestock-Uptake of Sustainable Control Approaches. *Front Vet Sci* 5:255.

**VanderWeele, T. J. and P. Ding. 2017.** Sensitivity Analysis in Observational Research: Introducing the E-Value. *Ann Intern Med* 167(4):268-274.

**Vuong, Q. H. 1989.** Likelihood Ratio Tests for Model Selection and Non-Nested Hypotheses. *Econometrica* 57(2):307-333.

**Zarlenga, D. S. and J. M. Trout. 2004.** Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Vet Parasitol* 126(1-2):195-217.

**Zechner, G., J. Jacobs, L. Goossens, G. Vertenten, and M. A. Taylor. 2016.** Prevention of coccidiosis in dairy cows. *Vet Rec* 178(16):402.

## **5 DISCUSSION**

La litière LFR s'est avérée englober de nombreux avantages potentiels, notamment le confort des vaches et la disponibilité sur le site, ce qui en fait une alternative intéressante aux systèmes plus traditionnels tels que la litière à base de paille ou de sable (Leach et al., 2015). Cependant, il existe encore de nombreuses lacunes concernant les risques potentiels pour la santé humaine et animale. Parmi ces risques, différents agents pathogènes clés (y compris les bactéries, les parasites et les virus) doivent être pris en compte lors de l'utilisation ou de la préparation du LFR (Leach et al., 2015). Par ailleurs, il est important de noter que les bactéries ont fait l'objet d'une étude approfondie dans les LFR, principalement en raison de leur lien possible avec la mammite clinique (Husfeldt et al., 2012a, Leach et al., 2015, Bradley et al., 2018, Fournel et al., 2019). En ce qui concerne les parasites, les informations sur ces agents pathogènes sont extrêmement rares dans la litière LFR, probablement en raison de leur détection complexe et de leur caractère subclinique chez les vaches laitières. De plus, à ce jour, aucun document n'a rapporté d'informations quant aux risques liés aux parasites lors de l'utilisation de la litière LFR.

Afin d'éclairer un peu les populations parasitaires présentes dans la litière LFR des fermes laitières québécoises, nous avons analysé 27 fermes utilisant la LFR et nous les avons comparées à 61 fermes utilisant une litière à base de paille. Nos résultats ont révélé la présence de parasites protozoaires et métazoaires dans les deux types de fermes. Les parasites métazoaires, tels que les vers pulmonaires et les GIN, étaient moins fréquents, principalement parce que le stade L3 (forme infectante) de ces parasites intestinaux ne peut pas terminer son cycle de vie (environ 3 semaines) dans le « cycle fermé » en raison des conditions d'humidité et de température qui leur sont défavorables dans les pâturages (Kumar et al., 2013, Auld et Tinsley, 2014). Fait intéressant, les parasites cestodes tels que *Moniezia* spp. (8/61 et 1/27, dans la litière traditionnelle et la litière LFR, respectivement) sont rarement trouvés chez des animaux confinés (Leland et al., 1973). Ces résultats laissent présager une probable contamination des exploitations via un vecteur acarien, responsable de la transmission de ce parasite. Par exemple, ce vecteur aurait pu être introduit dans la ferme, avec la litière de paille et, puis être propagé par contact direct entre les animaux (Ibarra et al., 1965, Irie et al., 2013). Bien que ce parasite ne soit pas associé à des niveaux élevés de pathogénicité, il pourrait entraîner une réduction de la productivité



et des diarrhées (Denegri et al., 1998). Ce parasite (*Moniezia expansa*) n'a été associé à une zoonose que dans un cas rare décrit en Égypte (el-Shazly et al., 2004).

Concernant les parasites protozoaires, nos analyses ont mis en évidence la présence de *Giardia spp.*, *Eimeria spp.* et *Cryptosporidium spp.* Les oocystes de *Giardia spp.* n'ont été identifiés que dans le fumier de fermes de la LFR 1/27, ce qui pourrait s'expliquer soit par une très faible prévalence dans les troupeaux du Québec, soit par la dégradation rapide des parasites dans les matières fécales (p. Ex., une semaine dans les matières fécales des bovins, selon Olson et al., 1999), empêchant ainsi la détection du parasite dans nos échantillons. Les coccidies sont présentes chez toutes les races de bovins et, bien que la maladie soit plus fréquente chez les veaux âgés de trois semaines à six mois, elle peut toucher les veaux d'un an, ainsi que les adultes (Keeton et Navarre, 2018). Nos analyses ont détecté des parasites *Eimeria spp.* dans 64% et 78-89% (selon l'échantillon analysé) de fermes utilisant la litière traditionnelle et de ferme utilisant la litière LFR, respectivement. Ces résultats sont en corrélation avec des études antérieures menées dans d'autres régions du Canada (Radostits et Stockdale, 1980, Kennedy et Kralka, 1987). Par ailleurs, notre étude de morphologie a révélé la présence de deux espèces d'*Eimeria* diarrhéiques hautement pathogènes, *E. bovis* et *E. zuernii* (Keeton et Navarre, 2018). Alors que les animaux d'âges adultes sont moins sensibles que les veaux, une infection sous-clinique chez les adultes peut provoquer une perte d'appétit et une perte d'efficacité de l'alimentation due aux dommages intestinaux, ce qui entraîne des taux de croissance médiocres et une diminution de gain de poids. Fait important, selon les très faibles numérations médianes d'œufs observées dans cette étude (moins de 11 oocystes pour 6 g de matériau [Tableau 2]), nous ne prévoyons pas d'infection importante à partir de la litière. De plus, les oocystes d'*Eimeria spp.* ne sont pas immédiatement infectieux et nécessitent du temps (1 à 21 jours) et des conditions environnementales correctes pour sporuler jusqu'à la forme infectante, ce qui était introuvable dans les LFR (Waldenstedt et al., 2001, Pyziel et Demiaszkiewicz, 2015). Nos résultats ont révélé une augmentation significative du nombre d'oocystes d'*Eimeria spp.* présents dans la litière LFR avant utilisation (Tableau 2). Deux explications peuvent soutenir ces résultats. En effet, la présence des oocystes d'*Eimeria spp.* peut être due d'une part, à une contamination par des coccidies autres que du bétail (rongeurs, oiseaux, etc.), et d'autre part, à une recontamination de la LFR induite par l'utilisation des

eaux usées de nettoyage et/ou l'eau provenant du fumier pour la réhydratation de la fraction solide avant de l'extraction du liquide.

Des parasites *Cryptosporidium* spp. ont été trouvés dans 50% et 85 à 93% (en fonction de l'échantillon analysé) des fermes de litière traditionnelles et des fermes LFR, respectivement (Tableau 1). Ces chiffres élevés concordent avec ceux d'autres études faisant état de valeurs de prévalence allant de 55% à 100% dans les troupeaux canadiens (Olson et coll., 1997b, Budu-Amoako et coll., 2012a). Une PCR nichée ciblant le gène SSU suivie d'un séquençage a révélé la présence d'une co-infection par différentes espèces de *Cryptosporidium* spp. Ces résultats ont ensuite été explorés au moyen d'une approche RFLP permettant d'identifier trois espèces : *C. parvum*, *C. andersoni* et *C. meleagridis*.

*Cryptosporidium parvum*, responsable d'une diarrhée aiguë, a été trouvé classiquement chez des veaux présevrés. Plus précisément, nos résultats ont révélé la présence de *C. parvum* dans 32/61 fermes traditionnelles et 24/27 fermes LFR, ce qui est en corrélation avec des études antérieures menées en Colombie-Britannique (59% des 386 veaux laitiers dans 20 fermes) (Olson et al., 1997a). Dans le sud-ouest de l'Ontario (40,6% des 500 veaux laitiers dans 51 fermes) (Trotz-Williams et al., 2005) et au Québec (88% des 505 fermes laitières) (Ruest et al., 1998).

De manière générale, le bétail a souvent été associé à la transmission zoonotique de *C. parvum* (Robertson et al., 2010, Gormley et al., 2011, Pumipuntu et Piratae, 2018). Cette association repose notamment sur le fait que les éleveurs et les professionnels de santé sont en contact avec les animaux et/ou leurs excréments, ce qui représente un risque important de contamination (Pohjola et al., 1986, Gait et al., 2008, Grinberg et al., 2011). De plus, il semblerait que l'Île-du-Prince-Édouard (Canada) a signalé une voie indirecte de transmission zoonotique de bovins à l'homme induite par des sources d'eau contaminées, dans laquelle des cas humains de cryptosporidiose étaient liés par des approches moléculaires aux fermes d'élevage (Budu-Amoako et al., 2012a, Budu-Amoako et al., 2012b). Ces deux voies de transmission pourraient être favorisées lors de l'utilisation d'une LFR non analysée. De manière cruciale, nous avons trouvé des oocystes de *C. parvum*, après toutes les étapes de la préparation du système LFR, ce qui montre que ce processus n'a aucun effet potentiel sur la réduction du nombre total de parasites (tableau 2). Dans cette étude, nous n'avons pas évalué l'infectivité des oocystes (par exemple, les infections

à BALB / c sont considérées comme le « test de référence »). Cependant, la résistance des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement (Carmena et al., 2007, Peng et al., 2008), couplée au fait que les exploitations 24/27 LFR ont simplement extrait une fraction du liquide puis laissé la fraction solide mûrir en tas ou un conteneur pour différentes périodes (sans aucun contrôle de température ou de seuil de temps), amène à l'hypothèse que la plupart des oocystes restent toujours infectieux. Cela pourrait avoir deux implications majeures : i) dans des conditions non standardisées, telles que celles des fermes de 24/27 LFR rapportées ici, la LFR ne devrait pas être utilisée pour les veaux. En effet, plusieurs études ont montré que l'âge est associé à l'infection à *Cryptosporidium* spp., les jeunes veaux constituant la population la plus exposée au risque d'infection (Santin et al., 2004, Maddox-Hyttel et al., 2006, Fayer et al., 2007); et ii) puisque *C. parvum* peut infecter l'homme par contact fécal oral ou par des particules de poussière en suspension dans l'air (Balderrama-Carmona et al., 2014) à des doses aussi faibles que 10 à 30 oocystes (Messner et Berger, 2016), la médiane estimée de la numération des oocystes de *Cryptosporidium* spp. (IC 95%) observée pour 6 g de la litière LFR avant utilisation (19,1 [7,3, 50.]) montre un risque potentiel d'infection zoonotique lors de l'utilisation de cette LFR. Un meilleur protocole, comprenant un processus de compostage formellement établi pour assurer l'inactivation de ces parasites, devrait être mis en œuvre dans ces fermes LFR.

