

Université de Montréal

**Évaluation des changements pathologiques pulmonaires
induits par l'infection expérimentale de phoques du
Groenland par le nématode pulmonaire
*Otostrongylus circumlitus***

par

Caroline Piché

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option pathologie

Avril, 2007

© Caroline Piché, 2007



SF

607

US4

2007

V.013

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Évaluation des changements pathologiques pulmonaires induits par
l'infection expérimentale de phoques du Groenland par le nématode
pulmonaire *Otostrongylus circumlitus***

Présenté par :
Caroline Piché

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Serge Messier, président-rapporteur
Stéphane Lair, directeur de recherche
Christian Bédard, codirecteur
Lena Measures, codirectrice
Alain Villeneuve, membre du jury

Résumé

Les pneumonies vermineuses constituent une cause fréquente de morbidité et de mortalité chez les pinnipèdes. Les infections par le nématode *Otostrongylus circumlitus* (Metastrongyloidea) ont été rapportées chez plusieurs espèces de phoques incluant le phoque du Groenland, *Phoca groenlandica*. Nous avons évalué le différentiel leucocytaire des lavages bronchoalvéolaires ainsi que les lésions histopathologiques pulmonaires chez sept phoques du Groenland expérimentalement exposés à 300 larves infectieuses d'*O. circumlitus*. Sept phoques du Groenland non exposés aux larves parasites ont servi de témoins. L'infection a été démontrée avec succès chez trois phoques exposés puisque des larves de premier stade furent observées dans leurs selles 38 à 45 jours après l'exposition parasitaire. Des nématodes adultes se trouvaient dans la bronche primaire droite chez deux de ces trois phoques lors de la nécropsie. Aucune différence significative entre les groupes de phoques et entre les jours d'échantillonnage n'a été constatée pour les pourcentages de neutrophiles et de macrophages. Une différence statistiquement significative a été mise en évidence pour le pourcentage d'éosinophiles ($P < 0.0001$), le compte d'éosinophiles étant augmenté par un facteur de 70.4 chez les phoques exposés comparativement aux témoins. Des différences significatives ont aussi été identifiées entre les deux groupes pour la sévérité des lésions d'inflammation pulmonaire interstitielle ($P = 0.001$), de bronchite ($P = 0.02$), de bronchiolite ($P = 0.04$), d'alvéolite ($P = 0.03$) et d'inflammation pulmonaire interstitielle granulomateuse ($P = 0.04$). Nos résultats démontrent que le phoque du Groenland est susceptible aux infections par *O. circumlitus*. Par contre, dans nos conditions expérimentales, ces infections étaient de faible intensité et transitoires.

Mots-clés : lavage bronchoalvéolaire, nématode, *Otostrongylus circumlitus*, pathologie, pneumonie, *Phoca groenlandica*, phoque du Groenland.

Abstract

Verminous pneumonia is a frequent cause of morbidity and mortality in pinnipeds. Infections with *Otostrongylus circumlitus* (Metastrongyloidea) are reported in many seal species including the harp seal, *Phoca groenlandica*. The objectives of this study were to evaluate the differential cell count in unguided bronchoalveolar lavages (BAL) and to assess histopathological lesions in seven harp seals experimentally exposed to 300 infective third-stage *O. circumlitus* larvae. Seven unexposed seals served as controls. Experimental infection was successfully demonstrated in three of the exposed seals 38 to 45 days post-exposure based on finding first-stage larvae in their faeces. Adult nematodes were observed in the right primary bronchi of two of these three exposed seals at necropsy. Differential cell counts performed on BAL fluid revealed no significant differences in percentages of neutrophils and macrophages between the two groups and between sampling days. However, a significant difference was observed between the exposed and control seal groups in the percentage of eosinophils ($P < 0.0001$), the count of eosinophils in the exposed seals being increased by a factor of 70.4. Statistical differences were identified between the two groups in severity of interstitial pulmonary inflammation ($P = 0.001$), bronchitis ($P = 0.02$), bronchiolitis ($P = 0.04$), alveolitis ($P = 0.03$) and interstitial pulmonary granulomatous inflammation ($P = 0.04$). Our findings showed that harp seals are susceptible to infection with *O. circumlitus*. However, parasitic infections were transient and of low intensity, at least under our experimental conditions.

Keywords : bronchoalveolar lavage, harp seal, lungworm, nematode, *Otostrongylus circumlitus*, pathology, *Phoca groenlandica*, pneumonia.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	ix
Dédicace	x
Remerciements	xi
Introduction	1
Chapitre 1 – Recension de la littérature	4
Le phoque du Groenland.....	4
<i>Habitat et migration.....</i>	<i>4</i>
<i>Description de l'espèce.....</i>	<i>5</i>
<i>Alimentation.....</i>	<i>6</i>
<i>Physiologie.....</i>	<i>6</i>
Les maladies du système respiratoire.....	7
Le nématode pulmonaire <i>Otostrongylus circumlitus</i>	8
<i>Cycle vital d'Otostrongylus circumlitus.....</i>	<i>9</i>
<i>Distribution et hôtes finaux.....</i>	<i>11</i>
<i>Prévalence de l'infection.....</i>	<i>11</i>
<i>Susceptibilité des espèces de phocidés.....</i>	<i>12</i>
<i>Signes cliniques et lésions.....</i>	<i>13</i>
<i>Diagnostic des pneumonies vermineuses.....</i>	<i>15</i>
Les méthodes diagnostiques du système respiratoire.....	15
<i>Auscultation pulmonaire</i>	<i>16</i>
<i>Lavage bronchoalvéolaire</i>	<i>16</i>
<i>Qualité et analyse de la composition cellulaire des LBA</i>	<i>18</i>

<i>Histopathologie pulmonaire</i>	20
<i>Corrélation entre les lésions inflammatoires du LBA et de l'histopathologie</i>	21
But du projet.....	21
Chapitre deuxième – Article	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUCTION.....	25
MATERIALS AND METHODS.....	28
<i>Care of animals</i>	28
<i>Exposure to <u>Otostrongylus circumlitus</u></i>	28
<i>Sample collection</i>	29
<i>Sample preparation and evaluation</i>	30
<i>Statistical analysis</i>	32
RESULTS	33
<i>Infection with <u>Otostrongylus circumlitus</u></i>	33
<i>Bronchoalveolar lavage</i>	33
<i>Lung pathology</i>	35
DISCUSSION	38
ACKNOWLEDGMENTS.....	45
TABLES.....	46
FIGURES	52
LITERATURE CITED	57
Chapitre troisième – Discussion générale des résultats	63
Conclusion	71
Bibliographie	72
Annexe I - Résultats des analyses coprologiques, cytologiques (LBA) et <i>post mortem</i> chez les phoques témoins et exposés aux larves infectieuses d'<i>Otostrongylus circumlitus</i>	xii

Liste des tableaux

Chapitre deuxième – Article

Table 1.	Scores used in the semiquantitative assessment of the gross appearance of the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid.	46
Table 2.	Scores used in the semiquantitative evaluation of histopathologic changes in the lungs of harp seals experimentally infected with <i>Otostrongylus circumlitus</i> and in control seals.	47
Table 3.	Differential counts expressed as percent (%) of neutrophils, macrophages and lymphocytes from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid obtained from seals exposed to <i>Otostrongylus circumlitus</i> larvae (n = 7) and control seals (n = 7).	48
Table 4.	Differential counts expressed as percent (%) of eosinophils from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid obtained from seals exposed to <i>Otostrongylus circumlitus</i> larvae (n = 7) and control seals (n = 7).	49
Table 5.	Intensity of different histopathologic pulmonary lesions (sum of the pulmonary histopathological scores) observed in seals exposed to <i>Otostrongylus circumlitus</i> larvae (n = 7) and control seals (n = 7).	50
Table 6.	Predominant inflammatory cells in <i>antemortem</i> bronchoalveolar lavage (<i>antemortem</i> BAL) fluid (53 dpe) and histopathological examination (histopathology) of exposed and control seal lung tissue sections.	51

Liste des figures

Chapitre deuxième – Article

- Figure 1.** Ventral aspect of the lung from a harp seal (#12) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*.52
- Figure 2.** Ventral aspect of the lung from a harp seal (#11) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*.53
- Figure 3.** Histologic section of lung from a harp seal (#11) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*.54
- Figure 4.** Histologic section of lung from a harp seal (#11) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*.55

Liste des sigles et abréviations

BAL :	Bronchoalveolar lavage
DPE :	Days post-exposure / Jours postexposition
HPS :	Hematoxylin, phloxine, saffron
ID :	Identification
LBA :	Lavage bronchoalvéolaire
N/A :	Non available / Non applicable
PPP :	Prepatent period / Période pré-patente
YOY :	Young-of-the-year

Dédicace

*À mes parents qui ont toujours cru en moi et
à mon copain, Philippe, pour son support et
son aide inestimable*

Remerciements

Je désire tout d'abord remercier Dr Stéphane Lair, mon directeur de recherche, Dr Christian Bédard, mon codirecteur de recherche et mon superviseur de résidence ainsi que Dr Lena Measures, ma codirectrice de recherche, de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet aussi passionnant et de m'avoir soutenue tout au long de sa réalisation.

À Dr France Boily et à Stéphanie Larouche pour leur aide inestimable et leur support au cours des manipulations hebdomadaires et des soins quotidiens aux animaux.

À Dr Marion Desmarcheliers et Dr Daniel S. J. Pang pour leur assistance et expertise lors des anesthésies de nos phoques.

À Dr Guy Beauchamp pour son aide précieuse avec les nombreuses analyses statistiques.

Je remercie la Stratégie Canadienne de la Biotechnologie, Pêches et Océans Canada, le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada et le Fonds du Centenaire de l'Université de Montréal qui ont assuré le financement de ce projet.

Introduction

Les Metastrongyloidea constituent une superfamille de nématodes appartenant à l'ordre des Strongylida. Ces parasites ont une importance économique et médicale considérable car de nombreux membres de cette superfamille sont des agents pathogènes pour plusieurs espèces de mammifères sauvages et domestiques (Anderson, 2000). En effet, les Metastrongyloidea regroupent 181 espèces classifiées en 46 genres et 7 familles et parasitent les systèmes respiratoire, vasculaire et nerveux (Bowman, 1995). Les sept familles de Metastrongyloidea sont constituées par les Metastrongylidae, les Protostrongylidae, les Angiostrongylidae, les Filaroididae, les Skrjabinylidae, les Pseudalidae et les Crenosomatidae (Anderson, 2000). Cette dernière famille regroupe deux genres : *Crenosoma* et *Otostrongylus*.

Les pneumonies vermineuses ont d'autant plus d'effet chez les pinnipèdes puisque ces derniers passent une grande partie de leur temps sous l'eau (Lydersen et Kovacs, 1996). La plongée est une activité essentielle pour ces animaux car c'est de cette façon qu'ils recherchent leur nourriture. Les infections parasitaires pulmonaires, qui sont fréquentes chez les pinnipèdes, peuvent donc grandement modifier leurs plongées et par conséquent leur capacité de s'alimenter et migrer et aussi mettre en danger leur survie (Gosselin et al., 1998).

Lorsque des mammifères marins vivants sont échoués, il devient impératif pour les vétérinaires de pouvoir poser rapidement un diagnostic de pneumonie vermineuse afin de pouvoir entreprendre le traitement antiparasitaire approprié qui peut permettre la survie de l'animal. La confirmation des pneumonies vermineuses repose généralement sur la mise en évidence des parasites adultes lors de la nécropsie ou de larves dans les fèces par la technique de Baermann (Measures, 2001). Cependant, le résultat du test de Baermann peut s'avérer faussement négatif si l'infection parasitaire n'est pas encore patente, si l'animal se débarrasse de l'infection avant la fin de la période pré-patente (PPP), si un seul nématode adulte ou plusieurs nématodes du même sexe sont présents chez l'hôte final, si un faible nombre de larves de premier stade est excrété dans les selles ou si cette excrétion est intermittente. De nouvelles techniques de détection parasitaire, basées sur l'identification

d'immunoglobulines réagissant contre le parasite, sont présentement en développement (Elson-Riggins et al., 2004).

Des méthodes diagnostiques du système respiratoire peu invasives comme les lavages bronchoalvéolaires (LBA) sont fréquemment utilisées en médecine vétérinaire chez les animaux domestiques (King, 2004). Chez les pinnipèdes, plusieurs cliniciens sont réticents à réaliser des LBA à cause du risque anesthésique accru découlant de leurs adaptations à la vie aquatique (McDonell, 1972). L'apnée, l'hypoventilation et la bradycardie sont fréquemment observées lors des anesthésies de phoques et des mortalités peuvent survenir (Gulland et al., 2001). Par conséquent, la composition cellulaire du liquide de LBA n'a été que rarement rapportée chez différentes espèces de pinnipèdes (Spragg et al., 2004).

Étant donné la faible quantité de données histopathologiques et surtout cytologiques sur les lésions de pneumonies vermineuses chez les pinnipèdes, nous avons décidé de réaliser une infection expérimentale de phoques du Groenland (*Phoca groenlandica*) avec le nématode pulmonaire *Otostrongylus circumlitus*. Dans le cadre de cette étude, l'analyse des changements inflammatoires dans le liquide du LBA a été effectuée à quatre reprises au cours du projet. De plus, un examen des lésions pulmonaires histopathologiques a été réalisé à la toute fin du projet pour fin de comparaison.

Le but de l'étude est de tester les hypothèses suivantes : la composition cellulaire du liquide de LBA sera différente entre le groupe exposé et celui non exposé (témoin) aux larves infectieuses de troisième stade d'*O. circumlitus* et les lésions histopathologiques seront plus sévères dans le groupe de phoques exposés comparativement à celui des témoins. Pour tester ces hypothèses, les objectifs seront les suivants : 1) réaliser une infection expérimentale chez les phoques du Groenland par *O. circumlitus*, 2) réaliser des anesthésies de courtes durées et sécuritaires permettant d'effectuer un lavage bronchoalvéolaire efficace à quatre reprises au cours de l'expérience, 3) comparer les deux

groupes de phoques en ce qui concerne la composition cellulaire du liquide de LBA et la sévérité des lésions histopathologiques pulmonaires.

Chapitre 1 – Recension de la littérature

Le phoque du Groenland

Le phoque du Groenland (*Phoca groenlandica*) est un mammifère marin qui appartient au sous-ordre des pinnipèdes, à la famille des phocidés et au genre *Phoca*. Il est aussi connu sous le nom de phoque à selle à cause de la bande noire en forme de fer à cheval ou de harpe que l'on retrouve sur le pelage gris argenté des adultes. Plusieurs noms anglais sont également utilisés pour désigner cette espèce comme *Harp seal*, *Greenland seal* et *saddle back seal* (King, 1983; Sylvestre, 1998). Le phoque du Groenland est l'espèce de pinnipède la plus abondante dans l'Atlantique Nord-Ouest (Hammill et Stenson, 2005) et l'une des trois espèces les plus abondantes dans le monde après le phoque annelé (*Phoca hispida*) et le phoque crabier (*Lobodon carcinophagus*) (voir Sylvestre, 1998). En 2005, la population totale de phoques du Groenland était estimée à 5.82 millions d'individus (Hammill et Stenson, 2005). La production de blanchons, estimée en 2004, se situait tout près de 1 000 000 annuellement (Stenson et al., 2005).

Habitat et migration

L'habitat du phoque du Groenland se compose de l'Atlantique Nord et de l'océan Arctique. Trois grandes populations de phoques du Groenland ont été identifiées et elles correspondent aux colonies reproductrices qui se situent dans la mer Blanche (nord de la Russie), près de l'Île de Jan Mayen (sud-est de Spitsbergen, Norvège) et dans l'Atlantique Nord-Ouest au large du Canada. Cette dernière, la plus migratoire des trois populations, se divise en deux troupes soit celui du Front se localisant à l'est du Labrador et nord-est de Terre-Neuve et celui du Golfe St-Laurent (Sergeant, 1991). Le phoque du Groenland a un comportement grégaire et ses déplacements sont reliés à la fonte de la banquise (Lavigne et Kovacs, 1988). Au début de l'automne, les phoques du Groenland migrent en bandes éparpillées vers le sud pour se rendre aux colonies reproductrices (Sergeant, 1991). Vers la fin de février ou le début de mars, les femelles de la population de l'Atlantique Nord-Ouest donnent naissance à un chiot suite à une gestation d'environ 11 mois et demi, incluant une

période de diapause embryonnaire de cinq mois (Chabot et Stenson, 2000). Entre la mi-mars et fin d'avril, les uns après les autres, les phoques renouvellent leur pelage (Sergeant, 1991). Vers la fin du printemps, les phoques de tous âges retournent vers l'Arctique pour y passer la saison estivale (Sylvestre, 1998).

Description de l'espèce

Le blanchon est l'appellation réservée aux phoques du Groenland âgés de quatre à dix jours (Sylvestre, 1998). Le terme « brasseur » s'applique au jeune phoque du Groenland pendant sa première année de vie (Sylvestre, 1998) et « juvénile » de l'âge d'un an jusqu'à l'atteinte de la maturité sexuelle qui est de sept à huit ans pour le mâle et de quatre à six ans pour la femelle (Sergeant, 1991). La longévité de ce pinnipède peut atteindre 30 à 35 ans (Lavigne et Kovacs, 1988).

À la naissance, le nouveau-né mesure environ 92 cm et pèse entre 9 et 10 kg (Lavigne et Kovacs, 1988). Les femelles allaitent leur chiot pour une période d'environ 12 jours. Pendant l'allaitement, les jeunes phoques prennent du poids de façon importante à cause de la richesse du lait maternel qui contient entre 46 et 59% de matières grasses (Lydersen et Kovacs, 1996; Schulz et Bowen, 2004). Le phoque pèse en moyenne 34 kg au moment du sevrage (Kovacs et al., 1985). Suite au sevrage, les phoques, alors âgés de 12 jours, entreprennent une période de jeûne qui s'échelonne sur quatre à six semaines (Kovacs et al., 1985). Ce jeûne est considéré physiologique et permet la mue ainsi que le développement des aptitudes de plongée de ces mammifères marins (Lavigne et Kovacs, 1988). Pendant cette période, le phoque s'alimente très peu et irrégulièrement, ce qui entraîne un déficit énergétique considérable. Le phoque perd jusqu'à 50% de son poids au cours de cette période de sevrage (Worthy et Lavigne, 1983).

La femelle et le mâle adulte mesurent environ 1.7 m de longueur et pèsent environ 130 kg (Lavigne et Kovacs, 1988). Plusieurs indices ont été établis afin de déterminer la condition corporelle des phoques. Chez les mammifères marins, on considère l'épaisseur du

pannicule adipeux comme le meilleur reflet de leur condition corporelle. Un indice souvent utilisé est le ratio de l'épaisseur du pannicule adipeux dorsal mesuré à 60% de la longueur totale et la circonférence à ce même endroit correspondant à la plus grande circonférence corporelle (Beck et al., 1993; Beck et Smith, 1995).

Alimentation

Lorsqu'ils commencent à s'alimenter, les phoques consomment des petits crustacés pélagiques et des petits poissons comme le capelan (*Mallotus villosus*) (voir Sylvestre, 1998). Le régime alimentaire des adultes varie selon la période de l'année, la distance de la côte et la localisation géographique. Leur diète se compose de poissons tels que le capelan, les morues (*Gadus morhua* et *Boreogadus saida*), le lançon (*Ammodytes* sp.), le hareng (*Clupea harengus*), le sébaste (*Sebastes* sp.), le flétan du Groenland (*Reinhardtius hippoglossoides*), ainsi que de crustacés benthiques et pélagiques (Hammill et Stenson, 2000).

Physiologie

La physiologie du phoque du Groenland est adaptée à la plongée qui peut atteindre 370 m de profondeur et qui peut résulter en une période d'apnée de 1 à 16 minutes (Schreer et Kovacs, 1997). La première adaptation concerne le système cardiovasculaire. En effet, le volume vasculaire des pinnipèdes est deux à trois fois plus important que celui des mammifères terrestres (Berta et Sumich, 1999). Lors de la plongée, une bradycardie importante s'installe et les organes essentiels tels que le cerveau, le cœur et les poumons reçoivent presque la totalité de la circulation sanguine (Renouf, 1990; Leatherwood, 1992). Les muscles fonctionnent alors selon un métabolisme anaérobique (Renouf, 1990). Au niveau du système respiratoire, plusieurs adaptations sont constatées. De la trachée aux bronchioles, les voies respiratoires sont supportées par du cartilage ce qui prévient leur collapse (Leatherwood, 1992). Des fibres musculaires lisses parcourent les bronches et

plusieurs sphincters myoélastiques sont présents dans les bronchioles (Simpson et Gardner, 1972). Grâce au collapse des alvéoles, avant de plonger, les phoques vont expulser presque la totalité de l'air présent dans leurs poumons (Leatherwood, 1992). Une réponse de plongée, décrite comme une bradycardie associée à une période d'apnée, survient fréquemment lors de l'anesthésie de pinnipèdes (Simpson et Gardner, 1972; Schreer et Kovacs, 1997).

Les maladies du système respiratoire

Le taux de mortalité naturelle pour le phoque du Groenland est estimé de 20 à 30% au cours de la première année de vie et de 10% pour les années subséquentes (Kovacs et al., 1985). La santé des pinnipèdes peut être compromise par plusieurs conditions telles que l'inanition, la prédation, les conditions environnementales peu favorables, mais également par de multiples infections parasitaires, bactériennes et virales (Geraci et Lounsbury, 2002) responsables de maladies pulmonaires (Sweeney, 1974). En effet, les affections pulmonaires sont de loin la cause la plus fréquente de maladies systémiques chez les pinnipèdes principalement chez ceux âgés entre 6 et 24 mois (Van Der Kamp, 1987). Ces conditions ont principalement une origine infectieuse : bactérienne, parasitaire ou virale (Sweeney, 1974; Van Der Kamp, 1987; Lawrence et al., 2001).

Les pneumonies bactériennes sont fréquentes chez les pinnipèdes (Gulland et al., 2001) et surviennent lorsque les défenses de l'hôte sont diminuées. Les pneumonies bactériennes peuvent être primaires, mais elles sont généralement secondaires à des infections parasitaires ou virales, une inanition, un trauma ou une néoplasie (Howard, 1983; Gage, 2003; Kelly et al., 2005). Les bactéries les plus fréquemment isolées lors de pneumonies bactériennes sont *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* et *Salmonella* (voir Howard, 1983). Les signes cliniques de ces pneumonies incluent une augmentation de la fréquence respiratoire, de la dyspnée, de la léthargie et de la toux (Gulland et al., 2001).

Les virus sont parfois responsables de maladies systémiques graves chez les pinnipèdes. Des pneumonies virales causées par le morbillivirus à l'origine du distemper, l'influenza et l'herpesvirus sont rapportées (Gulland et al., 2001; Geraci et Lounsbury, 2002). Les infections virales entraînent souvent le développement d'une immunosuppression permettant l'établissement d'infections secondaires bactériennes, parasitaires ou virales (Geraci et Lounsbury, 2002).

Les pneumonies vermineuses affectent fréquemment les phoques (Howard, 1983; Bergeron et al., 1997b). Chez les pinnipèdes, sept espèces de *Metastrongyloidea* (vers pulmonaires), dont six appartiennent à la famille des *Filaroididae* (genre *Parafilaroides*) et un à la famille *Crenosomatidae* (genre *Otostrongylus*), ont été décrites (Gosselin et Measures, 1997; Dailey, 2006). *Parafilaroides*, souvent appelé le petit vers pulmonaire, se loge principalement au niveau des bronchioles et des alvéoles (Fleischman et Squire, 1970). *Otostrongylus circumlitus*, souvent désigné comme le gros vers pulmonaire, se retrouve principalement dans les bronches et bronchioles (Stroud, 1978; Onderka, 1989) et plus rarement dans les artères pulmonaires et le ventricule droit du cœur de certaines espèces de phoques comme l'éléphant de mer du nord (*Mirounga angustris*) (voir Gulland et al., 1997). Comme pour les bronchopneumonies bactériennes, les jeunes phoques de moins d'un an sont plus souvent affectés par les infections parasitaires que les animaux plus âgés. Des infections parasitaires par différentes espèces de parasites sont fréquemment rencontrées (Measures, 2001). Les signes cliniques lors de pneumonies vermineuses peuvent être absents lors d'infections subcliniques, mais de la toux chronique et de la dyspnée peuvent être observées lors infections parasitaires sévères ou d'infections bactériennes secondaires.

Le nématode pulmonaire *Otostrongylus circumlitus*

Le nématode pulmonaire *O. circumlitus* a été décrit pour la première fois chez le phoque commun (*Phoca vitulina*) par Raillet (1899) et, par la suite, par de Bruyn (1933) et

Skrjabin (1933). Ce parasite appartient à la sous-classe des Secernentea, à l'ordre des Strongylida, à la superfamille des Metastrongyloidea, à la famille des Crenosomatidae et au genre *Otostrongylus*. Morphologiquement, il se décrit comme un ver blanc jaunâtre filiforme mesurant environ 10 cm de longueur (Bergeron, 1996). Les mâles adultes mesurent 3.0 à 11.5 cm de longueur et 0.5 à 1.3 mm de diamètre tandis que les femelles adultes, légèrement plus volumineuses, mesurent 3.2 à 14.0 cm de longueur et 0.6 à 2.4 mm de diamètre (Measures, 2001). Les larves de premier stade mesurent, quant à elles, 393 à 469 µm de longueur et 19 à 27 µm de diamètre (Measures, 2001). L'identification du parasite adulte repose sur la visualisation de caractéristiques spécifiques aux nématodes mâle et femelle. En l'occurrence, de courts spicules recouverts de proéminences verruciformes à bouts arrondis et de deux proéminences latérales sur le rayon dorsal de la bourse du mâle sont caractéristiques (Bergeron, 1996). Pour sa part, le ver femelle adulte possède, derrière l'anus, une zone circulaire pigmentée qui lui vaut le nom *circumlitus* (Raillet, 1899).

Cycle vital d'*Otostrongylus circumlitus*

Le cycle vital d'*O. circumlitus* est hétéroxène ce qui signifie qu'il comprend un hôte final, un pinnipède, ainsi qu'un hôte intermédiaire obligatoire qui est un poisson (Bergeron et al., 1997a). Dans le système respiratoire du phoque, la copulation des nématodes adultes a lieu. Par la suite, les femelles ovovivipares pondent des larves de premier stade dans les voies respiratoires (Measures, 2001). Ces larves empruntent l'arbre bronchique grâce à l'action mucociliaire, entrent dans le pharynx où les larves sont avalées et finalement excrétées dans les fèces (Measures, 2001). La période pré-patente est de 31 à 33 jours chez le phoque commun et de 35 jours chez le phoque gris (*Halichoerus grypus*) (voir Anderson, 2000). La larve de premier stade n'est pas infectieuse pour l'hôte final (Measures, données non publiées). En effet, elle doit se développer et compléter deux mues pour le devenir. Dans le milieu extérieur, les larves de premier stade sont ingérées par l'hôte intermédiaire obligatoire. Les études sur la transmission d'*O. circumlitus* effectuées par Bergeron en

1997 ont démontré que la plie canadienne est un hôte intermédiaire adéquat, car elle permet à la larve de premier stade de se développer et muer à deux reprises afin d'atteindre le troisième stade larvaire qui est infectieux pour l'hôte final. Ces deux mues surviennent respectivement entre le troisième et le 39^e jour et vers le 56^e jour suivant l'ingestion de la larve par l'hôte intermédiaire (Bergeron et al., 1997a). La larve de troisième stade se localise sous la séreuse intestinale environ 60 jours postinfection (Bergeron et al., 1997a). Il est intéressant de mentionner que l'infection expérimentale d'invertébrés comme les crustacés et les mollusques n'a pas permis le développement de la larve de premier stade confirmant ainsi que ces organismes ne sont vraisemblablement pas des hôtes intermédiaires valables pour la transmission d'*O. circumlitus* (voir Bergeron et al., 1997a). Cependant, ils pourraient être des hôtes paraténiques, c'est-à-dire, des hôtes de transport dans lesquels les larves ne peuvent pas se développer, mais où elles s'enkystent (Bergeron et al., 1997a).

Le phoque acquiert l'infection à *O. circumlitus* par l'ingestion de l'hôte intermédiaire contenant la larve infectieuse de troisième stade. Une fois ingérée, cette larve traverse la paroi stomacale de l'hôte final et se dirige rapidement dans la circulation porte-hépatique ou vers le système lymphatique (Measures, 2001). Les larves vont par la suite se développer et muer pour devenir des larves de quatrième stade. Les larves empruntent la circulation sanguine en passant par les artères pulmonaires (Onderka, 1989). Le développement et la dernière mue se déroulera dans les poumons, qui est le site principal de l'infection, jusqu'à l'atteinte du stade adulte (Bergeron, 1996). Le parasite se localise généralement dans les bronches, mais il peut également se loger dans l'artère pulmonaire, les vaisseaux du foie et dans le ventricule droit du coeur (Skrjabin, 1933; Bergeron, 1996).

Les jeunes phoques s'infectent fréquemment au cours de l'été suivant leur naissance puisqu'à cette période ils s'alimentent intensivement, favorisant ainsi leur exposition aux hôtes intermédiaires infectés (Bergeron et al., 1997b). La larve de premier stade conserve sa capacité d'infection pour une durée minimale de 23 jours et demeure vivante de trois à six mois dans l'eau salée à 5°C (Bergeron et al., 1997a). Ceci a pour but de favoriser

l'infection d'un plus grand nombre d'hôtes intermédiaires. À titre préventif, il est important de mentionner que la congélation tue les larves présentes dans les tissus de l'hôte intermédiaire (Measures, 2001).

Distribution et hôtes finaux

La distribution de ce nématode est holarctique et circumpolaire. Il se retrouve donc dans les eaux côtières du Canada, des États-Unis, de la Russie, de l'Europe et de l'Islande (Measures, 2001). Les infections par *O. circumlitus* ont été rapportées chez plusieurs espèces de pinnipèdes comme le phoque commun (de Bruyn, 1933; Sweeney, 1974), le phoque annelé (Onderka, 1989), le phoque gris (Baker, 1989), l'éléphant de mer du nord (Stroud, 1978) et le phoque du Groenland (Lucas et al., 2003). Une infection a été aussi observée chez une otarie de Californie (*Zalophus californianus*) (voir Kelly et al., 2005).

Prévalence de l'infection

Les études antérieures, qui ont été colligées dans la référence de Measures (2001), ont démontré des prévalences et des intensités d'infection très variables. Il est important de mentionner que les études de prévalence sont souvent basées sur l'analyse des phoques chassés ou échoués et elles peuvent donc ainsi être biaisées par le manque de représentation de la population naturelle. La plupart de ces études révèlent que l'infection par *O. circumlitus* a une prévalence accrue chez les jeunes pinnipèdes principalement les jeunes de l'année (Onderka, 1989; Bergeron et al., 1997b). À titre d'exemple, une étude effectuée chez les phoques annelés dans les régions ouest de l'Arctique a démontré une prévalence de 32% chez les jeunes de l'année comparativement à 0.5% chez les phoques plus âgés (Onderka, 1989). Une prévalence globale de 10% a été calculée lorsque tous les groupes d'âges ont été inclus dans le calcul. La prévalence observée chez les phoques annelés de l'est de l'Arctique est de 9.5% tous groupes d'âge confondus, mais elle grimpe à

81% lorsque seulement les jeunes de l'année sont comptabilisés (Bergeron et al., 1997b). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la prévalence accrue chez les jeunes phoques. Premièrement, il est possible que chez les jeunes phoques naïfs une immunité s'acquiert après la première infection, ce qui permettrait de prévenir l'établissement d'une seconde infection chez les phoques plus âgés immunocompétents. Deuxièmement, la maturation complète du système immunitaire chez les phoques âgés de plus d'un an pourrait prévenir le développement de l'infection chez ces animaux (Bergeron et al., 1997b). Il est intéressant de noter qu'aucune infection par *O. circumlitus* n'a été rapportée chez des pinnipèdes âgés de moins de trois mois et demi (Onderka, 1989), ce qui suggère l'absence de transmission du parasite par voie verticale ou par l'allaitement (Bergeron et al., 1997a). De plus, l'examen des voies respiratoires des phoques plus âgés n'a pas permis de mettre en évidence la présence de fibrose péribronchique ou péribronchiolaire suggérant que les jeunes de l'année infectés par *O. circumlitus* ne sont plus représentés dans les classes d'âge supérieures à un an (Onderka, 1989). Onderka a proposé que ce nématode puisse jouer un rôle important dans la dynamique de la population. Une grande proportion des phoques infectés pourrait donc ne pas survivre à la pneumonie vermineuse. Une corrélation négative entre l'âge, la prévalence et l'intensité de l'infection a été observée (Claussen et al., 1991).