*Cryptosporidium andersoni* (anciennement, *C. muris*) a été détecté dans 31% et 74% des exploitations traditionnelles utilisant la LFR, respectivement. Plus précisément, *C. andersoni* a été décrit comme l'une des espèces de *Cryptosporidium* les plus fréquentes chez les bovins au Canada (Budu-Amoako et al., 2012a) et dans le monde entier (Robertson et al., 2014). Ce parasite infecte la glande gastrique de l'abomasum des veaux plus âgés et sevrés et des adultes. Par ailleurs, il est important de noter que *C. andersoni* aurait réduit la production du lait chez les vaches laitières d'environ 13% (Esteban et Anderson, 1995, Anderson, 1998). Mais malheureusement, même si ce parasite peut avoir un impact sur la production laitière, en raison de notre conception expérimentale contenant des données ponctuelles uniques par exploitation, nous n'avons pas pu évaluer l'impact potentiel de *C. andersoni* dans aucun de ces deux systèmes de litière. C'est pourquoi il serait judicieux que les futures études ciblent formellement ce problème et déterminent si la proportion la plus élevée de *C. andersoni* dans les exploitations LFR est significative, et si cela provoque

une réduction de production à la fois au niveau de l'animal et du troupeau. Enfin, le parasite zoonotique *C. meleagridis* à un large éventail d'hôtes, incluant le bétail, mais il infecte principalement les oiseaux (Gong et al., 2017). Ceci laisse penser que le transport accidentel est possible plutôt qu'une infection réelle, par exemple l'ingestion d'oocystes qui passent intacts dans le tractus gastro-intestinal ou encore la contamination de l'environnement par des oiseaux sauvages en liberté (Seva Ada et al., 2011).

Le lait cru et les produits à base de lait cru sont à l'origine de plusieurs cas de cryptosporidiose humaine, principalement de *C. parvum* (Laberge et al., 1996, Djuretic et al., 1997, Harper et al., 2002). Positivement, malgré la prévalence relativement élevée de *Cryptosporidium* spp. dans la LFR, aucun parasite n'a été récupéré dans le lait en vrac provenant de fermes utilisant ce système de litière (ni dans les systèmes traditionnels). Ainsi, la possibilité d'une contamination de la glande mammaire ou d'une infection du lait lors de la récolte est écartée.

Cette étude représente la première tentative d'évaluation de la charge parasitaire dans les fermes de la province de Québec (Canada) en utilisant la LFR comme litière. Malgré les limitations évoquées ci-dessus, nos résultats montrent que la LFR ne semble pas avoir réduire la diversité ou la fréquence des parasites. Cependant, les stratégies actuelles « non standardisées » de préparation de la LFR ne garantissent pas la destruction des parasites protozoaires, car les oocystes sont présents à chaque étape de la préparation / transformation de la LFR. De manière générale, compte tenu de nos résultats concernant la prévalence relativement élevée de parasites *Cryptosporidium* spp., y compris de l'agent zoonotique *C. parvum*, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour évaluer le pouvoir infectieux des oocystes et quantifier le risque de transmission d'un animal à l'autre (en particulier lorsque la LFR est utilisée pour les veaux). Dans la même optique, le risque d'infection des ouvriers agricoles ainsi que le risque d'infection lié à l'approvisionnement en eau sont des aspects importants qui devraient également faire l'objet de travaux supplémentaires.

## **6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSIONS

- Notre travail de recherche est le premier à démontrer la présence de parasites protozoaires dans les solides de fumier qui sont utilisés comme litière chez les bovins.
- Les approches actuelles pour la préparation de la litière recyclée à base de solides de fumier au Québec ne garantissent pas la destruction des éléments parasitaires. En effet, notre étude a démontré qu'ils sont présents dans toutes les étapes d'obtention de la litière.
- La présence de ces parasites représente un risque pour la santé des animaux, surtout pour les plus jeunes, ainsi que pour la santé des travailleurs des fermes utilisant du fumier recyclé comme litière, principalement à cause de la présence du parasite protozoaire zoonotique *Cryptosporidium parvum*.
- Nos études moléculaires ont démontré que les parasites du genre *Cryptosporidium* sont très répandus au Québec. En effet, nous avons montré que ce parasite est significativement plus présent dans les fermes utilisant les solides de fumier comme litière recyclée, comparativement aux autres fermes où il est presque 2 fois moins fréquent.
- Finalement, nous avons évalué la présence d'éléments parasitaires dans le lait des différentes fermes. Nous avons constaté l'absence de parasites dans le réservoir de lait dans les deux types de fermes, ce qui démontre que, malgré la présence de parasites protozoaires dans le fumier et dans la litière recyclée, il n'y a peu de risque de contamination de la glande mammaire ou du lait.

## PERSPECTIVES

- La litière recyclée, au Québec, est produite par séparation des solides du fumier parfois sans transformation subséquente, ce qui pourrait expliquer les hauts niveaux de parasites protozoaires. Des études futures ciblant des fermes utilisant la séparation des solides du fumier dans un digesteur anaérobie ou dans un composteur à tambour, sera nécessaire pour possiblement établir un meilleur protocole en termes de prévention du parasitisme.
- Des travaux supplémentaires seront aussi nécessaires pour évaluer le pouvoir infectieux des oocystes et quantifier le risque de transmission d'un animal à l'autre (en particulier lorsque la LFR est utilisée pour les veaux).
- De manière générale, le bétail a souvent été associé à la transmission zoonotique de *Cryptosporidium parvum*. Des études épidémiologiques visant des populations humaines en contact direct et/ou indirect avec des fermes laitières pourraient nous permettre d'élucider la circulation zoonotique de différentes souches de *Cryptosporidium parvum* au Québec, ainsi que de mieux connaître des facteurs de risque pour la transmission de ce pathogène.
- Finalement, des études ciblant des animaux individuels seront nécessaires pour éclaircir et mieux connaître le lien entre les hauts niveaux de parasitisme (*Cryptosporidium* spp. principalement) et des possibles pertes économiques causées par des infections sous-cliniques.

## **7 BIBLIOGRAPHIE**



- Abeywardena, H., Jex, A.R., Nolan, M.J., Haydon, S.R., Stevens, M.A., McNulty, R.W. et Gasser, R.B. 2012.** Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves : discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. *Infect. Genet. Evol.* 12 : 1984-1993.
- Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M.Q., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu., P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B.A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L. et Kapur, V. 2004.** Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304 : 441-445.
- Adamski, M., Glowacka, K., Kupczynski, R. et Benski, A., 2011.** Analysis of the possibility of various litter beddings application with special consideration of cattle manure separate. *Acta Scientiarum Polonorum : Zootechnica* 10 : 5-12.
- Akiyoshi, D.E., Dilo, J., Pearson, C., Chapman, S., Tumwine, J. et Tzipori, S. 2003.** Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passed through different host species. *Infect. Immun.* 71 (4) : 1828-1832.
- Al-Brikan, F.A., Salem, H.S., Beeching, N. et Hilal, N. 2008.** Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from Saudi Arabia. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 38 : 645-658.
- Al-Harthi, S.A. 2004.** Prevalence of intestinal parasites in schoolchildren in Makkah, Saudi Arabia. *New Egypt. J. Med.* 31 : 37-43.
- Al-Mekhlafi, H.M., Mahdy, M.A., Azlin, M.Y., Fatmah, M.S. et Norhayati, M. 2011.** Childhood *Cryptosporidium* infection among aboriginal communities in Peninsular Malaysia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 105 (2) : 135-143.
- Almada, A. 2015.** Parasitosis : pérdidas productivas e impacto económico. *Boletín técnico. Merial Latam* : 7.
- Anderson, B.C. 1998.** Cryptosporidiosis in bovine and human health. *J. Dairy Sci.* 81 (11) : 3036-3041.
- Angelet, J.C. 1985.** Evolució de la fracció orgànica d'un femer durant la fermentació. *Quaderns agraris* (6), (ICEA) ISSN 0213-0319 : 23-28.
- Angus, K.W., Dubey, J.P., Speer C.A. et Fayer, R. 1990.** Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press ed. Boston : 5, Cryptosporidiosis in ruminants : 83-103.
- Aarnaes, S.L., Blanding, J., Speier, S., Forthal, D., de la Maza, L.M. et Peterson, E.M. 1994.** Comparison of the ProSpecT and Color Vue enzyme-linked immunoassays for the detection of *Cryptosporidium* in stool specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 19 (4) : 221-225.
- Atías, A. 1998.** Parasitología Médica. 1ª ed. Mediterráneo. Santiago, Chile : 146-151.
- Atwill, E.R., Johnson, E.M. et Pereira, M.G. 1999.** Association of herd composition, stocking rate, and duration of calving season with fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215 (12) : 1833-1838.

**Auld, S.K. et Tinsley, M.C. 2014.** The evolutionary ecology of complex lifecycle parasites : linking phenomena with mechanisms. *Heredity* 114 : 125.

**Baillargeon, J. 2004.** Étude sur la contamination du colostrum bovin par des ookystes de *Cryptosporidium parvum*. Mémoires présenté à la Faculté des Études Supérieures. Département de Sciences cliniques. Faculté de Médecine Vétérinaires. Université de Montréal. Canada : 1-114.

**Balderrama-Carmona, A.P., Gortares-Moroyoqui, P., Alvarez-Valencia, L.H., Castro-Espinoza, L., Mondaca-Fernandez, I., Balderas-Cortes Jde, J. Chaidez-Quiroz, C. et Meza-Montenegro. M.M. 2014.** Occurrence and quantitative microbial risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in soil and air samples. *Int. J. Infect. Dis.* 26 : 123-127.

**Barer, M.R et Wright, A.E. 1990.** *Cryptosporidium* and water. *Lett. Appl. Microbiol.* 11 : 271-277.

**Barker, I. 1973.** A study of the pathogenesis of *Trichostrongylus colubriformis* in lambs with observation on the contribution of gastrointestinal plasma loss. *Int. J. Parasit* 3 : 743-757.