Susceptibilité des espèces de phocidés

Les lésions résultant de l'infection parasitaire dépendent de la sévérité de l'infection, mais également de la susceptibilité de l'hôte (Measures, 2001). Les pinnipèdes immunodéprimés par des facteurs tels que le stress, une nutrition inadéquate, une maladie concomitante, le jeune âge et le vieillissement sont plus susceptibles aux infections par *O. circumlitus* (voir Kelly et al., 2005). De plus, une relation hôte-parasite récente a été suggérée pour l'éléphant de mer du nord juvénile et pour l'otarie de Californie infectés par *O. circumlitus* (voir Gulland et al., 1997; Kelly et al., 2005). Cette hypothèse repose sur le fait que chez ces deux espèces, la sévérité de la pneumonie vermineuse n'est pas

proportionnelle au nombre de nématodes, la mortalité survient souvent pendant la période pré-patente, ce qui est rarement observé chez les autres espèces des pinnipèdes, ainsi que la localisation inhabituelle des parasites (adultes immatures) au niveau du cœur droit et des artères pulmonaires (Gulland et al., 1997). Il semble qu'une réaction importante survient contre les parasites immatures en migration (Gulland et al., 1997). Chez les autres espèces de pinnipèdes, une réaction minimale envers les larves en migration dans les vaisseaux sanguins est observée et suggère une cohabitation de longue date entre le parasite et l'hôte final (Gulland et al., 1997; Kelly et al., 2005).

Signes cliniques et lésions

Les signes cliniques observés lors de l'examen clinique des pinnipèdes infectés incluent une toux de degré variable, de la dyspnée causée par l'abondance de mucus ou de parasites dans les voies respiratoires, de l'anorexie, de l'émaciation, de la déshydratation et de l'abattement (Measures, 2001). Le mucus dans les voies respiratoires pourrait réduire le volume tidal en augmentant l'espace mort et ainsi réduire l'efficacité des échanges gazeux (Gosselin et al., 1998). La combinaison de la toux et d'une quantité importante de mucus favorise cependant l'expulsion des parasites. Les phoques infectés pourraient avoir une plongée plus courte et moins profonde, ce qui a pour effet de réduire leur période d'alimentation et affecte négativement leur croissance (Onderka, 1989). L'étude d'Onderka n'a cependant pas réussi à démontrer de différence significative de la longueur totale et du ratio de la circonférence sur la longueur totale chez les phoques infectés (Onderka, 1989). Une faible corrélation négative entre l'épaisseur du gras sternal et l'infection par *O. circumlitus* a été cependant démontrée (Bergeron et al., 1997b). Cette relation s'est avérée inversement proportionnelle à l'intensité de l'infection. Une autre conséquence de la pneumonie vermineuse est d'accroître le temps de récupération à la surface après une plongée rendant ainsi les phoques plus vulnérables aux prédateurs humains et animaux (Gosselin et al., 1998). L'infection par *O. circumlitus* peut aussi occasionner la

mort des phoques fortement infectés ou immunodéprimés (Bergeron et al., 1997b) ou chez certaines espèces de phocidés (Gulland et al., 1997).

Tel que mentionné, *O. circumlitus* se localise généralement dans les voies respiratoires inférieures. En effet, il est habituel de retrouver son extrémité céphalique attachée solidement au tissu péri-bronchique tandis que son corps filiforme se localise dans les bronchioles, les bronches primaires et les bronches secondaires. Son extrémité distale peut s'étendre jusqu'à la bifurcation trachéale (Onderka, 1989; Bergeron et al., 1997b; Gosselin et al., 1998). Les poumons affectés peuvent avoir une surface d'apparence marbrée causée par la présence de lobules rouges foncés. Ces derniers correspondent aux lobules pulmonaires atélectasiés desservis par les bronches obstruées par le mucus (Howard, 1983).

Microscopiquement, on observe une hyperplasie de la muqueuse bronchique ainsi qu'une hyperplasie et une hypertrophie des glandes bronchiques résultant en une production excessive de mucus (Onderka, 1989). Lors d'infections plus marquées, une bronchite et/ou une bronchiolite obstructive peut en résulter (Lauckner, 1985; Measures et Gosselin, 1994). Au niveau de la paroi bronchique et du tissu péri-bronchique, on peut constater une fibrose et une infiltration de leucocytes mononucléaires et d'éosinophiles (Lucas et al., 2003). Une infiltration par des neutrophiles et des éosinophiles est aussi notée dans les septums interlobulaires et les parois alvéolaires (Onderka, 1989). Des infections bactériennes et virales concurrentes sont fréquentes. Des trachéobronchites purulentes et des abcès sont aussi rapportés (Van Der Kamp, 1987).

Chez l'éléphant de mer et une otarie de Californie, les lésions histologiques sont similaires et correspondent à une artérite marquée, une pneumonie interstitielle et des thromboses des vaisseaux pulmonaires attribuables à un dommage à l'endothélium vasculaire qui est secondaire à une inflammation importante ou à une coagulation intra-vasculaire disséminée (Gulland et al., 1997). Des artérites, des septicémies et une

coagulation intra-vasculaire disséminée sont observées dans 37% des cas d'éléphants de mer juvéniles infectés par *O. circumlitus* (voir Gulland et al., 1997).

Diagnostic des pneumonies vermineuses

Lors d'infection parasitaire, une éosinophilie sanguine peut parfois être observée (King, 2004). Le diagnostic définitif de pneumonie vermineuse repose sur l'identification de parasites adultes à l'examen post-mortem des poumons ou de larves de premier stade dans les fèces par la technique de Baermann ou sur les spécimens cytologiques des voies respiratoires (Measures, 2001). Dans une étude effectuée par Clausen en 1978, l'identification des larves dans les fèces ou les impressions pulmonaires ont permis de correctement identifier 30 cas d'infection par *O. circumlitus* sur un total de 65 phoques communs (Lauckner, 1985).

Lorsque les mortalités causées par *O. circumlitus* surviennent avant la fin de la période pré-patente, comme c'est le cas chez plusieurs éléphants de mer et une otarie de Californie (Gulland et al., 1997; Kelly et al., 2005), il devient donc difficile de diagnostiquer adéquatement et rapidement les infections parasitaires par les méthodes diagnostiques conventionnelles. Il existe donc un intérêt à développer des nouvelles méthodes complémentaires permettant l'identification d'infections par *O. circumlitus*. Une nouvelle technique diagnostique, basée sur la détection d'immunoglobulines élaborées contre différents tissus du ver pulmonaire, a été développée (Elson-Riggins et al., 2004). Cependant, cette technique n'est pas encore disponible commercialement et n'a pas été validée chez toutes les espèces de pinnipèdes (Elson-Riggins et al., 2004).

Les méthodes diagnostiques du système respiratoire

De façon générale, les méthodes diagnostiques *ante mortem* utilisées dans l'identification des maladies respiratoires incluent l'auscultation, les radiographies, la bronchoscopie et les lavages (trachéaux et bronchoalvéolaires). Dans le cadre de notre

projet, l'auscultation et les lavages bronchoalvéolaires ont été les méthodes sélectionnées et seront détaillées.

Auscultation pulmonaire

Un examen physique complet, peu importe l'espèce animale, doit débiter par l'observation de la respiration et une attention particulière doit être portée sur la fréquence et le patron respiratoire. Par la suite, l'auscultation thoracique doit être attentive afin de déceler la présence de râles, de rhonchus ou de sifflements qui peuvent survenir lors de l'inspiration ou de l'expiration (King, 2004).

Lavage bronchoalvéolaire

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est une technique diagnostique peu invasive qui permet d'évaluer les voies respiratoires inférieures. Le liquide récupéré contient les cellules et le matériel recouvrant l'épithélium respiratoire principalement des alvéoles, mais également des voies respiratoires de plus grandes tailles comme les bronches et les bronchioles (Hawkins et al., 1995). Chez les humains, les petits animaux (King, 2004) et les dauphins (Hawkins et al., 1997), l'examen cytologique du liquide de LBA est utilisé pour diagnostiquer des infections bactériennes, fongiques, à protozoaires et parasitaires. Des organismes similaires sont reconnus pour causer des maladies respiratoires chez les pinnipèdes et les cétacés (Gulland et al., 2001). Le LBA est également utile pour le diagnostic des maladies non infectieuses comme des hémorragies et des néoplasies pulmonaires (Hawkins et al., 1997). Le LBA fournit plus d'information sur les conditions affectant le tissu interstitiel et les alvéoles, mais moins sur les désordres du parenchyme pulmonaire (Hawkins et al., 1990).

La technique du LBA repose sur l'infusion d'une quantité suffisante de saline stérile afin de baigner les alvéoles (Cullough et Brinson, 1999). Le LBA est généralement réalisé à l'aide de la bronchoscopie. L'avantage de cette technique est de permettre de guider le

déplacement du cathéter dans les voies respiratoires, de sélectionner une région précise pour effectuer le lavage et d'y assurer un ajustement serré du cathéter (McCauley et al., 1998; Foster et al., 2004). Le bronchoscope est un appareil coûteux et qui requiert une expertise pour sa manipulation adéquate, ce qui réduit d'autant plus son accessibilité. Des techniques de lavage à l'aveugle (non bronchoguidées), désignées aussi sous le nom de technique de LBA modifiée, ont été développées (McCauley et al., 1998; Hawkins et Berry, 1999). Cette technique comporte des désavantages, mais elle permet cependant de réduire le temps anesthésique de façon significative (Hawkins et al., 1994; Foster et al., 2004). Les principaux désavantages de cette technique modifiée sont de ne pas permettre la sélection d'un endroit particulier que l'on désire échantillonner, ce qui importe surtout lors de pathologie localisée (McCauley et al., 1998) et de ne pas connaître l'emplacement du cathéter lors du lavage empêchant la standardisation de la technique.

Le LBA a été effectué de façon sécuritaire et efficace chez une variété d'espèces animales (Hawkins et al., 1997). Le LBA comporte, sans aucun doute, moins de risques pour l'animal que la méthode de référence qui est la biopsie pulmonaire. La complication la plus fréquemment observée lors du LBA est une hypoxémie transitoire associée à une diminution de la compliance pulmonaire et à un mésappariement de la ventilation et de la perfusion pulmonaire suite à l'injection de saline (Hawkins et al., 1995). On peut également observer une augmentation de la fréquence respiratoire et la diminution du volume courant (King, 2004). Pour ces raisons, on peut donc comprendre que certaines contre-indications existent telles qu'une détresse respiratoire, un risque anesthésique élevé et une fonction cardiaque inadéquate (Hoffman et Viel, 1997; Cullough et Brinson, 1999). Cette hypoxémie répond à l'augmentation de la concentration d'oxygène inspirée. C'est donc pour cette raison qu'une oxygénation immédiatement avant et après la procédure est souvent conseillée (McCauley et al., 1998). Le taux de mortalité suite au LBA chez l'espèce canine est de 2%, mais tous les chiens n'ayant pas survécu à la procédure étaient préalablement dyspnéiques (King, 2004). La technique de LBA n'a été que très rarement

rapportée dans la littérature chez des pinnipèdes vivants (Spragg et al., 2004) et donc le taux de mortalité n'est pas connu.

Les effets résiduels du LBA comprennent un oedème pulmonaire localisé, une distension alvéolaire avec présence de collapse et une congestion du parenchyme adjacent (McCauley et al., 1998). Les radiographies thoraciques démontrent une augmentation de la densité pulmonaire pour un minimum de sept heures (McCauley et al., 1998). Une deuxième étude a révélé l'absence de lésion macroscopique et histologique suite au LBA et la persistance de fluide que pour une période de quatre heures après la procédure (Fogarty, 1990). Les radiographies thoraciques effectuées 48 heures après un LBA ne démontrent aucune anomalie (King, 2004). Des crépitements sont, par contre, parfois audibles jusqu'à 24 heures après le LBA (King, 2004).

Qualité et analyse de la composition cellulaire des LBA

De façon générale, un échantillon du liquide de LBA de bonne qualité est obtenu lorsque celui-ci est mousseux indiquant la présence de surfactant et que le taux de récupération est supérieur à 50% (Hoffman et Viel, 1997; King, 2004). Une quantité moins importante de liquide peut être récupérée chez les animaux comportant une pathologie respiratoire puisque celle-ci pourrait limiter le retour de liquide (Hawkins et al., 1990). Le différentiel leucocytaire effectué sur le liquide de LBA permet généralement d'orienter le clinicien sur la condition respiratoire affectant l'animal (Hawkins et al., 1990). Les macrophages alvéolaires sont, en absence de conditions pathologiques, les cellules qui prédominent dans le liquide de LBA (King, 2004). Le pourcentage de neutrophiles chez les chiens et les chats en santé sont respectivement inférieurs à 5% et 6% (Burkhard et al., 2001). Chez les chevaux, plus de 10 à 12% de neutrophiles indiquent une inflammation neutrophilique des voies respiratoires inférieures (Fogarty, 1990). Une inflammation éosinophilique est diagnostiquée lorsque le pourcentage d'éosinophiles dépasse 5% chez l'espèce canine (Burkhard et al., 2001), mais il est possible de retrouver jusqu'à 26% d'éosinophiles chez des chats sains (Lécuyer et al., 1995). Une inflammation

éosinophilique est observée lors d'infection et de migration parasitaire, de réaction allergique (hypersensibilité), de granulome éosinophilique, d'infection fongique et plus rarement de pneumonie bactérienne (Burkhard et al., 2001). Lors d'infection parasitaire, les éosinophiles sont attirés dans les tissus par des chémokines comme l'interleukine cinq (Il-5) et l'éotaxin (Williams, 2004). Ces molécules sont responsables de la différenciation et de la prolifération ainsi que du recrutement des éosinophiles (Williams, 2004). Les éosinophiles activés détruisent les parasites en libérant le contenu de leurs granules qui est composé entre autres d'oxidants et de phospholipase (Tizard, 2004).

L'évaluation de la composition cellulaire du liquide de LBA a été analysée, à notre connaissance dans une seule étude chez des pinnipèdes sains vivants âgés de trois à huit mois. Trois otaries de Californie, cinq éléphants de mer et un phoque commun ont subi des LBA sous bronchoscopie (Spragg et al., 2004). La technique utilisée consistait à injecter cinq aliquotes de 30 ml de saline 0.9%. Le taux de recouvrement était de 76 ± 6 ml tandis que le taux de protéines et le différentiel leucocytaire variaient légèrement selon l'espèce. Les pourcentages de neutrophiles (moyenne \pm écart-type) obtenus chez les éléphants de mer, les otaries et le phoque commun sont respectivement $0.4\% \pm 0.4$, $7.0\% \pm 2.6$ et 4% . Les pourcentages de macrophages (moyenne \pm écart-type) obtenus chez les éléphants de mer, les otaries et le phoque commun sont respectivement $98.6\% \pm 1.0$, $90.7\% \pm 2.7$ et 95% tandis que les pourcentages de lymphocytes sont respectivement $0.6\% \pm 0.4$, $2.0\% \pm 1.5$ et 0% . La proportion des autres cellules (incluant les éosinophiles) est inférieure à 1% chez le phoque commun, inférieure à 0.3% chez les otaries et de 0% chez les éléphants de mer (Spragg et al., 2004).