**Barriga, O. 2002.** Las Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos en la América Latina. 1<sup>a</sup> ed. Germinal. Santiago, Chile. 119-121.

**Besier, R.B. et Love, S.C.J. 2003.** Anthelmintic resistance in sheep nematodes in Australia : the need for new approaches. *Aust. J. Exp. Agric.* 43 : 1383-1391.

**Bewley, J.M., Robertson, L.M. et Eckelkamp, E.A. 2017.** A 100-Year Review : Lactating dairy cattle housing management. *J Dairy Sci* 100 (12) : 10418-10431.

**Bishop, J.R., Janzen, J.J., Bodine, A.B., Caldwell, C.A. et Johnson, D.W., 1981.** Dry waste solids as a possible source of bedding. *Journal of Dairy Science.* 64 : 706-711.

**Blagburn, B.L. et Soave, R. 1997.** Prophylaxis and chemotherapy : human and animal. In : Fayer R (ed) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Florida : 111-128.

**Boch, J. et Supperer, R. 1982.** Parasitología en Medicina Veterinaria. Editorial hemisferio sur. Buenos Aires.

**Bonhotal, J., Schwarz, M. et Stehman, S.M., 2011.** How *Mycobacterium avium paratuberculosis* is affected by the composting process. *Trends in Animal and Veterinary Sciences* 2 : 5-10.

**Bonnin, A., Fourmaux, M.N., Dubremetz, J.F, Nelson, R.G., Gobet, P., Harly, G., Buisson, M., Puygauthier-Toubas D, Gabriel-Pospisil G, Naciri, M., et Camerlinck, P. 1996.** Genotyping human and bovine isolates of *Cryptosporidium parvum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a repetitive DNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 137 (2-3) : 207-211.

**Botero, D. et Restrepo, M. 2003.** Parasitosis humanas. 4<sup>a</sup> ed. Editorial CIB. Medellín, Colombia. 506.

**Bowman, D.D. 2009.** Georgi's parasitology for veterinarians. 7th ed., W.B. Saunders Elsevier, Philadelphia.

**British Columbia Ministry of Health Planning. 2001.** Drinking Water Quality in British Columbia : The public health perspective. Annual Report 2000.

**Budu-Amoako, E., Greenwood, S.J. Dixon, B.R. Barkema, H.W. et McClure. J.T. 2012a.** *Giardia* and *Cryptosporidium* on dairy farms and the role these farms may play in contaminating water sources in Prince Edward Island, Canada. J Vet Intern Med 26 (3) : 668-673.

**Budu-Amoako, E., Greenwood, S.J., Dixon, B.R., Sweet, L., Ang, L., Barkema, H.W., et McClure. J.T. 2012b.** Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* in humans 25 on Prince Edward Island, Canada : evidence of zoonotic transmission from cattle. Zoonoses Public Health 59 (6) : 424-433.

**Bramley, A.J. et Neave, F.K., 1975.** Studies on the control of coliform mastitis in dairy cows. British Veterinary Journal 131 : 160-169.

**Bradley, A.J., Leach, K.A., Archer, S.C., Breen, J.E., Green, M.J., Ohnstad, I. et Tuer, S., 2014.** Scoping Study on the Potential Risks (and Benefits) of Using Recycled Manure Solids as Bedding for Dairy Cattle. Report. prepared for Dairy Co. : 1-15.

**Bradley, A.J., Leach, K.A., Green, M.J., Gibbons, J., Ohnstad, I.C., Black, D.H., Payne, B., Prout, V.E. et Breen. J.E. 2018.** The impact of dairy cows' bedding material and its microbial content on the quality and safety of milk – A cross sectional study of UK farms. International Journal of Food Microbiology 269 : 36-45.

**Brasseur, P. 1997.** Waterborne cryptosporidiosis : a major environmental risk. J. Eukaryot. Microbiol. 44 (6) : 67S-68S.

**Brenninkmeyer, C., Dippel, S., Brinkmann, J., March, S., Winckler, C. et Knierim, U., 2013.** Hock lesion epidemiology in cubicle housed dairy cows across two breeds, farming systems and countries. Preventive Veterinary Medicine 109 : 236-245.

**Bukhari, Z., Hargy, T.M, Bolton, J.R., Dussert, B. et Clancy, J.L. 1999.** Medium-pressure UV for oocyst inactivation. J. Amer. Wat. Works Assoc. 91 : 86-94.

**Cabada, M.M. et White, A.C. 2010.** Treatment of cryptosporidiosis : do we know what we think we know ? Curr. Opin. Infect. Dis. 23 : 494-499.

**Cacciò, S.M. et Widmer, G. 2014.** Editors. *Cryptosporidium* : parasite and disease. Springer Wien Heidelberg New York Dordrecht London : 1-542.

**Cacciò, S.M., Pozio, E., Guarino, A. et Albano, F. 2009.** Long-term consequences of *Cryptosporidium* infections in immunocompetent and immunodeficient individuals. In : Fratamico, P.M., Smith, J.L., Brogden, K.A. (eds). Sequelae and long-term consequences of infectious diseases. A.S.M. Press, Washington, DC : 245-257.

**Campbell, I., Tzipori, A.S., Hutchison, G. et Angus, K.W. 1982.** Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. Vet. Rec. 111 (18) : 414-415.

- Carey, C.M., Lee, H. et Trevors, J.T. 2004.** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.* 38 (4) : 818-862.
- Carmena, D., Aguinagalde, X., Zigorraga, C., Fernandez-Crespo, J.C. et Ocio, J.A. 2007.** Presence of Giardia cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *J Appl Microbiol* 102 (3) : 619-629.
- Carroll, E.J. et Jasper, D.E. 1978.** Distribution of *Enterobacteriaceae* in recycled manure bedding on California dairies. *Journal of Dairy Science* 61, 1498-1508.
- Casemore, D.P. 1985.** Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J.Clin.Pathol.* 38(12) : 1337-1341.
- Casemore, D.P. 1990.** Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.* 104 : 1-28.
- Castro-Hermida, J.A., Gonzalez-Losada, Y.A., Mezo-Menendez, M., Ares-Mazas, E. 2002.** A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet Parasitol.* 106 (1) : 11-17.
- Centre canadien d'information laitière. 2016.** Aperçu de l'industrie laitière canadienne. Agriculture et agroalimentaire Canada. Gouvernement du Canada : 1-7.
- Chappel, C., Okhuysen, P.C., Langer-Curry, R.C., Akiyoshi, D.E., Widmer, G. et Tzipori, S. 2011.** *Cryptosporidium meleagridis* : infectivity in healthy adult volunteers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Doi : 10.4269/ajtmh.2011.10-0664. 85 (2) : 238-242.
- Chappel, C., Okhuysen, P.C., Langer-Curry, R.C., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S. et Tzipori, S. 2006.** *Cryptosporidium hominis* : experimental challenge of healthy adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75 (5) : 851-857.
- Charlier, J., Thamsborg, S.M., Bartley, D.J., Skuce, P.J., Kenyon, F., Geurden, T., Hoste, H., Williams, A.R., Sotiraki, S., Höglund, J., Chartier, C., Geldhof, P., Van Dijk, J., Rinaldi, L., Morgan, E.R., von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruyse, J. et Claerebout, E. 2017.** Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Wiley Transboundary and Emerging Diseases. Discontools Supplement.* DOI : 10.1111/tbed.12707 : 1-18.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P. et Vercruyse, J. 2014.** Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in Parasitology*, 30 : 361-367.
- Chen, X.M. et LaRusso, N.F. 2000.** Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 118 (2) : 368-379.
- Chen, X.M., Keithly, J.S., Paya, C.V. et LaRusso, N.F. 2002.** Cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 346 (22) : 1723-1731.
- Cole, K.J. et Hogan, J.S. 2016.** Short communication : Environmental mastitis pathogen counts in freestalls bedded with composted and fresh recycled manure solids. *J Dairy Sci* 99 (2) : 1501-1505.

**Coles, G.C. 2002.** Sustainable use of anthelmintics in grazing animals. *Veterinary Record* 151 : 165-169.

**Commission canadienne du lait.** [www.cdc-ccl.gc.ca](http://www.cdc-ccl.gc.ca)

**Coop, R.L. et Kyriazakis, I. 1999.** Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology*, 84 : 187-204.

**Cordero del Campillo, M., Rojo, F.A., Martinez, A.R., Sanchez, C., Hernandez, S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H., Carvalho, M. 2007.** *Parasitología general*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España : 39.

**Cordero del Campillo, M., Rojo, F.A., Martínez, A.R., Sánchez, C., Hernández, S., Navarrete, I., Diaz, P., Quiroz, H. et Caralho, M. 1999.** *Parasitología veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España : 1-968.

**Cornell Waste Management Institute. 2010.** Use of dried manure solids as bedding for dairy cows and “How frequently should stalls be refreshed with new bedding” case study. Department of Crop & Soil Sciences. Rice Hall. Ithaca, NY 14853. 607-255-1187 : 1-9.

**Craig, T.M. 2018.** Gastrointestinal nematodes, diagnosis and control. *Vet. Clin. North Am. Food anim. Pract.* 34 (1): 185-199.

**Craik, S.A., Weldon, D., Finch, G.R., Bolton, J.R. et Belosevic, M. 2001.** Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. *Wat. Res.* 35 : 1387-1398.

**Crésol (Meta-).** CNESST - Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail - [https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no\\_produit=2907&no\\_seq=2](https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no_produit=2907&no_seq=2)

**Crésol (Ortho-).** CNESST - Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail - [https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no\\_produit=2915&no\\_seq=1](https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/Pages/fiche-complete.aspx?no_produit=2915&no_seq=1)

**Crésol (Para-).** CNESST - Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail - [https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/pages/fiche-complete.aspx?no\\_produit=2931](https://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/pages/fiche-complete.aspx?no_produit=2931)

**Current, W.L. et Garcia, L.S. 1991.** Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 (3) : 325-358.

**Current, W.L., Reese, N.C., Ernst, J.V. Bailey, W.S., Heyman, M.B. et Weinstein, W.M. 1983.** Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N. Engl. J. Med.* 308 (21) : 1252-1257.

**Damour, F. 2015.** Recueil des techniques du laboratoire de parasitologie. Service de diagnostic Faculté de médecine vétérinaire. PON-PAR-001 (4) : 19-22.

**Dauguschies, A. 2011.** *Cryptosporidium parvum* : The Veterinary Perspective. Progress in Parasitology, Parasitology Research Monographs 2. H. Mehlhorn (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 69-78.

- Davies, A.P., Campbell, B., Evans, M.R., Bone, A., Roche, A. et Chalmers, R.M. 2009.** Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United Kingdom. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28 (9) : 838-840.
- De Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H. et Peeters J.E. 1999.** A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 29 (8) : 1269-1287.
- De la Fuente, R., Garcia, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Luzon, M., Cid, D., Garcia, S., Orden, J.A. et Gomez-Bautista, M. 1998.** Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev. Vet. Med.* 36 (2) : 145-152.
- Del Coco, V.F., Córdoba, M.A. et Basualdo, J.A. 2009.** Criptosporidiosis : una zoonosis emergente. *Rev. Argent. Microbiol.* 41 : 185-196.
- Denegri, G., Bernadina, W. Perez-Serrano, J. et Rodriguez-Caabeiro. F. 1998.** Anoplocephalid cestodes of veterinary and medical significance : a review. *Folia Parasitol (Praha)* 45 (1) : 1-8.
- Deng, M.Q. et Cliver, D.O. 1999.** *Cryptosporidium parvum* studies with dairy products. *Int. J. Food. Microbiol.* 46 (2) : 113-121.
- Di Pinto, A. et Tantillo, M.G. 2002.** Direct detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction in raw milk. *J. Food Prot.* 65 (8) : 1345-1348.
- Djuretic, T., Wall, P.G. et Nichols, G. 1997.** General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 7 (3) : R41-45.
- Driehuis, F., Lucas-van den Bos, E. et Wells-Bennik, M.H.J. 2012.** Risico's van Microbiële Contaminanten van Strooisels : Compost, Gescheiden Mest, Paardenmest en Vrijloopstallen. (Risks of Microbial Contaminants of Bedding Materials : Compost, Cattle Manure Solids, Horse Dung and Bedded Pack Barns). NIZO Report E2012\_119. NIZO Food Research BV, Ede, The Netherlands.
- Driehuis, F., Lucas-van den Bos, E. et Wells-Bennik, M.H.J., 2014.** Sporen van Thermofiele Aërobe Sporevormers in Compost en Andere Beddingmaterialen Bij Melkveebedrijven Met Een Vrijloop- of Ligenboxenstal. (Spores of Thermophilic Aerobic Sporeformers in Compost and Other Bedding Materials Used by Dairy Farmers with a Bedded Pack or Freestall Barn). NIZO-Rapport E 2014/045. NIZO Food Research BV, Ede, The Netherlands.
- Dupont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., et Jakubowski, W. 1995.** The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332 (13) : 855-859.
- el-Shazly, A.M., Morsy, T.A. et Dawoud. H.A. 2004.** Human *Moniezia expansa* : the first Egyptian parasitic zoonosis. *J Egypt Soc Parasitol* 34 (2) : 515-518.

- Endres, M.I., Husfeldt, A.W., 2012.** Recycled Manure Solids for Bedding : Does it Work ? University of Minnesota, St. Paul, 55108 : 1-4.
- Entrocasso, C. 1988.** Epidemiology and control of bovine Ostertagiasis in South America, Vet. Parasitol. 27 : 59-65.
- Esteban, E. et Anderson., B.C. 1995.** *Cryptosporidium muris* : prevalence, persistency, and detrimental effects on milk production in a drylot dairy. Journal of Dairy Science. 78 : 1068-1072.
- Esteban, J.G., Aguirre, C., Flores, A., Strauss, W., Angles, R. et Mas-Coma, S. 1998.** High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern Bolivian Altiplano. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58 (1) : 50-55.
- European Commission, 2009.** Regulation of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal byproducts and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No1774/2002 (Animal byproducts Regulation), 2009/1069/EC. Official Journal L300 : 1-33.
- Fall, A., Thompson, R.C., Hobbs R.P. et Morgan-Ryan, U. 2003.** Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. J Parasitol 89 : 399–402.
- Faubert, G.M. et Litvinsky, Y. 2000.** Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. J.Parasitol. 86 (3) : 495-500.
- Fayer, R. 2004.** *Cryptosporidium* : a water borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126 : 37-56.
- Fayer, R. 2010.** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Exp Parasitol 124 : 90–97.
- Fayer, R., Andrews, C., Ungar, B.L. et Blagburn, B. 1989.** Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. J.Parasitol. 75 : 393-397.
- Fayer R. et Ungar B.L.P. 1986.** *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. Microbiol. Rev. (4) : 458-483.
- Fayer R, et Xiao L. 2008.** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. 2nd ed. USA : CRC Press : 560.
- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S. et Zarlenga, D. 1998.** *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates : dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. Int.J.Parasitol. 28 (1) : 49-56.
- Fayer, R., Morgan, U. et Upton, S.J. 2000.** Epidemiology of *Cryptosporidium* : transmission, detection, and identification. Int.J.Parasitol. 30 : 1305-1322.
- Fayer, R., Santin, M. et Trout, J.M. 2007.** Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. Vet Parasitol 145 (3-4) : 260-266.

- Fayer, R., Santín, M. et Xiao, L. 2005.** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa : *Cryptosporidiidae*) in cattle (*Bos taurus*). J. Parasitol. 91 : 624–629.
- Fayer, R., Speer, C.A. et Dubey J.P. Editors. 1990.** Cryptosporidiosis of man and animals. Boca Raton, FL : CRC Press. 1. General Biology of *Cryptosporidium* : 1-29.
- Fayer, R., Speer, C.A., Dubey, J.P., Fayer, R., Speer, C.A. et Dubey, J.P. Editors. 1990.** Cryptosporidiosis of man and animals. Boca Raton, FL : CRC Press ; 1, General Biology of *Cryptosporidium* : 1-29.
- Feiken, M. et Van Laarhoven, W., 2012.** Verslag van een praktijkonderzoek naar het gebruik van vaste fractie uit gescheiden mest als boxbeddingsmateriaal in ligboxen voor melkvee. English version 2014 : Recycled manure solids (RMS) as biobedding in cubicles for dairy cattle. Considerations and tips for practice. Valacon Dairy : 1-20.
- Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V. et Xiao, L. 2007.** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. Vet. Parasitol. 144 : 1–9.
- Feng, Y., Yang, W., Ryan, U., Zhang, L., Kváč, M., Koudela, B., Modrý, D., Li, N., Fayer, R. et Xiao, L. 2011.** Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. J Clin Microbiol. 49 : 34–41.
- Foreyt, W.J. 2003.** Veterinary Parasitology, Reference Manuel, 5e ed.
- Fournel, S., Godbout, S., Ruel, P., Fortin, A., Genereux, M., Cote, C., Landry, C., et Pellerin, D. 2019.** Production of recycled manure solids for bedding in Canadian dairy farms : I. Solid-liquid separation. J Dairy Sci 102(2) : 1832-1846.
- Fredes, F., Raffo, E. et Muñoz, P. 2007.** First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in stool of Adelie penguin from the Antarctic using acid-fast stain. Antarct. Sci. 19 : 437-438.
- Gait, R., Soutar, R.H., Hanson, M, Fraser, C. et Chalmers, R. 2008.** Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. Vet. Rec. 162 (2) : 843-845.
- Garcia, L.S., Brewer, T.C. et Bruckner DA. 1987. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. J.Clin.Microbiol. 19(1): 119-21.
- Garza Almanza, V. et Molaes Vallarta, M. 2002.** Agua y salud : *Cryptosporidium parvum*, agente causal de una nueva enfermedad relacionada con el agua. Rev. Salud Pública Nutr. 3 (1) : 2-7.
- Gasser, R.B. 2006.** Molecular tools—advances, opportunities and prospects. Vet. Parasitol 136 : 69–89.
- Gatei, W., Ashford, R.W., Beeching, N.J., Kamwati, S.K., Greensill, J. et Hart, C.A. 2002.** *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. Emerg. Infect. Dis. 8 : 204–206.
- Gatei, W., Greensill, J., Ashford, R.W., Cuevas, L.E., Parry, C.M., Cunliffe, N.A., Beeching, N.J. et Hart, C.A. 2003.** Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus



infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 41 : 1458–1462.

**Gatei, W., Wamae, C.N., Mbae, C. Waruru, A. Mulinge, E. Waithera, T., Gatika, S.M. Kamwati, S.K, Revathi, G. et 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.

**Gómez Arriagada, C. A. 2000.** Helminthos gastrointestinales en bovinos de la décima región de Chile. Tesis de grado presentada a la Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Patología Animal. Requisito para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria en la Universidad Austral de Chile. 1-41.

**Gong, C., Cao, X.F., Deng, L., Li, W., Huang, X. M., Lan, J.C., Xiao, Q.C., Zhong, Z.J., Feng, F., Zhang, Y., Wang, W.B., Guo, P., Wu, K.J. et Peng, G. N. 2017.** Epidemiology of *Cryptosporidium* infection in cattle in China : a review. *Parasite* 24 : 1.

**Gookin, J.L, Nordone, S.K., et Argenzio, R.A. 2002.** Host responses to *Cryptosporidium* infection. *J. Vet. Intern. Med.* 16 : 12-21.

**Gormley, F.J., Little, C.L., Chalmers, R.M., Rawal, N., Adak, G.K. 2011.** Zoonotic cryptosporidiosis from petting farms, England and Wales, 1992–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (1) : 151-152.

**Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., Fayer, R. et Bixier, H. 1999.** House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 61 (3) : 500-4.

**Grinberg, A., Pomroy, W.E., Squires, R.A. Scuffham, A., Pita, A. et Kwan, E. 2011.** Retrospective cohort study of an outbreak of cryptosporidiosis caused by a rare *Cryptosporidium parvum* subgenotype. *Epidemiol. Infect.* 139 (10) : 1542-1550.

**Guerrant, D.I., Moore, S.R., Lima, A.A., Patrick, P.D., Schorling, J.B. et Guerrant, R.L. 1999.** Association of early childhood diarrhoea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 61 : 701-713.