La composition cellulaire du liquide de LBA n'est pas altérée par la répétition des LBA. En effet, les LBA peuvent être répétés sans que des altérations cytologiques soient notées à intervalle de 48 heures chez les chiens (King, 2004) et de deux semaines chez les chevaux (Sweeney et al., 1994). Des études antérieures effectuées chez les chevaux ont identifié une légère infiltration locale de neutrophiles suite au LBA qui persiste au moins 48 heures après la procédure (Sweeney et al., 1994).

Histopathologie pulmonaire

Les examens macroscopique et microscopique sont considérés comme les méthodes diagnostiques de référence lors d'affections du système respiratoire. Les lésions pulmonaires détectées lors d'infection par des nématodes varient en sévérité selon le nombre et la taille des parasites, la nature de la réaction immunitaire de l'hôte et, finalement, la chronicité de la condition (Lopez, 2006). Au niveau des voies respiratoires, la réponse inflammatoire envers les parasites est généralement faible, mais elle est plus importante au niveau des alvéoles (Simpson et Gardner, 1972). Le développement de fibrose survient aussi lorsque la condition est plus chronique (Simpson et Gardner, 1972).

Les lésions pulmonaires associées aux infections parasitaires pulmonaires regroupent des pneumonies interstitielles secondaires à une migration larvaire, une bronchite ou bronchiolite chronique causée par la présence de nématodes adultes au niveau des bronches ou des bronchioles ainsi que des pneumonies granulomateuses résultant de la présence de larves (Lopez, 2006). Lors de migration larvaire, les larves peuvent causer une rupture de la paroi alvéolaire. Un infiltrat d'éosinophiles, de neutrophiles, de macrophages et de quelques cellules géantes s'ensuit ainsi qu'une exsudation de fibrine dans la lumière alvéolaire (Dungworth, 1993). Une hyperplasie des pneumocytes de type II de degré variable peut être observée au niveau de la paroi alvéolaire (Dungworth, 1993). La présence de nématodes dans les bronches et les bronchioles cause une surproduction de mucus qui entraîne une bronchite/bronchiolite oblitérante. Cette production de mucus résulte d'une hyperplasie des cellules à gobelet et des glandes bronchiques en réaction à une larve ou à un parasite (Howard, 1983). Une atélectasie lobulaire secondaire à l'obstruction des voies respiratoires est une lésion fréquemment observée lors de pneumonies vermineuses (Lopez, 2006). Finalement, des granulomes constitués par des macrophages et des cellules géantes entourent les larves (Dungworth, 1993).

Corrélation entre les lésions inflammatoires du LBA et de l'histopathologie

Les études divergent quant à la corrélation entre les cellules récoltées lors du lavage et celles présentes dans les sections histopathologiques pulmonaires. Selon Hawkins (1994), les cellules récoltées lors du LBA corrélerent avec les changements histologiques présents au sein des poumons lors de processus inflammatoires et néoplasiques au niveau des alvéoles, des voies respiratoires de petit calibre et parfois du tissu interstitiel. Cependant, deux études, une réalisée chez les équins (Larson et Bush, 1985) et une chez les félins (Norris et al., 2002), ont démontré une faible corrélation entre les cellules retrouvées dans le lavage et celles observées sur les histopathologies pulmonaires. L'hypothèse émise pour expliquer la faible corrélation est que des régions pulmonaires distinctes ont été échantillonnées (Norris et al., 2002). L'examen histopathologique est limité puisque seulement des zones focales sont observées et les lésions ne sont donc pas nécessairement représentatives de l'ensemble de la pathologie respiratoire (Berrag et al., 1997; Norris et al., 2002).

But du projet

Par ce projet, nous souhaitons évaluer la composition cellulaire du liquide de LBA ainsi que les lésions histopathologiques pulmonaires chez un nombre égal de phoques du Groenland exposés ou non exposés aux larves infectieuses de troisième stade du nématode pulmonaire *O. circumlitus*. Si la composition cellulaire du liquide de LBA est statistiquement différente entre les deux groupes, sa détermination pourrait s'avérer un outil diagnostique utile dans la mise en évidence *ante mortem* des pneumonies vermineuses chez les pinnipèdes. Un pourcentage élevé d'éosinophiles dans le liquide de LBA permettrait de suspecter une infection parasitaire pulmonaire chez des pinnipèdes vivants lorsque la technique de Baermann s'est avérée négative. L'examen cytologique du liquide de LBA

serait particulièrement intéressant chez des espèces comme l'éléphant de mer, espèce chez laquelle les mortalités consécutives à l'infection par *O. circumlitus* surviennent souvent avant la fin de la période de pré-patence de ce nématode (Gulland et al., 1997). Le but de notre étude est donc de réaliser des LBA à quatre reprises au cours du projet afin de déterminer si la composition cellulaire du liquide de LBA, en particulier le pourcentage d'éosinophiles, diffère entre les deux groupes. Nous tenterons également de déterminer si la sévérité des lésions histopathologiques est statistiquement différente entre les deux groupes de phoques.

Chapitre deuxième – Article

BRONCHOALVEOLAR LAVAGE AND PULMONARY HISTOPATHOLOGY IN HARP SEALS (*PHOCA GROENLANDICA*) EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *OTOSTRONGYLUS CIRCUMLITUS*

Caroline Piché,¹ Lena Measures,² Christian Bédard,¹ and Stéphane Lair,^{1,3}

¹Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte St, St-Hyacinthe, Québec J2S 2M2, Canada

²Fisheries and Oceans Canada, Maurice Lamontagne Institute, 850 Route de la mer, Mont-Joli, Québec, G5H 3Z4, Canada

³Corresponding author (e-mail: [REDACTED] Phone: 514-345-8521 ext. 1-8667, Fax: 450-778-8110)

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize pathological changes associated with experimental infection of harp seals (*Phoca groenlandica*) with the lungworm *Otostrongylus circumlitus* (Metastrongyloidea: Crenosomatidae). The leukocyte differential cell count in samples obtained by unguided bronchoalveolar lavage (BAL) and intensity of the histological lesions in the lungs were assessed in seven harp seals experimentally exposed to 300 infective third-stage *O. circumlitus* larvae. Seven unexposed harp seals were used as controls. First-stage larvae were observed in the feces of three of the seven exposed seals at 38, 42 and 45 days post-exposure (dpe). Adult nematodes were found in the right primary bronchi of two of these three seals at necropsy 53 dpe. A total of 56 BAL was performed on the 14 seals. No statistical difference was observed between the exposed and control seals and between the four sampling times in percentage of neutrophils and macrophages in the BAL fluid. However, percentages of neutrophils obtained were highly variable and were higher than those usually reported in domestic species. A significant difference was observed between the exposed and control seal groups in the percentage of eosinophils ($P < 0.0001$), the count of eosinophils being increased in exposed seals by a factor of 70.4. Significant statistical differences were observed between exposed and control seals in intensity of interstitial inflammation ($P = 0.001$), bronchitis ($P = 0.02$), bronchiolitis ($P = 0.04$), alveolitis ($P = 0.03$) and interstitial granulomatous inflammation ($P = 0.04$). Our findings showed that harp seals are susceptible to infection with *O. circumlitus*. However, parasitic infections were transient and of low intensity, at least under our experimental conditions.

Key words: bronchoalveolar lavage, harp seal, lungworm, nematode, *Otostrongylus circumlitus*, pathology, *Phoca groenlandica*, pneumonia.

INTRODUCTION

Pneumonia is a common cause of morbidity and mortality in wild and captive pinnipeds (Sweeney, 1974; Howard, 1983; Van Der Kamp, 1987). Diseases of the respiratory system in seals and sea lions have been associated with various parasitic (Stroud, 1978; Howard, 1983; Bergeron et al., 1997b), bacterial, viral and fungal agents (Gulland et al., 2001). Numerous bacterial species have been incriminated in pneumonia of pinnipeds (Howard, 1983) either as the primary etiologic agent or as opportunistic agents following viral (Gulland et al., 2001) or parasitic diseases (Howard, 1983). Verminous pneumonia is a frequent cause of morbidity and mortality in marine mammals (Sweeney, 1974; Van Der Kamp, 1987). In pinnipeds, at least seven species of *Metastrongylidae* are recognized. All but one of these nematodes belong to the *Filaroididae* family (genus *Parafilaroides*) whereas the genus *Otostrongylus* is classified in the *Crenosomatidae* (Gosselin and Measures, 1997; Dailey, 2006). The most frequently reported lungworms in seals are species of *Parafilaroides* and *O. circumlitus* (see Stroud, 1978; Van Der Kamp, 1987). *Parafilaroides* sp., often referred to as the small parenchymal lungworm, is generally observed in the lumen of the bronchioles and in the pulmonary alveoli (Fleischman and Squire, 1970), whereas the large lungworm, *O. circumlitus*, resides in the bronchi and in the bronchioles (Stroud, 1978; Onderka, 1989). *Otostrongylus circumlitus* is also reported in the pulmonary arteries and right ventricle of elephant seals (*Mirounga angustirostris*) (see Gulland et al., 1997) and one California sea lion (*Zalophus californianus*) (see Kelly et al., 2005).

Infection of seals with *O. circumlitus* occurs after the ingestion of an obligate intermediate host containing infective third-stage larvae (Bergeron et al., 1997a). It is believed that these larvae reach the pulmonary tissue through the portal or lymphatic circulation and the pulmonary arteries. Adult female nematodes, which are ovoviviparous, release first-stage larvae into pulmonary tissues. Larvae passively move up the bronchial

escalator by mucociliary action into the pharynx where they are swallowed and finally excreted with feces (Measures, 2001).

Otostrongylus circumlitus has a Holarctic and circumpolar distribution and has been reported in many seal species including harbor seals (*Phoca vitulina*) (see Gosselin et al., 1998), ringed seals (*Phoca hispida*) (see Onderka, 1989), grey seals (*Halichoerus grypus*) (see Baker, 1989), northern elephant seals (Stroud, 1978) and harp seal (*Phoca groenlandica*) (see Lucas et al., 2003). One case of infection with *O. circumlitus* has also been described in a California sea lion (Kelly et al., 2005). The prevalence and intensity of parasitic infections are highly variable between seal species and among studies (Measures, 2001). In general, the prevalence of infection with *O. circumlitus* is higher in young seals, especially young-of-the-year (YOY) (Onderka, 1989). Infection of adult seals is observed less frequently. One study reported a prevalence of 81% in YOY ringed seals from eastern Arctic Canada compared to an overall prevalence of 9.5% when all age groups were included (Bergeron et al., 1997b). In that study, the mean intensity of infection was 9.4 adult nematodes with a range of one to 32 parasites per animal (Bergeron et al., 1997b). Overall prevalence in grey seals and in harbor seals from the Canadian east coast was reported as 5% and 6%, respectively (Gosselin et al., 1998) but in YOY prevalence reached 82% (Gosselin et al., 1998).

Clinical signs reported in harbor seals infected with *O. circumlitus* are of variable intensity and include cough, dyspnea, anorexia, emaciation, dehydration, and depression (Vercruyse et al., 2003). Onderka (1989) suggested that infected seals may have shorter and more superficial dives compared to uninfected seals which may lead to a reduced capacity to forage. A negative correlation between sternal blubber thickness and the intensity of *O. circumlitus* infection has been shown in ringed seals suggesting a negative effect of this parasite on energy reserves (Bergeron et al., 1997b). Lesions reported with *O. circumlitus* ranged from excessive production of mucus in the airways to obstructive bronchitis as well as bronchiolitis (Measures and Gosselin, 1994). Bacterial

concomitant infections are frequent and suppurative tracheobronchitis and pulmonary abscesses have also been reported (Onderka, 1989).

Antemortem diagnosis of lungworm infection is based on the identification of first-stage larvae in bronchial mucus and in fresh feces using the Baermann technique (Measures, 2001). However, the absence of these larvae in sputum or feces cannot rule out a verminous pneumonia. Causes of false negative Baermann results include sampling during the prepatent period (PPP), infection with parasites of the same sex or only one nematode, intermittent shedding of larvae or too few larvae being passed in feces to detect. An assay based on the detection of immunoglobulins against *O. circumlitus*, has been recently developed for the northern elephant seal and for the Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richarii*), but is not yet available commercially (Elson-Riggins et al., 2004). Bronchoalveolar lavage (BAL), which is a commonly used diagnostic method to assess pulmonary disease in domestic animals, has also been used in pinnipeds. However, to the best of our knowledge, this technique has not been thoroughly described as a viable diagnostic tool for phocids in the veterinary literature.

The objective of this study is to characterize pulmonary changes in young-of-the-year harp seals associated with experimental infection with *O. circumlitus*. We are also interested in assessing the usefulness and safety of unguided BAL as an *antemortem* diagnostic procedure for this parasitic infection.

MATERIALS AND METHODS

Care of animals

This project was carried out according to animal care protocols approved by the animal care committees of the institutions involved in this project, both of which operate under the auspices of the Canadian Council on Animal Care. Fourteen recently weaned female harp seal pups, aged approximately 12 days, were live captured on the pack ice in the Gulf of St-Lawrence in March 2004 and transported by air to the Maurice Lamontagne Institute (Mont-Joli, Québec, Canada). The seals weighed on average 28.0 ± 4.7 kg (mean \pm SD) during the experiment. The animals were kept in two indoor fiberglass tanks measuring 3.71 m x 3.55 m x 1.36 m with a capacity of 17,900 L each filled with salt water (flow rate, 20 L/minute; salinity, 24-30%). Each tank had a haul-out ledge of 1.82 m x 3.55 m. Thermoneutral conditions were maintained (air, 10 °C; water, 0 °C) with a complete air exchange every five minutes. Seals initially fasted in dry tanks to facilitate completion of the molting process. After 10 days, they were fed *ad libitum* daily first with defrosted frozen shrimp, then capelin (*Mallotus villosus*) and herring (*Clupea harengus*). Vitamin and mineral supplements (SeaTab®, Pacific Research Laboratories, San Diego, California, USA) were given daily with fish as part of the diet.

Exposure to *Otostrongylus circumlitus*

Infective third-stage larvae used in this study were obtained from eight American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) infected in October 1999 with first-stage *O. circumlitus* larvae obtained from naturally infected ringed seals. Third-stage larvae were obtained from plaice according to the technique previously described (Bergeron et al., 1997b).

A double-blinded design was used in this experiment. Seals were divided into control group (seals #1 to #7) and exposed group (seals #8 to #14). After a 10 day period of fast allowing acclimation and following a 12 hour fast, the seals from the exposed group were given, by gastric intubation, 5 ml of saline containing approximately 300 *O. circumlitus* infective third-stage larvae. Control seals received 5 ml of saline by gastric intubation.