**Guerrant, R.L. 1997.** Cryptosporidiosis : an emerging highly infectious threat. *Emerg Infect Dis*, 3(1) : 51-57.

**Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Lelièvre, E., Sarfati, C., Rabodonirina, M., Nevez, G. Cailliez, J.C., Camus, D. et Dei-Cas, E. 2001.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 3472–3480.

**Habing, G.G., Lombard, J.E., Koprak, C.A., Dargatz, D.A. et Kaneene, J.B., 2012.** Farm-level associations with the shedding of *Salmonella* and antimicrobial-resistant *Salmonella* in U.S. dairy cattle. *Foodborne Pathogens and Disease* 9 : 815–821.

**Hallier-Soctlier, S. et Guillot, E. 2000.** Detection of cryptosporidia and *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction. *J.Appl.Microbiol.* : 89 (1) : 5-10.

- Hanscheid, T., Cristino, J.M. et Salgado, M.J. 2008.** Screening of auramine-stained smears of all fecal samples is a rapid and inexpensive way to increase the detection of coccidial infections. *Int J Infect Dis.* 12 : 47-50.
- Harper, C.M., Cowell, N.A., Adams, B.C., Langley, A.J. et Wohlsen. T.D. 2002.** Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 26 (3) : 449-450.
- Harrison, E., Bonhotal, J. et Schwartz, M., 2008.** Using Manure Solids as Bedding. Final Report. Cornell Waste Management Institute, Ithaca, NY. <http://cwmi.css.cornell.edu/beddingfinalreport.pdf>.
- Heine J. 1982.** A simple technic for the demonstration of cryptosporidia in feces. *Zentralbl.Veterinarmed.B.* 9 (4) : 324-327.
- Heinonen-Tanski, H., Mohaibes, M., Karinen, P. et Koivunen, J., 2006.** Methods to reduce pathogen microorganisms in manure. *Livestock Science* 102 : 248–255.
- Hellard, M.E., Sinclair, M.I., Hogg, G.G. et Fairley, C.K. 2000.** Prevalence of enteric pathogens among community based asymptomatic individuals. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (3) : 290–293.
- Hippen, A., Garcia, A., Hammink, W. et Smith, L., 2007.** Comfort and Hygiene of Dairy Cows Lying on Bedding of Dolomitic Limestone or Reclaimed Manure Solids. In : Proceedings of the 6th International Dairy Housing Conference, Minneapolis, USA, 16–18 : 27–33.
- Hogan, J.S., Bogacz, V.L., Thompson, L.M., Romig, S., Schoenberger, P.S., Weiss, W.P. et Smith, K.L. 1999.** Bacterial counts associated with sawdust and recycled manure bedding treated with commercial conditioners. *J Dairy Sci* 82(8) : 1690-1695.
- Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L., et al., 1989.** Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *Journal of Dairy Science* 72 : 250–258.
- Hoste, H. et Torres-Acosta, J.F. 2011.** Non chemical control of helminths in ruminants : adapting solutions for changing worms in a changing world. *Vet Parasitol* 180 : 144–154.
- Howe, A.D., Forster, S., Morton, S., Marshall, R., Osborn, K.S., Wright, P. et Hunter, P.R. 2002.** *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. *Emerg.Infect.Dis.* 8 (6) : 6 19-24.
- Hunter, P.R. et Syed, Q. 2001.** Community surveys of self-reported diarrhea can dramatically overestimate the size of outbreaks of waterborne cryptosporidiosis. *War. Sci. Technol.* 43 : 27-30.
- Hunter, P.R., Hadfield, S.J., Wilkinson, D., Lake, I.R., Harrison, F.C. et Chalmers, R.M. 2007.** Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerg Infect Dis* 13 : 82–88.

- Hunter, P.R., Hughes, S., Woodhouse, S. Raj, N., Syed, Q., Chalmers, R.M., Verlander, N.Q. et Goodacre, J. 2004a.** Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 39 : 504-510.
- Hunter, P.R., Hughes, S., Woodhouse, S., Syed, Q., Verlander, N.Q., Chalmers, R.M., Morgan, K., Nichols, G., Beeching, N. et Osborn, K. 2004b.** Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 10 : 1241–1249.
- Husfeldt, A.W. et Endres, M.I., 2012.** Association between stall surface and some animal welfare measurements in freestall dairy herds using recycled manure solids for bedding. *Journal of Dairy Science* 95 : 5626–5634.
- Husfeldt, A.W., Endres, M.I., Salfer, J.A. et Jani, K.A., 2012.** Management and characteristics of recycled manure solids used for bedding in Midwest freestall dairy herds. *Journal of Dairy Science* 95 : 2195–2203.
- Ibarra, E.L., Wallwork, J.A. et Rodriguez, J.G. 1965.** Ecological studies of mites found in sheep and cattle pastures. I. Distribution patterns of oribatid mites. *Ann Entomol Soc Am* 58(2) : 153-159.
- Iqbal, A. Lim, Y.A., Surin, J. et Sim, B.L. 2012.** High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *Plos One.* 7 (2) : e31139.
- Irie, T., Sakaguchi, K., Ota-Tomita, A., Tanida, M., Hidaka, K., Kirino, Y., Nonaka, N. et Y. Horii. 2013.** Continuous *Moniezia benedeni* infection in confined cattle possibly maintained by an intermediate host on the farm. *J Vet Med Sci* 75(12) : 1585-1589.
- Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K. Uni, S. et Takada, S. 1989.** Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75 : 218–222.
- Jagai, J.S., Castronovo, D.A., Monchak, J. et Naumova, E.N. et al 2009.** Seasonality of cryptosporidiosis : a meta-analysis approach. *Environ Res.* 109 (4) : 465-478.
- Jex, A.R. et Gasser, R.B. 2010.** Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major knowledge gaps and a need for the application of “next generation” technologies. *Biotechnol. Adv.* 28 : 17-26.
- Jex, A.R., Smith, H.V., Nolan, M.J., Campbell, B.E., Young, N.D., Cantacessi, C. et Gasser, R.B. 2011.** Cryptic parasite revealed improved prospects for treatment and control of human cryptosporidiosis through advanced technologies. *Adv. Parasitol.* 77 : 141-173.
- Joachim, A. et Dauschies, A. 2004.** Humane Kryptosporidiose in Europa. *Denisia* 13 : 403-410.
- Jokipii, L. et Jokipii, A.M. 1986.** Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 315 (26) : 1643–1647.
- Kaplan, R.M. 2004.** Drug resistance in nematodes of veterinary importance : a status report. *Trends Parasitol.* 20 : 477–481.
- Kassai, T. 1999.** *Veterinary Helminthology.* Oxford UK: Butterworth Heinemann.

- Katsumata, T.D., Hosea D., Ranuh, I.G., Uga, S. Yanagi, T et Kohno, S. 2000.** Possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62 : 70–72.
- Keeton, S.T.N. et Navarre, C.B. 2018.** Coccidiosis in Large and Small Ruminants. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract.* 34 (1) : 201-208.
- Keidel, J. 2004.** Vorkommen und Bekämpfung einer natürlichen Kälberkryptosporidiose in einem Milchviehgroßbestand. *Vet. Med. Report.* 2004.
- Kennedy, M.J. et Kralka, R.A. 1987.** A Survey of *Eimeria* spp. in Cattle in Central Alberta. *Can Vet J* 28 (3) : 124-125.
- Keys, J.E., Smith, L.W. et Weinland, B.T., 1976.** Response of dairy cattle given a free choice of free stall location and 3 bedding materials. *Journal of Dairy Science* 59 : 1157–1162.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S. et al. 2013.** Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS) : a prospective, case-control study. *Lancet.* 382 (9888) : 209–222.
- Kumar, N., Rao, T.K.S. Varghese, A. et Rathor. V.S. 2013.** Internal parasite management in grazing livestock. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology* 37 (2) : 151-157.
- Kyriazakis, I. et Houdijk, J. 2006.** Immunonutrition : Nutritional control of parasites. *Small Ruminant Research* 62 : 79–82.
- Laberge, I., Griffiths, M.W. et Griffiths. M.W. 1996.** Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 32 (1-2) : 1-26.
- Lake, I.R., Harrison, F.C.D., Chalmers, R.M., Bentham, G., Nichols, G., Hunter, P.R., Kovats, R.S. et Grundy, C. 2007.** Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *Eur. J. Epidemiol.* 22 : 805-811.
- Larney, F.J., Olson, A.F., Carcamo, A.A. et Chang, C.H., 2000.** Physical changes during active and passive composting of beef feedlot manure in winter and summer. *Bioresource Technology*, núm. 75 : 139-148.
- Leach, K.A., Archer, S.C., Breen, J.E., Green, M.J., Ohnstad, I.C., Tuer, S. et Bradley, A.J. 2015.** Recycling manure as cow bedding : Potential benefits and risks for UK dairy farms. *The Veterinary Journal.* 206 : 123-130.
- Leach, K.A., Tuer, S., Green, M.J. et Bradley, A.J., 2014.** Separated Manure Solids as Bedding for Dairy Cows – a UK Farmer Survey. In : *Proceedings of the British Mastitis Conference.* Worcester, UK, November 12th : 53–54.
- Leblanc, B. 2012.** Analyse comparée des performances des systèmes de production des fermes laitières au Canada et aux États-Unis. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval. Canada : 1-132.
- LeChevallier, M.W. et Norton, W.D. 1995.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in raw and finished water. *J. Amer. Wut. Works Assoc.* 87 : 54-68.