Sample collection

During the 10 weeks of the experiment, each seal was anesthetized four times for the unguided bronchoalveolar lavage (BAL) procedure. The first BAL was conducted just prior to exposure to *O. circumlitus* infective larvae i.e. 0 day post-exposure (dpe). The three other BAL were conducted 20, 34 and 53 dpe, respectively. The anesthesia protocol used has been described elsewhere (Pang et al., 2006). Briefly, food was withheld for 12 hours prior to anesthesia. Each seal was premedicated with 2 mg/kg of aminophylline (Hospira Healthcare Corporation, Saint-Laurent, Québec, Canada) intramuscularly. Midazolam hydrochloride (Versed® 5 mg/ml, Hoffmann - La Roche Limited, Mississauga, Ontario, Canada) was administered (0.1 to 0.2 mg/kg) intramuscularly at the same time in selected animals. Mask induction with isoflurane (AErrane®, Baxter, Baxter Corporation, Mississauga, Ontario, Canada) using a hand made mask (semi-rigid modified traffic cone) with a Bain non-rebreathing system was performed to achieve muscle relaxation. When obtained, the animal was intubated with a cuffed endotracheal tube of 6-7 mm internal diameter. Prior to intubation, endotracheal tubes were soaked in a solution of 1% p/v Virkon® (Vetoquinol Inc, Lavaltrie, Québec, Canada) for 20 minutes and then rinsed with sterile saline. Bronchoalveolar lavage was performed after stabilization of vital signs and level of anesthesia. A sterile Sovereign® urinary catheter (external diameter: 2.7 mm; length: 56 cm) (Sherwood Medical, St-Louis, Missouri, USA) was inserted into the endotracheal tube and gently advanced until resistance was encountered or up to full insertion of the catheter. A total of 9 to 17 ml of warm sterile saline was then slowly

injected and immediately withdrawn using a 60 ml syringe catheter tip (Terumo Corporation, Elkton, Maryland, USA) directly attached to the urinary catheter. At the end of the lavage procedure, isoflurane was ceased. Extubation followed return to spontaneous ventilation. Animals were returned to the tank after complete recovery from anesthesia. After the fourth BAL procedure, seals were euthanized using sodium pentobarbital (Euthanyl forte, Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, Ontario, Canada) injected intravenously while still under general anesthesia. A complete necropsy was performed on each seal. Six samples of lung tissue were taken from each seal for histopathological examination, three samples from each lung (from the cranial third, from the medial third and from the caudal third). Sampled tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin and later processed using standard histological techniques, embedded in paraffin wax, sections cut 5 to 7 μm thick and stained with hematoxylin, phloxine and saffron (HPS) (Luna, 1968). From 33 to 53 dpe, feces of exposed seals were collected by gently inserting a lubricated soft plastic tube into the rectum. Feces were placed in a modified Baermann apparatus as previously described (Bergeron et al., 1997b) and the presence of first-stage larvae noted.

Sample preparation and evaluation

BAL fluid was measured and characterized by color, turbidity and presence of mucus based on a predetermined scoring system (Table 1). The fluid obtained was poured into a 3 ml (7%) and a 7 ml (15%) EDTA K₃ tubes (Monoject®, Tyco Health Care Group LP, Mansfield, Massachusetts, USA). Two to three drops of autologous serum were added to the 3 ml of bronchoalveolar fluid which was then refrigerated within 1 hour of collection. The 3 ml tube was used to prepare two 200 μl cytopins (Zinkl, 2002) (Cytospin2®, Shandon Southern Instruments inc., Sewickley, Pennsylvania, USA) centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes within 12 to 36 hours of collection. Within two hours of collection, the 7 ml tube was used to measure the BAL fluid density with a refractometer (Leica TS Meter Refractometer®, Leica Microsystem Inc., Buffalo, New York, USA). The

fluid was then centrifuged (Dynac II centrifuge, Becton, Dickinson & Co., Parsippany, New Jersey, USA) in a tube with a conical base (Sarstedt Inc, Newton, North Carolina, USA) at 1000 rpm for 10 minutes. The supernatant was removed and one drop of the sediment, taken with 1 ml glass Pasteur pipette (Wheaton, Millville New Jersey, USA), was placed on a slide to prepare a line smear (Zinkl, 2002). Four to six line smears were prepared from each sample. The cytopins and the line smears were stained with a modified Wright stain (7120 Aerospray® Slide stainer, Wescor Inc, Logan, Utah, USA). Microscopic examination of BAL fluid was performed by the same observer (CP) blinded for the seal and the period at which the sample was taken. Each BAL sample was scored for the presence of inflammatory cells and non-inflammatory cells (squamous and ciliated columnar cells) on line smears (10 random fields, power 10x). The smears were scored as follows: 0 = absent; 1 = cells on one field; 2 = cells on two to five fields; 3 = cells on six to ten fields; 4 = numerous cells in every field. Differential leukocyte counts were determined manually on cytopins or line smears by counting 200 cells when available. If less than 200 cells were observed, the number of cells counted was recorded. Samples containing less than 15 cells were rejected. The presence of phagocytized bacteria, microscopic mucus and Curschmann's spirals were recorded.

Histopathological examination of all six samples of lung tissue was performed blinded by two observers (CP and SL). When results differed from one observer to the other, slides were re-examined jointly until a consensus was reached. Each slide was assessed for the presence of pleuritis, interstitial inflammation, presence of mucus in the airways, bronchitis, bronchiolitis, bronchial glandular hyperplasia, alveolar atelectasia, alveolitis and interstitial granulomatous inflammation. The scoring system used for this evaluation is presented in Table 2. The presence of larvae in tissue sections was also assessed. For each lesion category, the sum of all pulmonary tissue scores was calculated and used for statistical analysis.

Statistical analysis

Repeated measure ANOVA with period as a within-subject factor and group as a between-subject factor was used to evaluate statistically the percentage of BAL fluid recovery, the fluid density and the percentage of neutrophils and macrophages in the differential leukocyte count. *A priori* contrast was used to examine differences between groups at each sampling time. The percentage of eosinophils and lymphocytes observed in the differential leukocyte counts were evaluated with a binomial regression model with period as a within-subject factor, group as a between-subject factor, and number of available cells as an offset. A Cochran-Mantel-Haenzel statistical test was used for the ordinally-scaled variables (BAL fluid color, turbidity, presence of mucus and cell scores) to examine whether the average score within each group differed at each sampling and between groups. For prevalence variables such as presence of phagocytized bacteria, microscopic mucus and Curschmann's spirals, an exact chi square statistic test was used. A Wilcoxon 2- sample test was used to compare the median score between groups for each histopathological lesion category. A $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using SAS v9.1® (SAS institute Inc, Cary, North Carolina, USA).

RESULTS

Infection with *Otostrongylus circumlitus*

Infection was confirmed in three of the seven harp seals (#10, #11 and #12) experimentally exposed to infective larvae of *O. circumlitus*. First-stage larvae were found in the feces of these three animals 42, 38 and 45 dpe, respectively. Number of larvae detected per sample of feces ranged from 3 to more than 32 (no definitive count made for seal #10). Adult nematodes (two males and two females) were found at necropsy in the lumen of the right primary bronchi of seal #11 and #12 (Figure 1) but none was found in seal #10. Neither larvae in feces nor adult nematodes were observed in the remaining four exposed seals (#8, #9, #13 and #14). Seal #9 was euthanized five days prior to the end of the experiment due to a subcutaneous abscess unrelated to exposure to *O. circumlitus*.

Bronchoalveolar lavage

On average, $56.6 \pm 18.2\%$ (mean \pm SD) of the injected BAL fluid was recovered. The percentage of BAL fluid recovered was not significantly different between exposed and control groups with all sampling times confounded ($P=0.07$). However, there was a significant difference in percentage of fluid recovered between the different sampling times with both groups confounded ($P=0.03$). Prior to exposure (0 dpe), different volumes (between 9 to 17 ml) of warm saline were used for BAL. In control seals, there was a significant difference in percentage of fluid recovered depending on the amount of fluid injected ($P=0.03$). There was a greater percentage of fluid recovered using an injection of 15 ml of saline compared to an injection of 17 ml of saline. BAL fluids were generally colorless to slightly whitish, clear to slightly cloudy and often contained a small quantity of mucus. The gross appearance of BAL fluid did not differ between exposed and control animals or between sampling times. The density of BAL fluid was greater in exposed seals

[1.0058 ± 0.0007 (mean ± SD)] compared to control seals [1.0053 ± 0.0005 (mean ± SD)] with all sampling time confounded ($P=0.03$).

In control seals, the mean leukocyte score was higher 34 dpe compared to the baseline value 0 dpe ($P=0.04$). In exposed seals, no significant difference was found in the leukocyte score between sampling times. In exposed seals, the mean non-inflammatory cell score was lower 20 dpe compared to the baseline value 0 dpe ($P=0.048$). In control seals, there was no significant difference in the non-inflammatory cell score between sampling times. At 53 dpe, a greater mean non-inflammatory cell score was observed in control seals compared to exposed seals ($P=0.04$). No statistically significant differences were observed between control and exposed seal groups for the presence of phagocytized bacteria ($P=0.26$), microscopic mucus ($P=0.35$) and Curschmann's spirals ($P=0.37$) with all sampling times confounded.

Eight of the 56 BAL samples were excluded from the leukocyte differential cell count due to low inflammatory cell density. Five of these excluded samples were from the control group whereas three were from the exposed group. Three of these eight excluded BAL samples were collected 0 dpe, and five samples were collected 20 dpe. Percentages of neutrophils, macrophages and lymphocytes for each group on each sampling day are presented in Table 3. No statistically significant difference was seen in the percentages of neutrophils and macrophages between the two groups with all sampling times confounded (neutrophils, $P=0.92$; macrophages, $P=0.51$), and between BAL sampling times with both groups confounded (neutrophils, $P=0.27$; macrophages, $P=0.49$). The percentage of lymphocytes had decreased odds of 0.11 in exposed compared to control seals 20 dpe ($P<0.01$) (Table 3).

The large proportion of BAL samples without eosinophils (30/48 of the samples) precludes comparison of percentage of eosinophils between exposed and control seals at each sampling time. Therefore, all samples were combined based on exposure or not to *O. circumlitus*. A significant difference was observed between the exposed and

non-exposed seals (exposed seals 0 dpe and control seals) in the percentage of eosinophils ($P < 0.0001$), the count of eosinophils being increased in exposed seals by a factor of 70.4. The percentages of eosinophils in all BAL samples from the non-exposed seals ranged between 0 and 1% (Table 4). All seven seals exposed to *O. circumlitus* larvae had at least one value of eosinophils equal or greater than 5% at one or more post-exposure BAL sampling time, except seal #9.

Lung pathology

Areas of parenchymal congestion were observed in the lungs of seals #8, #10, #11, #12 and #13. These areas were associated with well demarcated rhomboid zones of pulmonary collapse in seal #11 and #12 (Figure 2). Marked tracheobronchial lymphadenomegaly was also observed in all the exposed seals except seals #9 and #14 (Figure 2). Moderate congestion of the pulmonary parenchyma and mild to moderate diffuse edema of interlobular septum were common findings in both exposed and control seals. Inflammatory changes were present in the bronchi of four of the seven exposed seals (#8, #9, #11 and #12) with lesions of bronchitis observed in one, four, three and one of the six sections of lung tissue examined, respectively. The lumen of the inflamed bronchi often contained a variable quantity of mucus frequently infiltrated by granulocytes. Mild to moderate infiltration of the bronchial mucosa and submucosa by a mixed population of inflammatory cells composed of lymphocytes, small macrophages and granulocytes was observed. Peribronchial cellular infiltrates were also seen in three of the exposed seals. Hyperplasia of the bronchial glands was seen in three exposed (#11, #12 and #14) and two control seals (#2 and #3). These hyperplastic changes were mild and focal in the two control seals and mild to focally extensive in the three exposed animals in which they were seen in one, two and three of the sections of lung tissue examined, respectively. The hyperplastic glands were formed of swollen, tall cuboidal epithelial cells centered on markedly dilated lumens filled with mucus. Focally extensive lesions of obstructive bronchitis associated with marked glandular hyperplasia were seen in both seals in which

adult nematodes were recovered. These lesions were characterized by complete occlusion of the bronchial lumen by a large quantity of mucus containing a large number of granulocytes (neutrophils and/or eosinophils). The pulmonary parenchyma surrounding the occluded bronchi was extensively collapsed (Figure 3). Mild to moderate multifocal bronchiolar inflammatory changes were also observed in five exposed seals and two of the control animals. These lesions of bronchiolitis were especially prominent in one of the seals in which adult nematodes were found in the airways (seal #11). Focally extensive accumulation of numerous and often degenerate leukocytes in the alveolar lumen was observed in a section of lung tissue in one of the exposed seals (#12). These abundant cellular infiltrates were associated with a loss of the normal pulmonary architecture, the presence of alveolar fibrinous material, and with a marked focally extensive hyperplasia of type II pneumocytes. The alveolar lumen surrounding these areas contained numerous vacuolated macrophages and eosinophils. Aggregates of lymphocytes were also occasionally present. Mild to moderate multifocal infiltration of the alveolar lumen with a small number of foamy macrophages, neutrophils and eosinophils was observed in all seals in control and exposed groups. These lesions of alveolitis, which were usually observed throughout the six sections of lung tissue examined, were generally more extensive in exposed seals compared to control animals. Multifocal infiltration of the interlobular septum and alveolar walls by a variable number of inflammatory cells were observed in all exposed seals and mildly in three control seals. These interstitial infiltrates were composed, in descending order of occurrence, of neutrophils, eosinophils, small macrophages and lymphocytes, and were present in two (one seal), three (two seals), four (two seals), five (one seal) and six (one seal) of the examined sections of lung tissue. Well demarcated small cellular aggregates formed of macrophages, eosinophils, lymphocytes and multinucleated cells were observed in the pulmonary interstitium of two of the exposed seals (#11 and #12). These granulomas were seen in only the left caudal lung of one of the seals and in the left medial lobe in the other animal. In one of these cases (seal #11), the granulomatous reaction was often centered on cross-sections of larval nematodes surrounded by degenerate

eosinophils (Figure 4). Statistically significant differences were detected between exposed and control seals in the severity of interstitial inflammation, bronchitis, bronchiolitis, alveolitis and interstitial granulomatous inflammation (Table 5).

Table 6 shows the concordance between the predominant type of leukocytes observed in the BAL fluid collected just prior to euthanasia 53 dpe and the predominant type of leukocyte observed in the respiratory airways (bronchi, bronchioles, alveoli) on histological examination. Concordances between these two evaluations were present for seven of the 14 seals (50%). This concordance was 100% for cases where macrophages were the predominant inflammatory cells in the BAL fluid, whereas concordance between BAL and histological evaluation was not observed when neutrophils were the most prevalent leukocytes in the BAL fluid.

DISCUSSION

We successfully induced verminous pneumonia in at least three of the seven harp seals exposed to infective third-stage *O. circumlitus* larvae obtained from experimentally infected American plaice. We are confident that the source of these infections is the administered larvae since the experimental animals were brought into captivity shortly after weaning and during their natural fasting period (Lavigne and Kovacs, 1988). Vertical transmission *in utero* or during lactation are unlikely as no infection with *O. circumlitus* has been reported in seals younger than three and one-half months of age (Onderka, 1989). In addition, all food given to seals during this study were frozen which destroys larvae in invertebrates or fish tissue (Measures, 2001).

We performed 56 BAL without complication or mortality. This diagnostic procedure can be safely performed using the technique described here, at least in healthy seals or seals with moderate pulmonary diseases. The use of a bronchoscope would probably have increased the quality and diagnostic potential of the samples since it permits targeting segments of the pulmonary tree displaying gross changes (McCauley et al., 1998). In addition, a bronchoscope facilitates ideal positioning (snug fit) of the catheter in the respiratory airways which can increase the recovery of BAL fluid and standardization of the technique (McCauley et al., 1998; Foster et al., 2004). Nevertheless, unguided BAL can be performed when a bronchoscope is not available. For BAL, we elected to inject a small amount of saline in only one aliquot to improve the safety of the lavage and to reduce the duration of the procedure. However, *a posteriori*, injecting a larger amount of saline would probably have resulted in a greater recovery of BAL fluid, increased quality of samples, and probably an increased number of inflammatory cells. Other studies indicate that three aliquots of saline totalizing 5 ml/kg can be used safely in dogs to obtain a good quality BAL (Burkhard et al., 2001). If we apply these recommendations, the total quantity of saline that could be used safely in our seals is 140 ± 24 ml (mean \pm SD) as seals weighed 28.0 ± 4.7 kg (mean \pm SD) on average during the experiment. Thus, the injection of 40 to

55 ml, if the lavage was repeated three times, or 30 ml if the lavage was repeated five times, would yield a good quality lavage. Five aliquots of 30 ml each was used by Spragg et al. (2004) in BAL of three species of pinnipeds.