- Leland, S.E., Jr., Caley, H.K. et Ridley. R.K. 1973.** Incidence of gastrointestinal nematodes in Kansas cattle. *Am J Vet Res* 34 (4) : 581-585.
- Leoni, F., Amar, C., Nichols, G. Pedraza-Díaz, S. et McLauchlin, J. 2006.** Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* 55 : 703–707.
- Levine, N.D. 1968.** Nematode parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Company, Illinois.
- Levine, N.D. 1988.** Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *J Protozool* 35 : 518–520.
- Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R. et Blagburn, B.L. 2000.** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa : Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *J.Eukaryot.Microbiol.* 47 (1) : 91-95.
- Lloreda, G. 2004.** Gestió de la fracció sòlida de purí d'una explotació de vacum. Trabajo de final de carrera. Escola Superior d'Agricultura de Barcelona.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., et Davis, J.P. 1994.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med.* 331 : 161–167.
- Maddox-Hyttel, C., Langkjaer, R.B., Enemark, H.L. et Vigre, H. 2006.** *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs--occurrence and management associated risk factors. *Vet Parasitol* 141 (1-2) : 48-59.
- MAFF. 1986.** Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. London, UK : Her Majesty's Stationary Office : 20–27.
- Maldonado-Camargo, S., Atwill, E.R., Saltijeral-Oaxaca, J.A. et Herrera-Alonso, L.C. 1998.** Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Hoistein freisian dairy calves in central Mexico. *Prev.Vet.Med.* 36 (2) : 95-1 07.
- Ma, P. et Soave, R. 1983.** Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J. Infect. Dis.* 147 : 824–828.
- Marcher Holm, A. et Pedersen, R. 2015.** Fiberfraktion fra gylle som strøelse i sengebåse til malkekøer FarmTest Cattle Report 98.
- Mark-Carew, M.P., Khan, Y. Wade, S.E. Schaaf S., and Mohammed. H.O. 2010.** Incidence of and risks associated with *Giardia* infections in herds on dairy farms in the New York City Watershed. *Acta Vet Scand* 52 : 44.
- Masarat, S., Ahmad, F., Chisti, M., Hamid, S. et Sofi, B.A. 2012.** Prevalence of *Cryptosporidium* species among HIV positive asymptomatic and symptomatic immigrant population in Kashmir, India. *Iran. J. Microbiol.* 4 (1) : 35–39.
- Mathison, B.A. et Ditrich, O. 1999.** The fate of *Cryptosporidium parvum* oocysts ingested by dung beetles and their possible role in the dissemination of cryptosporidiosis. *J.Parasitol.* 85 (4) : 678-681.

- Mavrot, F., Hertzberg, H. et Torgerson, P. 2015.** Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance : A systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*, 8 : 557.
- McDonald, J. 2001.** Health officials reissue sater warning for sick. Kelowna Capital News. May 25th, Ed. 2001.
- Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C., et Rubin, C.E. 1976.** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. 70 (6) : 1156–1160.
- Menear, J.R. et Smith, L.W. 1973.** Dairy-cattle manure liquid-solid separation with a screw press. *Journal of Animal Science* 36 : 788–791.
- Mercado, R., Buck, G., Manque, P. et Ozaki, L. 2007.** *Cryptosporidium hominis* infection ok the human respiratory tract. *Emerg. Infec. Dis.* 1 (3) : 462-464.
- Messner, M.J. et Berger, P. 2016.** *Cryptosporidium* Infection Risk: Results of New Dose-Response Modeling. *Risk. Anal.* 36 (10) : 1969-1982.
- Minaglia, C., Giannotti, C., Boccardi, V., Mecocci, P., Serafini, Gianluca., Odetti, P. et Monacelli, F. 2019.** Cachexia and advanced dementia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. Published online in Wiley Online Library DOI: 10.1002/jcsm.12380. : 1-15.
- Misselbrook, T.H. et Powell, J.M., 2005.** Influence of bedding material on ammonia emissions from cattle excreta. *Journal of Dairy Science* 88 : 4304–4312.
- Mofidi, A.A., Baribeau, H., Rochelle, P.A., De Leon, R., Coffey, B.M. et Green, J.F. 2001.** Disinfection of *Cryptosporidium parvum* with polychromatic UV light. *J. Amer. Wat. Works Assoc.* 93 : 95-109.
- Mohammed, H.O., Wade, S.E. et Schaaf S. 1999.** Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet.Parasitol.* 83 (1) : 1-13.
- Monis, P.T. et Thompson, R.C. 2003.** *Cryptosporidium* and *Giardia* – zoonoses : fact or fiction ? *Infect. Genet. Evol.* 3 (4) : 233-244.
- Moore, D., Atwill, E.R., Kirk, J., et al. 2004.** Clinical signs and oocyst shedding patterns of *Cryptosporidium parvum* in experimentally-challenged neonatal calves fed decoquinate. [Abstract] *Le Médecin vétérinaire du Québec – Recueil de conférences du Congrès Mondial de Buiatrie.* 34 : (1-2)123
- Moore, D.A. et Zeman, D.H. 1991.** Cryptosporidiosis in neonatal calves : 277 cases (1986-1987). *J. Arn. Vet. Med. Assoc.* 198 (11) : 1969-1971.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C., Olson, M. Lal, A. et Xiao, L. 2002.** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa : *Cryptosporidiidae*) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49 : 433–440.
- Morgan, U.M., O'Brien, P.A. et Thompson, R.C. 1996.** The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR. *Mol. Biochem.Parasitol.* 77(1) : 103-108.

- Morgan, U., Weber, R., Xiao, L., Sulaiman, I., Thompson, R.C., Ndiritu, W., Lal, A., Moore, A. et Deplazes, P. 2000.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 1180-1183.
- Morgan, U.M., Sargent, K.D., Deplazes, P., Forbes, D.A., Spano, F., Hertzberg, H., Elliot, A. et Thompson, R.C. 1998.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitology* 117 (Pt 1) : 31-37.
- Morgan, U.M., Xiao, L., Hill, B.D., O'Donoghue, P., Limor, J., Lal, A. et Thompson, R.C. 2000.** Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a dugong (Dugong dugon). *J. Parasitol.* 86 : 1352-1354.
- Morin, M., Lariviere, S. et Lallier, R. 1976.** Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can. J. Comp. Med.* 40 (3) : 228-240.
- Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N. & Fujiwara, M. 2002.** Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 5387-5393.
- Morley, J.E. 2017.** Anorexia of aging : a key component in the pathogenesis of both sarcopenia and cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 8 : 523-526.
- Morse, T.D., Nichols, R.A.B., Grimason, A.M., Campbell, B.M., Tembo, K.C. et Smith, H.V. 2007.** Incidence of cryptosporidiosis species in paediatric patients in Malawi. *Epidemiol. Infect.* 135 : 1307-1315.
- Muthusamy, D., Rao, S.S., Ramani, S. Monica, B. Banerjee, I., Abraham, O.C., Mathai, D.C., Primrose, B., Muliyl, J., Wanke, C.A., Ward, H.D. et Kang, G. 2006.** Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *J. Clin. Microbio.* 44 : 632-634.
- Naciri, M., Lefay, M.P., Mancassola, R., Poirier, P. et Chermette, R. 1999.** Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. *Vet.Parasitol.* 85 (4) : 245-257.
- Naumova, E.N., Egorov, A.I., Morris, R.D. et Griffiths, J.K. 2003.** The elderly and waterborne *Cryptosporidium* infection : gastroenteritis hospitalizations before and during the 1993 Milwaukee outbreak. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (4) : 418-425.
- Navin, T.R. et Juranek, D.D. 1984.** Cryptosporidiosis : clinical, epidemiologic, and parasitologic. review. *Rev.Infect.Dis.* 6 (3) : 313-327.
- Neira, P. 2005.** Acerca de *Cryptosporidium* spp en Chile. *Rev. Med. Chil.* 133 : 847-849.
- Neira, P., Weitzel, T. et Mehlhorn, H. 2013.** Criptosporosiasis. *In Parasitología Humana.* Apt W. McGraw-Hill / Interamericana editors, México : 167-174pp.
- Newman, R.D., Jaeger, K.L., Wuhib, T., Lima, A.A., Guerrant, R.L. et Sears, C.L. 1993.** Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *J.Clin.Microbio.* 31 (8) : 2080-2084.

- Ng, J., Yang, R. McCarthy, S., Gordon, C. Hijjawi, N. et Ryan, U. 2011.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Vet Parasitol* 176 : 145–150.
- Nichols, G., Lane, C., Asgari, N., Verlander, N.Q. et Charlett, A. 2009.** Rainfall and outbreaks of drinking water related disease and in England and Wales. *J. Water Health.* 7 (1) : 1–8.
- Nichols, R.A.B., Campbell, B.M. and Smith. H.V. 2003.** Identification of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in United Kingdom Noncarbonated Natural Mineral Waters and Drinking Waters by Using a Modified Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay. *Applied And Environmental Microbiology.* 69 (7) : 4183-4189.
- Nickoloff, J.A. et Hoekstra, M. F. 1998.** DNA Damage and Repair, Vol. 1 : DNA Repair in Prokaryotes and Lower Eukdryotes. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. et Yardley, J.H. 1976.** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterologie* 70 (4) : 592-598.
- Nina, J.M., McDonald, V., Deer, R.M., Wright, S.E., Dyson, D.A., Chiodini, P.L. et McAdam, K.P. 1992.** Comparative study of the antigenic composition of oocyst isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts. *Parasite Immunol.* 14(2) : 227-232.
- O'Donoghue, P.J. 1995.** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int.J.Parasitol.* 25(2) : 139-195.
- O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W. et Olson. M.E. 1999.** Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 214(3) : 391-396.
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T. et Ohgaki, S. 2001.** Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 4630-4637.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Kettner, C. et Sterling, C.R. 1996.** *Cryptosporidium parvum* metalloaminopeptidase inhibitors prevent in vitro excystation. *Antimicrob Agents Chemother.* 40 (12) : 2781–2784.
- Olson, M.E., Goh, J. Phillips, M. Guselle, N. et McAllister. T.A. 1999.** *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst Survival in Water, Soil, and Cattle Feces. *Journal of Environmental Quality* 28 : 1991-1996.
- Olson, M.E., Guselle, N.J., O'Handley, R.M., Swift, M.L., McAllister, T.A., Jelinski, M.D. et Morck, D.W. 1997a.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Can Vet J* 38(11) : 703-706.
- Olson, M.E., Thorlakson, C.L. Deselliers, L. Morck, D.W. et McAllister, T.A. 1997b.** *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet Parasitol* 68 (4) : 375-381.
- Ostrum, P.G., Thomas, M.J. et Zadoks, R.N., 2008.** Dried Manure Solids for Freestall Bedding : Experiences from a Northeast Dairy. In : *Proceedings of the 47th Annual*



Meeting of the National Mastitis Council, New Orleans, USA, 20–23 January 2008 : 149–156.