Approximately half of the injected saline, [$56.6 \pm 18.2\%$ (mean \pm SD)] was recovered. This is similar to that reported in small animals (50 to 90%) (Cullough and Brinson, 1999) and pinnipeds ($76 \pm 6\%$) (Spragg et al., 2004). Extensive pulmonary lesions can affect BAL fluid recovery (Hawkins et al., 1990). The lack of a difference in the percent recovery of BAL fluid between exposed and control seals in our study is not surprising since pulmonary histopathological changes were not extensive. The statistical analysis revealed a significant difference in the density of BAL fluid between the two groups with all sample times confounded. However, this difference is too small to be detected on the portable refractometer used in this study. Differences were seen in the mean score of inflammatory cells and non-inflammatory cells between some of the sampling times. Multiple factors such as the technique, the amount of BAL fluid used to prepare smears, the presence of mucus and the adherence of cells to it can result in considerable variation in cell count (Jolie et al., 2000). Consequently, the differences in BAL fluid cell score observed in our study between some of the sampling times may be due, at least in part, to an improvement in use and efficiency of the technique over time.

In our study, percentages of neutrophils and macrophages were not different between exposed and control groups (Table 3). This suggests that exposure to the parasite does not result in significant variation of these two types of leukocytes in the BAL fluid, or that the number of seals from the exposed group that developed verminous pneumonia was too low to detect a statistically significant difference. In addition, there was no significant difference in percentages of neutrophils and macrophages by time of sampling with all groups confounded. Based on this finding, it seems that repeating the BAL at two to three week intervals does not significantly influence percentages of these two cell types which are the two most abundant leukocytes in BAL fluid. Many studies indicate a lack of alteration in cell composition of BAL fluid in dogs (King, 2004) and horses (Sweeney et

al., 1994) when the BAL are repeated at intervals of 48 hours and two weeks, respectively. However, in horses a local neutrophilic infiltration persists at least 48 hours after the procedure (Sweeney et al., 1994). We did not observe age-related differences in leukocyte differentials. This differs from a study done with piglets that shows an age-related increase of neutrophils in the BAL fluid during the first 10 weeks of age (Jolie et al., 2000).

In our study, percentages of neutrophils present in the BAL fluid of control seals were higher than reference ranges reported for domestic species including dogs, cats (Cowell et al., 1998; Baker and Lumsden, 2000; Burkhard et al., 2001), and horses (Fogarty, 1990; Zinkl, 2002). Percentages of neutrophils in BAL fluid in healthy dogs and cats are generally under 5% and 6%, respectively (Burkhard et al., 2001). In horses, more than 10 to 12% of neutrophils in BAL fluid suggests a neutrophilic inflammation of the lower respiratory tract (Fogarty, 1990). To our knowledge, only one study reported reference ranges of leukocyte differential counts in BAL fluid from pinnipeds (Spragg et al., 2004). Percentages of neutrophils obtained from three California sea lions, five Northern elephant seals and one harbor seal, were $0.4 \pm 0.4\%$ (mean \pm SD), $7.0 \pm 2.6\%$ and 4%, respectively. Percentages of macrophages obtained from these three species were $98.6 \pm 1.0\%$ (mean \pm SD), 90.7 ± 2.7 and 95%, respectively (Spragg et al., 2004). The relatively high percentages of neutrophils observed in our study and the high variability of these counts may be attributed, at least in part, to the fact that the segment of the respiratory tree sampled via a blind BAL is not necessarily homogeneous from one sample to the other. It is known that higher percentages of neutrophils should be expected in the proximal respiratory tract (trachea) compared to the distal airways (Mair et al., 1987). The high percentages of neutrophils observed in our control animals as well as the presence of numerous squamous and ciliated epithelial cells suggest that blind placement of the catheter did not prevent saline injection into the tracheal lumen and therefore cells in the BAL fluid recovered may be more representative of the tracheobronchial region. The fact that only one aliquot of saline was injected might also account for the higher percentage of neutrophils observed (King, 2004). Indoor environmental conditions, including air and

water quality, could also play a role in the unusually high percentage of neutrophils observed in our study since exposure to aerosolized particles is known to be a cause of neutrophil increase in BAL fluid (Mair et al., 1987; Jolie et al., 2000). Interestingly, histopathological examination of lung tissues revealed a mild alveolar infiltration by leukocytes in both control seals and exposed seals. These lesions of diffuse low grade alveolitis in our experimental animals support the possibility of exposure to a low level of environmental irritants.

Most of the seals exposed to *O. circumlitus* larvae had a statistically higher percentage of eosinophils in BAL fluid compared to that from control animals (Table 5). Consequently, exposure to *O. circumlitus* larvae was associated with a relative increase of eosinophils in the airways in exposed seals. This finding is not surprising given that parasitic infection of tissues is commonly associated with accumulation of eosinophils in the affected tissue (Williams, 2004). However, it shows that differential count of eosinophils in BAL fluid is a sensitive tool in the detection of infection with *O. circumlitus* in harp seals. In a clinical context, verminous pneumonia should be considered in a seal for which the percentage of eosinophils in the BAL fluid is higher than 2%. However, since other non-parasitic conditions, such as allergic reactions, eosinophilic granulomas and fungal infections, can also be associated with an increase in the number of eosinophils, this finding is not specific to verminous pneumonia (Burkhard et al., 2001). Percentages of eosinophils greater than 7% were observed in at least two post-exposure BAL fluid samples in three seals for which larvae were detected in their feces. Increased percentages of eosinophils in BAL fluid were seen 20 and 34 dpe, but not 53 dpe in the seal (#10) that did have a positive Baermann test for the presence of larvae in feces, but for which no adult lungworm was observed during *postmortem* examination. Increased percentages of eosinophils in the BAL fluid were also observed in three of the other exposed seals (#8, #13 and #14) in which neither larvae in feces nor adult lungworms in the airways were observed. These observations suggest that these four animals had a transient infection of *O. circumlitus* of short duration and eliminated the infection before the end of the

experiment. Negative Baermann results in three of these four animals could be explained by expulsion or death of the parasites before the end of the prepatent period, transient infection by only one nematode or same sex nematodes, intermittent shedding of larvae or a low number of larvae in the feces precluding detection using the method employed. The Baermann technique (and its modified versions) is frequently employed to detect larval metastrongyloids in terrestrial animals. This method has its limitations especially when low numbers of larvae are being passed (Forrester and Lankester, 1997) as seen in seals in this experiment. Furthermore, collecting feces of aquatic mammals is problematic and rectal sampling often yields small quantities of feces at a time. The remaining exposed seal (#9) did not show an increase in the percentage of eosinophils in any BAL fluid samples. Interestingly, regurgitation occurred in seal #9 as well as seal #14 just after administration of infective larvae by gastric intubation followed by a saline injection of about 5 ml to rinse the tube. The possible expulsion of a small portion of the administered larvae could account for the lack or low intensity of infection in these two seals.

Gross and histopathologic lesions observed in seals with active infections were similar to those described in ringed seals with natural infections (Onderka, 1989) and other verminous pneumonia in domestic animals (Stockdale and Hulland, 1970; Dungworth, 1993) and wild canids (Smith, 1978; Bourque et al., 2005). The main pathologic feature of these infections is the presence of focal to multifocal bronchitis and bronchiolitis usually associated with a marked glandular hyperplasia most likely induced by the irritating or immunogenic nature of these parasites. The hypersecretion of bronchial and bronchiolar glands results in the obliteration of the bronchiolar lumen preventing ventilation of the associated pulmonary lobule and causing the well demarcated areas of lobular atelectasia observed grossly in these seals in the present study. Multifocal subacute infiltration of the pulmonary interstitium, possibly associated with larval migration (Lopez, 2006), was also a feature in these experimentally infected seals. The presence of pulmonary granulomas was only observed in the two seals that had lungworms at necropsy. Larval *O. circumlitus* was seen in the center of a granuloma in one of these two seals (#11).

Otostrongylus circumlitus infections observed in our study were limited to the airways and pulmonary interstitial tissues. Neither parasites nor lesions were observed in the cardiovascular system. This distribution is similar to that reported in ringed seals in which immature *O. circumlitus* were found in blood vessels in only two of the 39 seals with *O. circumlitus* infections (Onderka, 1989), but this differs from natural infections seen in northern elephant seals in which immature adult female *O. circumlitus* (eggs not fully developed and no larvae present in uterus) were often present in the right cardiac ventricle and the lumen of the pulmonary arteries (Gulland et al., 1997). The vascular involvement, the significant vasculitis and lesions of disseminated intravascular coagulation seen in northern elephant seals suggests that this host is poorly adapted to this species of lungworm (Gulland et al., 1997).

There was 50% agreement between results of *antemortem* BAL and those of histopathological examination of lung tissue sections with respect to the predominant cellular infiltrate in the airways of seven of the 14 seals (Table 6). The 50% disagreement may be explained by the relatively limited volume of pulmonary tissue examined histologically which may not be representative of the entire organ (Berrag et al., 1997; Norris et al., 2002). The BAL has the advantage of sampling a larger surface and multiple regions of the lungs easily (Norris et al., 2002). It is also worth mentioning that even when lesions associated with parasitic infection are localized, eosinophilia may be observed throughout the lungs and not only near the gross or microscopic areas of the lesions (Dawson et al., 2005). Therefore, BAL and pulmonary histopathology are complementary diagnostic tools used in the diagnosis of pulmonary diseases (Norris et al., 2002), albeit the former is an *antemortem* and the latter is usually a *postmortem* method.

All but one of the seals exposed to *O. circumlitus* larvae showed an increase in percentage of eosinophils in the BAL fluid compared to that of control animals. This suggests that parasites reached the airways in six of the seven exposed seals. Evidence of patent infection was seen in only three of these six seals, and active infections of low intensity were observed 53 dpe in only two seals. If we assume that the infective potency of the larvae

used in this study is similar to the level encountered in naturally acquired infection, our results suggest that harp seals are susceptible to experimental infection with *O. circumlitus* but they are capable of limiting infections to a transient nature (i.e. short duration) or to low intensity infections with associated mild or subclinical disease. The fact that harp seals may be generally refractory to infection with *O. circumlitus* is supported by field observations in YOY harp seals (Gosselin et al., 1998; Measures, 2001; Lucas et al., 2003; Measures, unpub. data).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of Maurice Lamontagne Institute, including France Boily, and Stéphanie Larouche for their invaluable assistance and support throughout this project. We also want to acknowledge Guy Beauchamp for his support and valuable work on statistical analyses. This project was funded by the following organizations: Canadian Biotechnology Strategy; Fisheries and Oceans Canada; Natural Science and Engineering Research Council of Canada and the Fond du Centenaire de l'Université de Montréal.

TABLES

Table 1. Scores used in the semiquantitative assessment of the gross appearance of the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid.

Score	0	1	2	3
Color	Colorless	Slightly whitish	Moderately whitish	White
Turbidity	Clear	Almost completely clear	Partially cloudy	Completely cloudy
Presence of mucus	Absent	Light	Moderate	Abundant

Table 2. Scores used in the semiquantitative evaluation of histopathologic changes in the lungs of harp seals experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus* and in control seals.

Histopathological lesions	Scores				
	0	1	2	3	4
Pleuritis					
Interstitial inflammation	Absent	Focal	Multifocal	Extensive	-
Granulomatous inflammation					
Presence of mucus in the airways					
Bronchitis					
Bronchitis	0% ^a	1 – 25%	25 – 50%	> 50%	-
Bronchiolitis					
Bronchial glandular hyperplasia					
Alveolar atelectasia					
Alveolar atelectasia	0% ^b	1 – 10%	10 – 30%	30 – 50%	>50%
Alveolitis					
Alveolitis	0% ^a	1 – 25%	25 – 50%	50 – 75%	> 75%

^a Percentage of the examined structure (bronchi, bronchioles or alveoli) with histopathological lesions.

^b Surface area in percent with atelectasia.

Table 3. Differential counts expressed as percent (%) of neutrophils, macrophages and lymphocytes from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid obtained from seals exposed to *Otostrongylus circumlitus* larvae (n = 7) and control seals (n = 7).

Leukocytes	Number of days post-exposure	Exposed seals		Control seals		P values
		(mean ± SD) ^a [min - max]		(mean ± SD) [min - max]		
Macrophages	0	30.9 ± 24.6	6 – 63	35.6 ± 24.5	17 – 71	0.95
	20	22.1 ± 11.0	5 – 33	44.3 ± 37.6	1 – 80	0.16
	34	22.8 ± 20.6	5 – 63	30.9 ± 18.1	8 – 57	0.59
	53	45.0 ± 40.4	6 – 100	44.8 ± 30.2	6 – 89	0.99
Neutrophils	0	66.3 ± 25.3	35 – 94	62.0 ± 27.2	2 – 81	0.93
	20	67.8 ± 17.8	40 – 84	52.1 ± 35.7	16 – 92	0.31
	34	52.8 ± 29.7	5 – 82	61.3 ± 17.6	37 – 88	0.59
	53	39.3 ± 40.2	0 – 87	53.3 ± 31.0	11 – 94	0.38
Lymphocytes	0	2.7 ± 3.0	0 – 7	2.1 ± 3.1	0 – 8	0.73
	20	0.6 ± 1.1	0 – 3	3.25 ± 3.1	0 – 8	<0.01 ^b
	34	5.4 ± 4.1	1 – 13	7.6 ± 7.7	0 – 23	0.45
	53	2.4 ± 3.2	0 – 8	2.0 ± 2.9	0 – 8	0.94

^a Percentages

^b Significant difference between control and exposed seals.

Table 4. Differential counts expressed as percent (%) of eosinophils from bronchoalveolar lavage (BAL) fluid obtained from seals exposed to *Otostrongylus circumlitus* larvae (n = 7) and control seals (n = 7).

Seal ID	Exposure group	Percent (%) of eosinophils			
		Pre-exposure	Day 20	Day 34	Day 53
1	Control	0	1	0	0
2	Control	n/a ^a	n/a	0	0
3	Control	0	1	1	0
4	Control	0	0	0	0
5	Control	n/a	0	0	0
6	Control	0	n/a	0	0
7	Control	1	n/a	1	0
8	Exposed	0	0	7	0
9	Exposed	0	0	0	0
10 ^b	Exposed	0	11	7	0
11 ^b	Exposed	n/a	37	89	7
12 ^b	Exposed	1	n/a	7	10
13	Exposed	0	0	19	72
14	Exposed	0	n/a	6	5

^a n/a: No data available for that sampling time.

^b First-stage larvae detected in feces of these seals.

Table 5. Intensity of different histopathological pulmonary lesions (sum of the pulmonary histopathological scores) observed in seals exposed to *Otostrongylus circumlitus* larvae (n = 7) and control seals (n = 7).

Histopathologic lesions ^a	Control		Exposed		P values
	Median	[min - max]	Median	[min - max]	
Pleuritis	0	0 – 0	0	0 – 2	0.09
Interstitial inflammation	0	0 – 2	6	3 – 16	0.001 ^b
Presence of mucus in the airways	0	0 – 1	1	0 – 8	0.07
Bronchitis	0	0 – 0	1	0 – 11	0.02 ^b
Bronchial glandular hyperplasia	0	0 – 1	0	0 – 5	0.23
Bronchiolitis	0	0 – 1	1	0 – 6	0.04 ^b
Alveolar atelectasia	0	0 – 0	0	0 – 2	0.09
Alveolitis	7	4 – 15	12	7 – 24	0.03 ^b
Granulomatous inflammation	0	0 – 0	0	0 – 5	0.04 ^b

^a Cumulative score (sum) of the histopathological scores for each of the section examined.

^b Significant difference between control and exposed seals.

Table 6. Predominant inflammatory cells in *antemortem* bronchoalveolar lavage (*antemortem* BAL) fluid (53 dpe) and histopathological examination (histopathology) of exposed and control seal lung tissue sections.