**Palmer, C.J., Xiao, L., Terashima, A., Guerra, H., Gotuzzo, E., Saldías, G., Bonilla, J.A., Zhou, L., Lindquist, A. et Upton, S.J. 2003.** *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen, recovered from a human in Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 9 : 1174–1176.

**Pancier, R.J., Thomassen, R.W et Garner, F.M. 1971.** Cryptosporidial infection in a calf. *Vet.Pathol.* 8 : 479-484.

**Park, J.H., Guk, S.M., Han, E.T., Shin, E.H, Kim, J.L. et Chai, J.Y. 2006.** Genotype analysis of *Cryptosporidium* spp. prevalent in a rural village in Hwasun-gun, Republic of Korea. *Korean. J. Parasitol.* 44 : 27–33.

**Patel, S., Pedraza-Diaz, S., McLauchlin, J. et Casemore, D.P. 1998.** Molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. Outbreak Control Team South and West Devon 1995, Incident Management Team and Further Epidemiological and Microbiological Studies Subgroup North Thames 1997. *Commun.Dis.Public Health.* 1 (4) : 231-233.

**Peng, X., Murphy, T. et Holden, N.M. 2008.** Evaluation of the effect of temperature on 658 the die-off rate for *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, soils, and feces. *Appl Environ Microbiol* 74 (23) : 7101-7107.

**Petry, F. 2004.** Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microsc Microanal* 10 : 586–601.

**Pettoello-Mantovani, M., Di Martino, L., Dettori, G., Vajro, P., Scotti, S., Ditullio, M.T. et Guandalini, S. 1995.** Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children : a prospective study. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 14 (12) : 1042–1047.

**Plutzer, J. et Karanis, P. 2009.** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species : an update. *Vet Parasitol* 165 : 187–199.

**Pohjola, S., Oksanen, H., Jokipii, L. Jokipii, A.M. 1986.** Outbreak of cryptosporidiosis among veterinary students. *Scand. J. Infect. Dis.* 18 (2) : 173-178.

**Pohlenz, J., Bemrick, W.J., Moon, H.W. et Cheville, N.f. 1978a.** Bovine cryptosporidiosis : a transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host- parasite relationship. *Vet. Pathol.* : 15 (3) : 417-427.

**Pohlenz, J., Moon, H.W., Cheville, N.F. et Bemrick WJ. 1978b.** Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* : 172(4) : 452-457.

**Pozio, E., Gomez Morales, M.A., Barbieri F.M. et La Rosa, G. 1992.** *Cryptosporidium* : different behaviour in calves of isolates of human origin. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 86 (6) : 636-638.

**Pronto, J., Gooch, K., 2009.** Anaerobic Digestion at Noblehurst Farms, Inc. : Case Study. Cornell University. Dairy Environmental Systems Program : 1-7.

- Pumipuntu, N. and Piratae, S. 2018.** Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. *Vet. World.* 11 (5) : 681-686.
- Putignani, L. et Menichella, D. 2010.** Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* Doi :10.1155/2010/753512, pii : 753512.
- Pyziel, A.M. et Demiaszkiewicz, A.W. 2015.** Observations on sporulation of *Eimeria bovis* (Apicomplexa : Eimeriidae) from the European bison *Bison bonasus* : effect of temperature and potassium dichromate solution. *Folia Parasitol (Praha)* 62.
- Quigley, J.D., III, Martin, K.R., Bemis, D.A., Potgieter, L.N., Reinemeyer, C.R., Rohrbach, B.W., Dowien, H.H., et Lamar, X.C. 1994.** Effects of housing and colostrum feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of Jersey calves. *J Dairy Sci.* 77 (10) : 3124-3131.
- Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., del Cacho, E., Clavel, A. et Causape, A.C. 1996.** Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). *Vet Parasitol.* 66 (3-4) : 139-146.
- Radostits, O.M. 2001.** Herd Health food Animal Production Medicine. 3rd ed. WB Saunders Company.
- Radostits, O.M. et Stockdale, P.H. 1980.** A brief review of bovine coccidiosis in Western Canada. *Can Vet J* 21 (8) : 227-230.
- Real Academia Nacional de Medicina. 2012.** Diccionario de términos médicos. Madrid.
- Reveron, A., Topps, J., Gelman, A. 1974.** Mineral metabolism and skeletal development of lambs affected by *Trichostrongylus colubriformis*. *Res. Vet Sci.* 14 : 310-319.
- Rochelle, P.A., Fallar, D. Marshall, M.M., Montelone, B.A., Upton, S.J. et Woods, K. 2004.** Irreversible UV Inactivation of *Cryptosporidium* spp. Despite the Presence of UV Repair Genes. *Eukaryot. Microbiol.* 51(5) : 553-562.
- Robertson, B., Sinclair, M.I., Forbes, A.B., Veitch, M., Kirk, m., Cunliffe, D., Willis, J. et Fairley, C.K. 2002.** Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in Melbourne and Adelaide, Australia. *Epidemiol. Infect.* 128 (3) : 419-431.
- Robertson, L.J., Björkman, C., Axén, C. et Fayer, R. 2014.** Cryptosporidiosis in Farmed Animals. Pages 149-235 in *Cryptosporidium: parasite and disease*. S. M. Cacciò and G. Widmer, ed. Springer Vienna, Vienna.
- Robertson, L.J., Gjerde, B.K. et Furuseth Hansen, E. 2010.** The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: a longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. *Vet. Parasitol.* 171 (1-2) : 140-145.
- Roeber, F., Jex, A.R. et Gasser, R.B. 2013.** Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances.* Vol. 31. ISSUE 8 : 1135-1152.

- Rose, J.B., Lisle, J.T. et LeChevallier, M. 1997.** Waterborne cryptosporidiosis : Incidence, outbreaks, and treatment strategies. *In* : Fayer, R. (ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Baton Rouge, Louisiana : 93-109.
- Rowbotham, R.F. et Ruegg, P.L. 2016.** Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls. *J Dairy Sci* 99 (8) : 6594-6608.
- Roy, S.L., DeLong, S.M., Stenzel, S.A. Shiferaw, B., Roberts, J.M., Khalakdina, A., Marcus, R., Segler, S.D., Shah, D.D., Thomas, S., Vugia, D.J., Zansky, S.M., Dietz, V., Beach, M.J. et Emerging Infections Program FoodNet Working Group. 2004.** Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *J. Clin. Microbiol.* 42 (7) : 2944-2951.
- Ruest, N., Faubert, G.M. et Couture, Y. 1998.** Prevalence and geographical distribution of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in dairy farms in Quebec. *Can.Vet.J.* 39 (11) : 697-700.
- Rynk, R. 2001.** Exploring the economics of on-farm composting. Partie I et II. *Biocycle* : 60-70.
- Ryan, U. et Power, M. 2012.** *Cryptosporidium* species in Australian wildlife and domestic animals. *Parasitology.* 139 : 1673–1688.
- Sagodira, S., Buzoni-Gatel, D., Iochmann, S., Naciri, M. et Bout, D. 1999.** Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine.* 17 : 2346-2355.
- Saiki, R.K., Gyllensten, U.B. et Erlich, H.A. 1988.** The Polymerase Chain Reaction. Oxford UK : IRL Press.
- Samaille, J.P. 1996.** Zoonoses parasitaires sous-estimées. *Action Vet,* 1377 : 33-36.
- Saña, J. 2004.** Optimización de las instalaciones de compostaje de fangos de depuradora. Jornadas sobre Gestión y Tratamiento de Lodos de EDAR. Barcelona; 1 de diciembre, 2004. Universitat de Barcelona / Diputació de Barcelona.
- Saña, J. et Soliva M. 2006.** Convenio ARC-ESAB/UPC : Condiciones para el compostaje *in situ* de deyecciones ganaderas sólidas. Escuela Superior de Agricultura de Barcelona – UPC : 1-63.
- Saña J., et Soliva M. 1987.** El compostatge: procés, sistemes i aplicacions. Quaderns d'ecologia aplicada, núm. 11. Diputació de Barcelona. Àrea de Medi Ambient. Servei de Medi Ambient. pp. 1-98.
- Santin, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E. et Fayer. R. 2004.** Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol* 122 (2) : 103-117.
- Schmidt, G.D., Roberts' L.S. McGraw-Hill Companies I, editors. 2000.** Foundations of parasitology. 6th ed. 8, Phylum apicomplexa : gregarines, coccidia and related organisms : 135-137.

- Schroeder, J. et Swan, G. 1979.** Epizootiological and económica! considerations in the anthelmintic treatment. Res. Vet. J. 10 : 11-16.
- Scott, C.A., Smith, H.V. et Gibbs, H.A. 1994.** Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows. Vet.Rec. 134 : 172.
- Scott, C.A., Smith, H.V., Mtambo, M.M. et Gibbs, H.A. 1995.** An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattie. Vet.Parasitol. 57 (4) : 277-88.
- Seva Ada, P., Funada, M.R., Richtzenhain, L., Guimaraes, M.B., Souza Sde, O., Allegretti, L., Sinhorini, J.A., Duarte, V.V. et Soares, R.M. 2011.** Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. Vet Parasitol 175 (1-2) : 27-32.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Keidel, J., Schmäscke, R. et Dauschies, A. 2010.** Combination of cell culture and quantitative PCR (cc-qPCR) to assess disinfectants efficacy on *Cryptosporidium* oocysts under standardized conditions. Vet. Parasitol. 167 : 43-49.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Khalafalla, R.E., Desouky, A.Y. et Dauschies, A. 2009a.** Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. Parasitol Res 105 : 1155-1161.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Obwaller, A., Unglaube, S. et Dauschies, A. 2009b.** Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against *Cryptosporidium parvum*. Vet. Parasitol. 162 : 271-277.
- Siddons, C.A., Chapman, P.A. et Rush, B.A. 1992.** Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in faeces and environmental samples. J.Clin.Pathol. 45 (6) : 479-482.
- Sievers, G. et Alocilla, A. 2007.** Determinación de resistencia antihelmíntica frente a Ivermectina de nematodos del bovino en dos predios del sur de Chile. Arch. Med. Vet. 39 : 67-69.
- Slavin, D. 1955.** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). J.Comp.Pathol. 62 : 262.
- Smith, H.V., Cacciò, S.M., Cook, N., Nichols, R.A. et Tait, A. 2007.** *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Vet. Parasitol. 149 : 29-40.
- Smith, H.V., Nichols, R.A.B. et Grimason, A.M. 2005.** *Cryptosporidium* excystation and invasion : getting to the guts of the matter. Trends. Parasitol. 21 : 133-142.
- Snodgrass, D.R., Angus, K.W., Gray, E.W., Keir, W.A. et Clerihew, L.W. 1980.** Cryptosporidia associated with rotavirus and an *Escherichia coli* in an outbreak of calf scour. Vet.Rec. 106 (22) : 458-460.
- Soares, Antonio José. 2003.** Épidémiologie des épidémies alimentaires à *Cryptosporidium parvum*. These N° 59, École Nationale Vétérinaire de Lyon : 1-137.