		<i>Antemortem</i> BAL			
Predominant inflammatory cell		Macrophage	Neutrophil	Eosinophil	Total
Histopathology	Macrophage	7	5	1	13
	Neutrophil	0	0	0	0
	Eosinophil	0	1	0	1
	Total	7	6	1	14

FIGURES

Figure 1

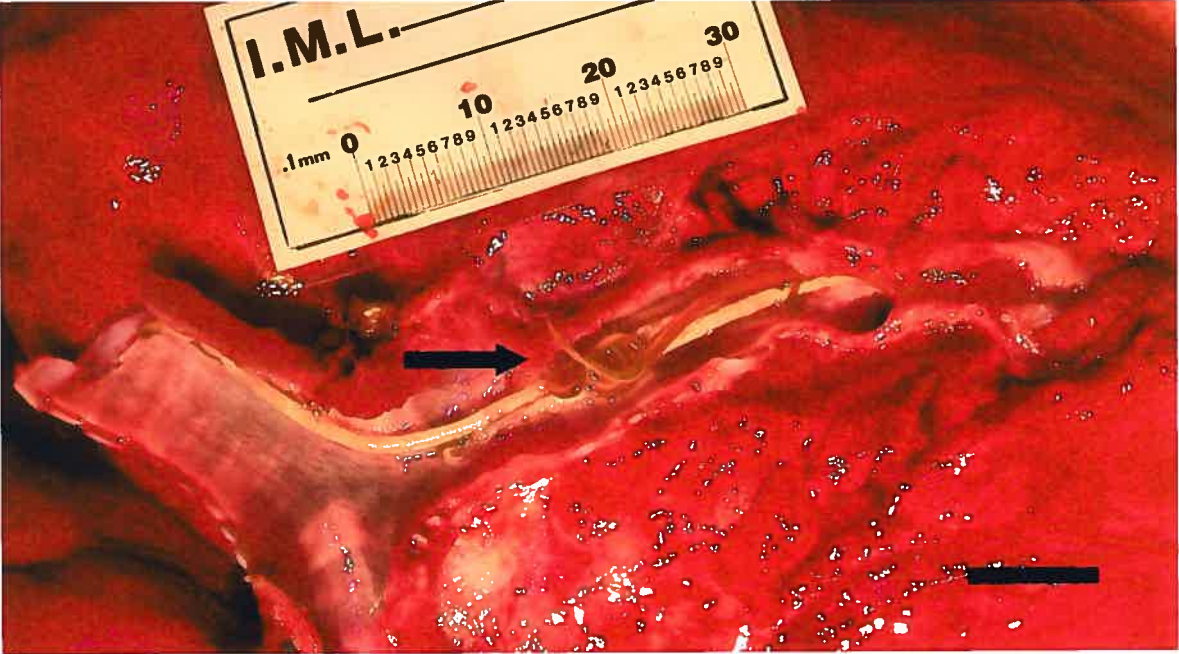


Figure 2

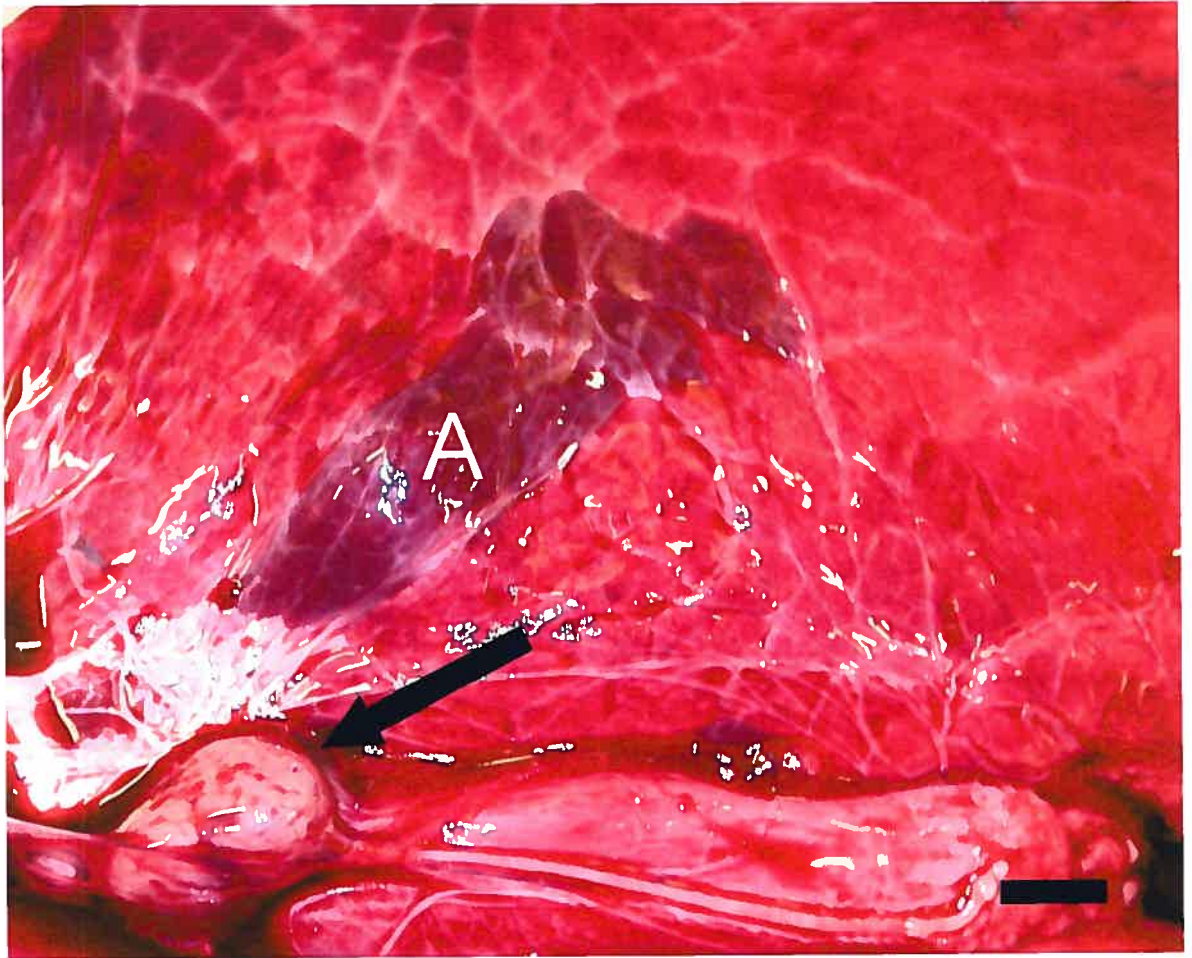


Figure 3

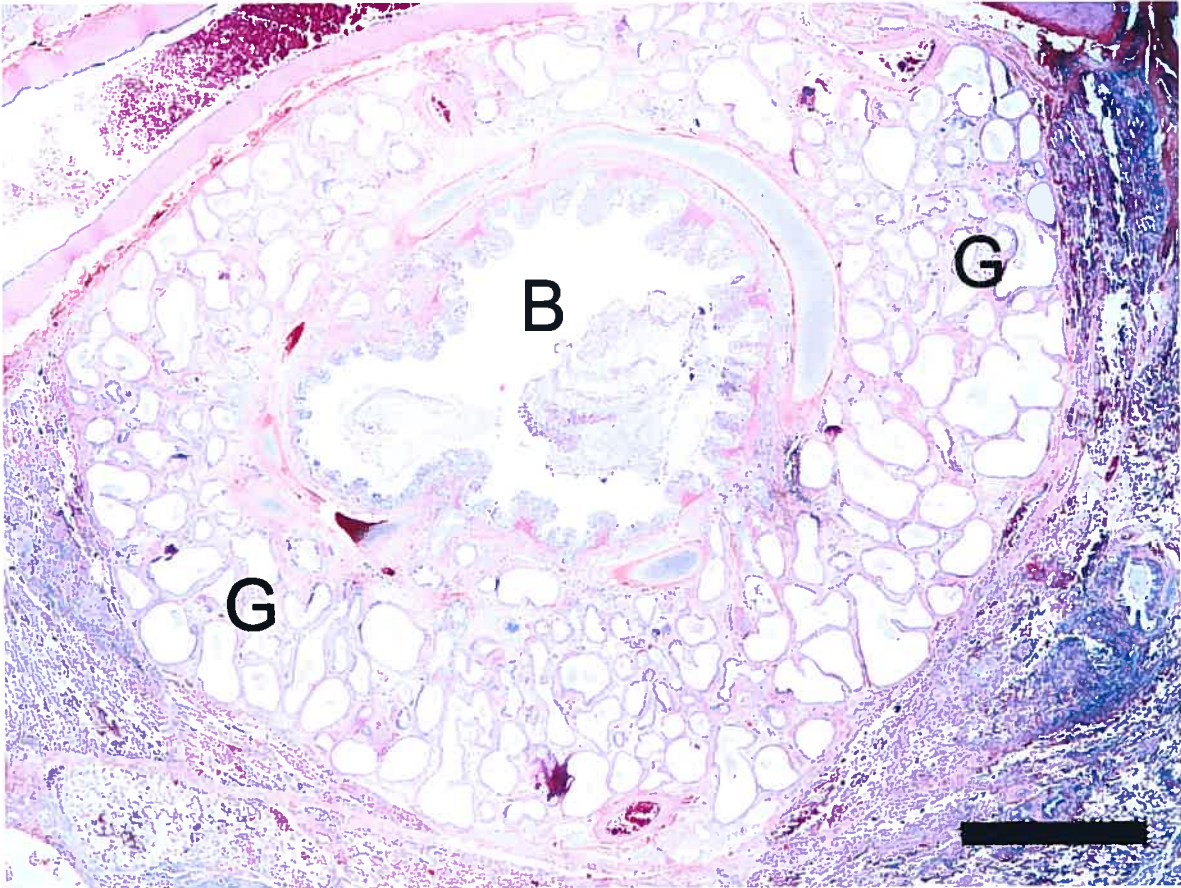
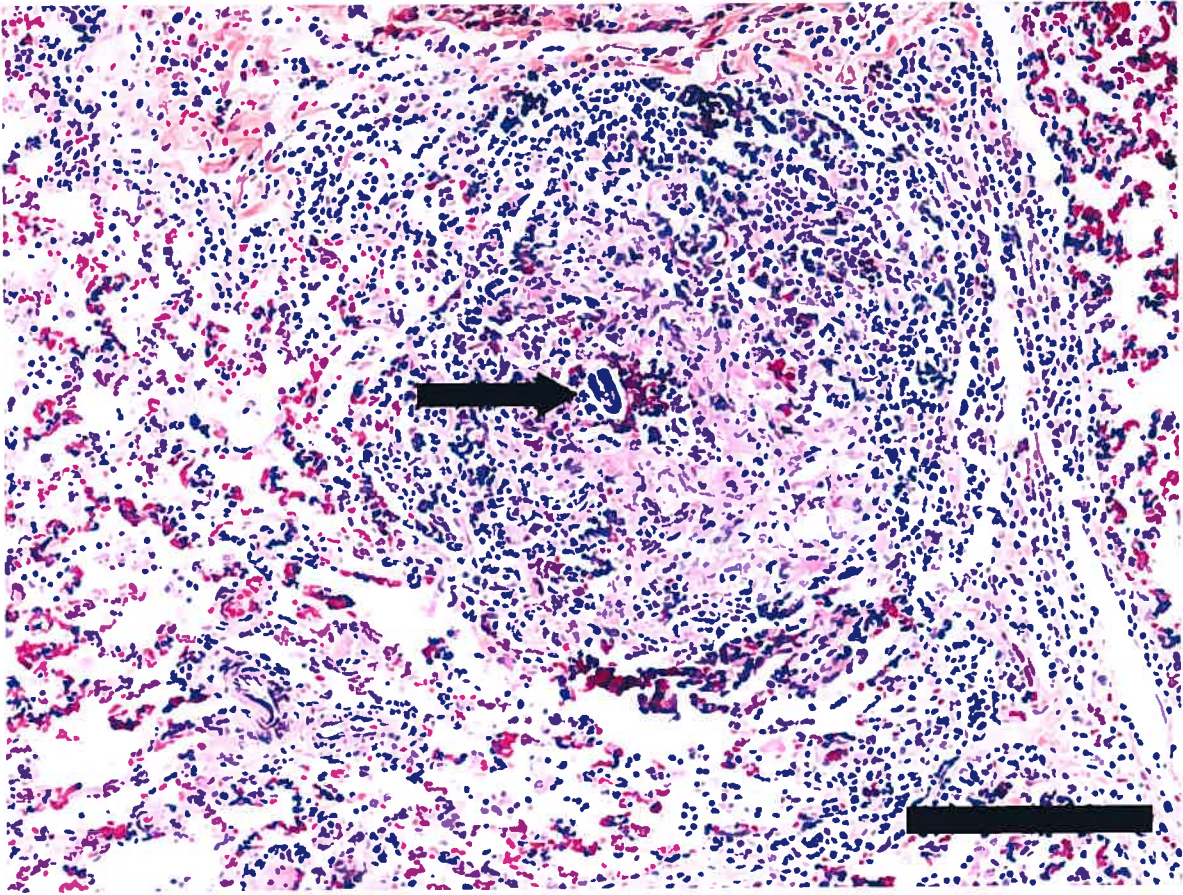


Figure 4



CAPTIONS FOR ILLUSTRATIONS

Figure 1. Ventral aspect of the lung from a harp seal (#12) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*. Adult nematodes (arrow) are visible in the right primary bronchus. Bar = 1 cm.

Figure 2. Ventral aspect of the lung from a harp seal (#11) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*. Note well demarcated area of alveolar collapse (A) with enlarged tracheobronchial lymph node (arrow). Bar = 1 cm.

Figure 3. Histologic section of lung from a harp seal (#11) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*. Note the extensive hyperplasia of the bronchial glands (G). The lumen of the bronchus (B) contains a large amount of mucus infiltrated by numerous neutrophils and eosinophils. HPS stain. Bar = 1 mm.

Figure 4. Histologic section of lung from a harp seal (#11) experimentally infected with *Otostrongylus circumlitus*. Note granulomatous inflammatory reaction surrounding a larval *O. circumlitus* (arrow). HPS stain. Bar = 200 μ m.

LITERATURE CITED

- BAKER, J. R. 1989. Natural causes of death in non-suckling grey seals (*Halichoerus grypus*). *The Veterinary Record* 125: 500-503.
- BAKER, R., AND J. H. LUMSDEN. 2000. The respiratory tract- nasal, bronchial and tracheal wash and lung. *In Color atlas of cytology of the dog and cat*, R. BAKER, AND J. H. LUMSDEN, (eds.). Mosby, St-Louis, Missouri, USA. pp. 131-157.
- BERGERON, E., L. N. MEASURES, AND J. HUOT. 1997a. Experimental transmission of *Otostrongylus circumlitus* (Raillet, 1899) (Metastrongyloidea: Crenosomatidae), a lungworm of seals in eastern Arctic Canada. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1364-1371.
- BERGERON, E., L. N. MEASURES, AND J. HUOT. 1997b. Lungworm (*Otostrongylus circumlitus*) infections in ringed seals (*Phoca hispida*) from eastern Arctic Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 2443-2448.
- BERRAG, B., A. RHALEM, H. SAHIBI, P. DORCHIES, AND J. CABARET. 1997. Bronchoalveolar cellular responses of goats following infections with *Muellerius capillaries* (Protostrongylidae, Nematoda). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58: 77-88.
- BOURQUE, A., H. WHITNEY, AND G. CONBOY. 2005. *Angiostrongylus vasorum* infection in a coyote (*Canis latrans*) from Newfoundland and Labrador, Canada. *Journal Wildlife Diseases* 41: 816-819.
- BURKHARD, M. J., A. VALENCIANO, AND A. BARGER. 2001. Respiratory tract. *In Atlas of canine and feline cytology*, R. E. RASKIN, AND D. J. MEYER, (eds.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 135-185.
- COWELL, R. L., R. D. TYLER, C. J. BALDWIN, AND J. H. MEINKOTH. 1998. Transtracheal/bronchoalveolar washes. *In Diagnostic cytology and hematology of*

- the dog and cat, R. L. COWELL, R. D. TYLER, AND J. H. MEINKOTH, (eds.). Mosby, St-Louis, Missouri, USA. pp. 159-173.
- CULLOUGH, S. M., AND J. BRINSON. 1999. Collection and interpretation of respiratory cytology. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 14: 220-226.
- DAILEY, M. D. 2006. Restoration of *Parafilaroides* (Dougherty, 1946) (Nematoda: Metastrongyloidea) with description of two new species from pinnipeds of eastern central Pacific. *Journal of Parasitology* 92: 589-594.
- DAWSON, S., R. W. ELSE, S. M. RHIND, AND D. D. COLLIE. 2005. Diagnostic value of cytology of bronchoalveolar fluid for lung diseases of sheep. *The Veterinary Record* 157: 433-436.
- DUNGWORTH, D. L. 1993. The respiratory system. *In Pathology of domestic animals*, K. V. F. JUBB, P. C. KENNEDY, AND N. PALMER, (eds.). Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 539-687.
- ELSON-RIGGINS, J. G., S. A. RIGGINS, F. M. D. GULLAND, AND E. G. PLATZER. 2004. Immunoglobulin responses of Northern elephant seal and Pacific harbor seals naturally infected with *Otostrongylus circumlitus*. *Journal of Wildlife Diseases* 40: 466-475.
- FLEISCHMAN, R. W., AND R. A. SQUIRE. 1970. Verminous pneumonia in the California sea lion (*Zalophus californianus*). *Pathologia Veterinaria* 7: 89-101.
- FOGARTY, U. 1990. Evaluation of a bronchoalveolar lavage technique. *Equine Veterinary Journal* 22: 174-176.
- FORRESTER, S. G., AND M. W. LANKESTER. 1997. Extracting protostrongylid nematode larvae from ungulate feces. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 511-516.
- FOSTER, S. F., P. MARTIN, J. A. BRADDOCK, AND R. MALIK. 2004. A retrospective analysis of feline bronchoalveolar lavage cytology and microbiology. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6: 189-198.