- Soler, J.M. 1945.** Los estiércoles pecuarios y su conservación. Anales de la Escuela de Peritos Agrícolas y Superior de Agricultura y de los Servicios técnicos de Agricultura. Diputación Provincial de Barcelona.
- Soliva, M. 2001.** *Compostatge i gestió de residus orgànics*. Col·lecció Estudis i Monografies, 21. Diputació de Barcelona. Servei de Medi Ambient.
- Sorter, D.E., Koster, H.J. et Hogan, J.S., 2014.** Bacterial counts in recycled manure solids bedding replaced daily or deep packed in freestalls. *Journal of Dairy Science* 97 : 2965–2968.
- Soulsby, E. 1987.** Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los animales domésticos. 7ª ed. Nueva Editorial Interamericana. México DF : 823.
- Soulsby, E. 1965.** Textbook of Veterinary Clinical parasitology. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1 helminth, 692.
- Sudhakara Reddy, B., Sivajothi, S. et Rayulu. V.C. 2015.** Clinical coccidiosis in adult cattle. *J Parasit Dis* 39 (3) : 557-559.
- Sykes, A., Coop, R. et Angus, K. 1975.** Experimental production of osteoporosis in growing lambs by continuous dosing with *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *J. Comp. Path.* 85 : 549-559.
- Sykes, A., Coop, R. et Angus, K. 1977.** The influence of chronic *Ostertagia circumcincta* infection on the skeleton of growing sheep. *J. Comp. Path.* 87 : 521- 529.
- Taylor, M.A., Coop, R.L. et Wall, R.L. 2007.** *Veterinary Parasitology*. 3rd ed. Oxford : Blackwell Publishing 978-1-4051-1964-1.
- Thompson, R.C. et Lymbery, A.J. 1996.** Genetic variability in parasites and host-parasite interactions. *Parasitology*. 112 Suppl : S7 - 22.
- Thomson, S., Hamilton, C.A., Hope, J.C., Katzer, F., Mabbott N.A., Morrison, L.J. et Innes, E.A. 2017.** Bovine cryptosporidiosis : impact, host-parasite interaction and control strategies. *Vet Res* 48 (1) : 42.
- Tiangtip, R. et Jongwutiwes, S. 2002.** Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health.* 7 : 357–364.
- Timms, L., 2008a.** Characteristics and use of separated manure solids (following anaerobic digestion) for dairy freestall bedding, and effects on animal health and performance in an Iowa dairy herd. Iowa State University Animal Industry Report AS654, ASL R2321 : 1-7.
- Timms, L., 2008b.** Characteristics and use of separated manure solids (following composting) for dairy freestall bedding, and effects on animal health and performance in an Iowa dairy herd. Iowa State University Animal Industry Report AS654-ASL R2322 : 1-5.
- Timms, L., 2008c.** Preliminary evaluation of separated manure solids characteristics at the new ISU dairy. Iowa State University Animal Industry Report AS654, ASL R2318 : 1-4.
- Trépanier, J. Sans date.** Génotypage et sous-typage de *Cryptosporidium* dans des spécimens cliniques par PCR. Laboratoire de santé publique du Québec.

- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Martin, S.W., Leslie, K.E., et Peregrine, A.S. 2005.** Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in southwestern Ontario and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Can Vet J* 46 (4) : 349-351.
- Tyzzar, E.E. 1907.** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 5 :12–13.
- Tyzzar, E.E. 1910.** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res.* 23 : 487–511.
- Tyzzar, E.E. 1912.** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv.fur Protistenkunde* 26 : 390-412.
- Tzipori, S. et Widmer, G. 2000.** The biology of *Cryptosporidium*. *Contrib Microbiol* 6 : 1–32.
- Upton, S.J. et Current, W.L. 1985.** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: *Cryptosporidiidae*) infecting mammals. *J.Parasitol.* 71 (5) : 625-629.
- Valera Rojas, P.M. et Aguilera Suarez, E.M. 2007.** Estudio epidemiológico de la prevalencia e identificación de parásitos gastrointestinales en terneros de 2 a 6 meses de edad del municipio de San Pedro de Lóvago-Chontales. Tesis presentada a la Facultad de Ciencia Animal (FACA). Departamento de Veterinaria. Universidad Nacional Agraria (UNA). Nicaragua : 1-21.
- Vande Velde, F., Charlier, J. et Claerebout, E. 2018.** Farmer Behavior and Gastrointestinal Nematodes in Ruminant Livestock-Uptake of Sustainable Control Approaches. *Front Vet Sci* 5 : 255.
- Van Meensel, J., Kanora, A., Lauwers, L., Jourquin, J., Goossens, L. et Van Huylenbroeck, G. 2010.** From research to farm : Ex ante evaluation of strategic deworming in pig finishing. *Veterinari Medicina*, 55 : 483-493.
- Villeneuve, A. 2003.** Comm. Pers. : Épisode de cryptosporidiose chez des étudiants à la faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe. En : Baillargeon, J. 2004. Étude sur la contamination du colostrum bovin par des ookystes de *Cryptosporidium parvum*. Mémoires présenté à la Faculté des Études Supérieures. Département de Sciences cliniques. Faculté de Médecine Vétérinaires. Université de Montréal. Canada : 1-114.
- Von Keyserlingk, M.A., Barrientos, A., Ito, K., Galo, E., et Weary, D.M., 2012.** Benchmarking cow comfort on North American freestall dairies : Lameness, leg injuries, lying time, facility design, and management for high-producing Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95 : 7399–7408.
- Waldron, L.S., Dimeski, B., Beggs, P.J., Ferrari, B.C et Power, M.L. 2011.** Molecular epidemiology, spatiotemporal analysis, and ecology of sporadic human cryptosporidiosis in Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 : 7757–7765.
- Waldenstedt, L., Elwinger, K., Lunden, A., Thebo, P. et Uggla. A. 2001.** Sporulation of *Eimeria maxima* oocysts in litter with different moisture contents. *Poult Sci* 80(10) : 1412-1415.

- Weber, R., Bryan, R.T., Bishop, H.S., Wahlquist, S.P., Sullivan, J.J. et 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 (7) : 1323-1327.
- Weber, R., Bryan, R.T., Juranek, D.D. 1992.** Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidiztrn* oocysts in fecal specimens. *J.Clin.Microbiol.* 30 (11) : 2869-2873.
- Weir, E. 2001.** The cryptic nature of cryptosporidiosis. *Can Med Assoc J.* 164(12) : 1743.
- Wells, S.J., Trent, A.M., Marsh, W.E. et Robinson, R.A., 1993.** Prevalence and severity of lameness in lactating dairy cows in a sample of Minnesota and Wisconsin herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 202 : 78–82.
- Wenks, R. 1970.** Anthelmintic treatment of young beef cattle in Central Queensland. *Aust. Vet. J.* 46 : 8-10.
- Widmer, G. 1998.** Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*. *Adv.Parasitol.* 40 : 223-239.
- Wimmer, B., Craig, B.H., Pilkington, J.G., Pemberton, J.M. 2004.** Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *Int. J. Parasitol* 34 : 625–631.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G. et Sangster, N.C. 2004.** Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 20 : 469–476.
- Xiao, L. 2010.** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis : an update. *Exp Parasitol* 124 : 80–89.
- Xiao, L., Bern, C., Arrowood, M., Sulaiman, I., Zhou, L., Kawai, V., Vivar, A., Lal, A.A. et Gilman, R.H. 2002.** Identification of the *Cryptosporidium* pig genotype in a human patient. *J. Infect. Dis.* 185 : 1846–1848.
- Xiao, L. et Fayer R. 2008.** Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* 38 (11) : 1239-1255.
- Xiao, L. et Herd, R.P. 1994.** Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet.Rec.* 55 (4) : 257-262.
- Xiao, L. et Herd, R.P. 1993.** Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J Clin Microbiol* 31 (11) : 2944-2946.
- Xiao, L. et Ryan, U.M. 2008.** Molecular epidemiology. In : Fayer R, Xiao, L. (eds) *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton. : 119–172.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. et Upton, S.J. 2004.** *Cryptosporidium* taxonomy : recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 17 : 72–97.

**Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R. et Lal, A.A. 1999a.** Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 65 : 3386–3391.

**Xu, P., Widmer, G., Wang, Y. Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R., Dear, P.H., Bankier, A.T., Peterson, D.L., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipori, S. et Buck, G.A. 2004.** The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 432 (7015) : 1107–1112, Erratum in : *Nature* 432 (7015) : 415.

**Zajac, A.M. et Conboy, G.A. 2006.** *Veterinary Clinical Parasitology*. 7e édition. Blackwell Publishing, Iowa.

**Zanaro, N.L et Garbossa, G. 2008.** *Cryptosporidium* : Cien años después. *Cryptosporidium* : After a hundred years. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 42 (2) : 195-201.

**Zähner, M., Schmidtke, J., Schrade, S., Schaeren, W. et Otten, S., 2009.** Alternative Einstreumaterialien in Liegeboxen. *Bautagung Raumberg-Gumpenstein* : 33–38.

**Zechner, G., Jacobs, J. Goossens, L. Vertenten, G. et Taylor, M.A. 2016.** Prevention of coccidiosis in dairy cows. *Vet Rec* 178 (16) : 402.

**Zehner, M.M., Farnsworth, R.J., Appleman, R.D., Larntz, K. et Springer, J.A., 1986.** Growth of environmental mastitis pathogens in various bedding materials. *Journal of Dairy Science* 69 : 1932–1941.