- GOSSELIN, J.-F., AND L. N. MEASURES. 1997. Redescription of *Filaroides* (*Parafilaroides*) *gymnurus* (Railliet, 1899) (Nematoda: Metastrongyloidea), with comments on other species in pinnipeds. *Canadian Journal of Zoology* 75: 359-370.
- GOSSELIN, J.-F., L. N. MEASURES, AND J. HUOT. 1998. Lungworm (Nematoda: Metastrongyloidea) infections in Canadian phocids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 825-834.
- GULLAND, F. M., M. HAULENA, AND L. A. DIERAUF. 2001. Seals and sea lions. In *CRC Handbook of marine mammal medicine*, L. A. DIERAUF, AND F. M. GULLAND, (eds.). CRC Press, New York, New York, USA. pp. 907-926.
- GULLAND, F. M. D., K. BECKMEN, K. BUREK, L. LOWENSTINE, L. WERNER, T. SPRAKER, M. DAILEY, AND E. HARRIS. 1997. Nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infestation of Northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) stranded along the central California coast. *Marine Mammal Science* 13: 446-459.
- HAWKINS, E. C., D. B. DENICOLA, AND N. F. KUEHN. 1990. Bronchoalveolar lavage evaluation of pulmonary disease in the dog and cat: state of the art. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4: 267-274.
- HOWARD, E. B. 1983. *CRC Pathobiology of marine mammals diseases*. CRC Press, Boca raton, Florida, USA, 238 pp.
- JOLIE, R., L. OLSON, AND L. BÄCKSTRÖM. 2000. Bronchoalveolar lavage cytology and hematology: a comparison between high and low health status pigs at three different ages. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12: 438-443.
- KELLY, T. R., D. GREIG, K. M. COLEGROVE, L. J. LOWENSTINE, M. DAILEY, F. M. GULLAND, AND M. HAULENA. 2005. Metastrongyloid nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infection in a stranded California sea lion (*Zalophus californianus*)- a new host-parasite association. *Journal of Wildlife Diseases* 41: 593-598.
- KING, L. G. 2004. *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*. Saunders, St-Louis, Missouri, USA, 665 pp.

- LAVIGNE, D. M., AND K. M. KOVACS. 1988. Harps & hoods: Ice-breeding seals of the Northwest Atlantic University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, 174 pp.
- LOPEZ, A. 2006. Respiratory system. *In* Pathologic basis of veterinary disease, M. D. MCGAVIN, AND J. F. ZACHARY, (eds.). Mosby, St-Louis, Missouri, USA. pp. 463-558.
- LUCAS, Z., P.-Y. DAOUST, G. CONBOY, AND M. BRIMACOMBE. 2003. Health status of harp seals (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*) on Sable Island, Nova Scotia, Canada, concurrent with their expanding range. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 16-28.
- LUNA, L. G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company, New York, New York, USA, 258 pp.
- MAIR, T. S., C. R. STOKES, AND F. J. BOURNE. 1987. Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. *Equine Veterinary Journal* 19: 458-462.
- MCCAULEY, M., R. B. ATWELL, R. H. SUTTON, AND J. S. LUMSDEN. 1998. Unguided bronchoalveolar lavage techniques and residual effects in dogs. *Australian Veterinary Journal* 76: 1998.
- MEASURES, L. N. 2001. Lungworms of marine mammals. *In* Parasitic diseases of wild mammals, W. M. SAMUEL, M. J. PYBUS, AND A. A. KOCAN, (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 279-300.
- MEASURES, L. N., AND J.-F. GOSSELIN. 1994. Helminth parasites of ringed seal, *Phoca hispida* from northern Quebec, Canada. *Journal Helminthological Society Washington* 61: 240-244.
- NORRIS, C. R., S. M. GRIFFEY, V. F. SAMII, M. M. CHRISTOPHER, AND M. S. MELLEMA. 2002. Thoracic radiography, bronchoalveolar lavage cytopathology, and pulmonary parenchymal histopathology: a comparison of diagnostic results in 11 cats. *Journal of the Animal Hospital Association* 38: 337-345.

- ONDERKA, D. K. 1989. Prevalence and pathology of nematode infections in the lungs of ringed seals (*Phoca hispida*) of the western Arctic of Canada. *Journal of Wildlife Diseases* 25: 218-224.
- PANG, D. S., Y. RONDENAY, E. TRONCY, L. N. MEASURES, AND S. LAIR. 2006. Use of end-tidal partial pressure of carbon dioxide to predict arterial partial pressure of carbon dioxide in harp seals during isoflurane-induced anesthesia. *American Journal of Veterinary Research* 67: 1131-1135.
- SMITH, H. G. 1978. Parasites of red foxes in New Brunswick and Nova Scotia. *Journal of Wildlife Diseases* 14: 366-370.
- SPRAGG, R. G., P. J. PONGANIS, J. J. MARSH, G. A. RAU, AND W. BERNHARD. 2004. Surfactant from diving aquatic mammals. *Journal of Applied Physiology* 96: 1626-1632.
- STOCKDALE, P. H. G., AND T. J. HULLAND. 1970. The pathogenesis, route of migration, and development of *Crenosoma vulpis* in the dog. *Pathologia Veterinaria* 7: 28-42.
- STROUD, R. K. 1978. Parasites and associated pathology observed in pinnipeds stranded along the Oregon coast. *Journal of Wildlife Diseases* 14: 292-298.
- SWEENEY, C. R., Y. ROSSIER, E. L. ZIMMER, AND S. R. LINDBORG. 1994. Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *American Journal of Veterinary Research* 55: 1501-1504.
- SWEENEY, J. C. 1974. Common diseases of pinnipeds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 165: 805-814.
- VAN DER KAMP, J. S. 1987. Pulmonary diseases in seals- a histopathological review. *Aquatic Mammals* 13: 122-124.
- VERCRUYSSSE, J., A. SALOMEZ, A. ULLOA, M. ALVINERIE, A. OSTERHAUS, AND T. KUIKEN. 2003. Efficacy of ivermectin and moxidectin against *Otostrongylus*

circumlitus and *Parafilaroides gymnurus* in harbour seals (*Phoca vitulina*). The Veterinary Record 152: 130-134.

WILLIAMS, T. J. 2004. The eosinophil enigma. The Journal of Clinical Investigation 113: 507-509.

ZINKL, J. G. 2002. Lower respiratory tract. *In* Diagnostic cytology and hematology of the horse, R. L. COWELL, AND R. D. TYLER, (eds.). Mosby, St-Louis, Missouri, USA. pp. 73-86.

Chapitre troisième – Discussion générale des résultats

Une infection expérimentale a été réussie chez au moins trois des sept phoques du Groenland exposés aux larves de troisième stade d'*Otostrongylus circumlitus* provenant de plies canadiennes infectées par ce parasite. Nous sommes convaincus que la source de ces infections est l'administration gastrique des larves puisque les animaux expérimentaux ont été capturés à la fin de leur allaitement et durant leur période de sevrage naturel (Lavigne et Kovacs, 1988). La transmission verticale *in utero* ou par l'allaitement de ce nématode est improbable puisqu'aucune infection par *O. circumlitus* n'a été rapportée chez des phoques âgés de moins de 3.5 mois (Onderka, 1989). De plus, les poissons et les crustacés qui ont servis à alimenter les phoques au cours de l'expérience étaient congelés, ce qui devrait avoir détruit les larves qui auraient pu s'y retrouver (Measures, 2001).

Au cours du projet, nous avons procédé à 56 lavages bronchoalvéolaires (LBA) sous anesthésie sans aucune complication ni aucune mortalité. Cet examen diagnostique peut donc être réalisé de façon sécuritaire en utilisant la technique décrite dans cette étude chez des phoques sains ou démontrant des changements pulmonaires d'intensité faible à modérée. L'utilisation d'un bronchoscope aurait probablement augmenté la qualité et le potentiel diagnostique des échantillons en permettant de sélectionner une région des voies respiratoires démontrant des lésions macroscopiques pour y faire le lavage (McCauley et al., 1998). De plus, le bronchoscope facilite un ajustement serré entre l'extrémité du cathéter et la voie respiratoire, ce qui a pour résultat d'accroître le pourcentage de recouvrement du liquide et permettre la standardisation de la technique (McCauley et al., 1998; Foster et al., 2004). Toutefois, lorsqu'un bronchoscope n'est pas disponible ou que le clinicien ne possède pas l'expertise pour l'utiliser, une technique de LBA à l'aveugle peut être réalisée avec de bons résultats.

Pour la réalisation des LBA, nous avons opté pour l'injection d'une faible quantité de saline stérile en une seule aliquote afin d'accroître l'innocuité du lavage et de réduire la durée de la procédure. Cependant, *a posteriori*, l'injection d'une quantité plus importante de saline aurait probablement permis de récupérer une plus grande quantité de liquide et de cellules et ainsi augmenter la qualité des échantillons. Des études chez l'espèce canine

rapportent que trois aliquotes de saline totalisant 5 ml/kg peuvent être utilisées de façon sécuritaire pour obtenir un LBA de bonne qualité (Burkhard et al., 2001). Donc, en se basant sur ces recommandations, la quantité totale de saline qui aurait pu être administrée de façon sécuritaire à nos phoques aurait été de 140 ± 24 ml (moyenne \pm écart-type) puisque les phoques pesaient en moyenne 28.0 ± 4.7 kg (moyenne \pm écart-type) au cours de l'expérience. L'injection de 40 à 55 ml si le lavage était répété à trois reprises ou de 30 ml s'il l'était à cinq reprises aurait permis d'obtenir un lavage de bonne qualité. L'injection de cinq aliquotes de 30 ml chacun correspond au protocole de lavage qui a été utilisé chez trois espèces de pinnipèdes (Spragg et al., 2004).

Approximativement, la moitié de la saline injectée a été récupérée ($56.6 \pm 18.2\%$, moyenne \pm écart type). Ce résultat est comparable aux taux de récupération rapportés chez les petits animaux qui est de 50 à 90% (Cullough et Brinson, 1999) et chez trois espèces de pinnipèdes qui est de $76 \pm 6\%$ (Spragg et al., 2004). Des lésions pulmonaires sévères pourraient limiter le retour du fluide injecté (Hawkins et al., 1990). L'absence de différence significative pour le pourcentage de recouvrement du liquide de LBA entre nos phoques exposés et témoins n'est pas inattendue et est probablement imputable aux faibles lésions pathologiques observées lors de la nécropsie. L'analyse statistique de la densité du liquide de lavage a mis en évidence une différence significative entre les deux groupes. Cependant, il est impossible de détecter des variations aussi minces de ce paramètre à l'aide d'un réfractomètre portatif tel qu'utilisé dans notre étude.

Des différences statistiques ont été révélées pour les indices moyens d'abondance de cellules inflammatoires et non inflammatoires entre les jours d'échantillonnage pour un même groupe et entre les groupes lors d'un même échantillonnage. Plusieurs facteurs comme la technique, la quantité de liquide utilisée pour préparer les frottis ainsi que la présence de mucus et l'adhérence des cellules à ce dernier peuvent entraîner une variation considérable du comptage cellulaire (Jolie et al., 2000). Par conséquent, les différences entre les indices moyens d'abondance de cellules inflammatoires et non inflammatoires

observées dans notre étude peuvent être expliquées, du moins en partie, par l'amélioration de la technique de lavage et de préparation des frottis avec le temps.

Dans notre étude, les pourcentages de neutrophiles et de macrophages n'étaient pas différents entre les phoques du groupe exposé et ceux du groupe témoin. Ceci implique que l'exposition au parasite n'entraîne pas de variation de ces deux types de leucocytes dans le liquide de LBA ou que le nombre de phoques exposés ayant développé une pneumonie vermineuse est faible. De plus, il n'y a pas de différence significative dans les pourcentages de neutrophiles et de macrophages en fonction du jour d'échantillonnage tous les groupes confondus. Basé sur ces résultats, la répétition des LBA à intervalle de deux à trois semaines n'influence pas significativement les pourcentages de ces deux leucocytes qui étaient les deux types de cellules inflammatoires les plus abondants dans le liquide de LBA. Plusieurs études ont démontré l'absence d'altération de la composition cellulaire du liquide de LBA chez les chiens (King, 2004) et les chevaux (Sweeney et al., 1994) lorsque ceux-ci étaient répétés respectivement à intervalle de 48 heures et deux semaines. Toutefois, une infiltration locale neutrophilique a cependant été observée chez les chevaux et elle persiste 48 heures après le LBA (Sweeney et al., 1994). Aucune différence dans le différentiel leucocytaire du liquide de LBA n'a été constatée en fonction de l'âge croissant des animaux. Cette observation diverge des résultats des LBA effectués chez des jeunes porcelets où une augmentation du pourcentage de neutrophiles en fonction de l'âge a été démontrée chez les animaux du groupe témoin (Jolie et al., 2000).

Les pourcentages de neutrophiles obtenus chez les animaux témoins dans notre étude sont beaucoup plus élevés et aussi plus variables que les valeurs de référence rapportées chez différentes espèces d'animaux domestiques incluant le chien, le chat (Cowell et al., 1998; Baker et Lumsden, 2000; Burkhard et al., 2001) et le cheval (Fogarty, 1990; Zinkl, 2002). Les pourcentages de neutrophiles dans le liquide de LBA de chiens et de chats sains sont généralement inférieurs à 5% (Burkhard et al., 2001). Chez l'espèce équine, la présence de plus de 10 à 12% de neutrophiles dans le liquide de LBA suggère une infiltration neutrophilique des voies respiratoires inférieures (Fogarty,

1990). À notre connaissance, une seule étude rapporte les valeurs de référence du différentiel leucocytaire dans le liquide de LBA chez des pinnipèdes (Spragg et al., 2004). Les pourcentages de neutrophiles obtenus chez trois otaries de Californie, cinq éléphants de mer du nord et un phoque commun étaient respectivement de $0.4 \pm 0.4\%$ (moyenne \pm écart-type); $7.0 \pm 2.6\%$ et 4% (Spragg et al., 2004). Les pourcentages de macrophages chez ces trois espèces de pinnipèdes étaient respectivement de $98.6 \pm 1.0\%$ (moyenne \pm écart-type); $90.7 \pm 2.7\%$ et 95% (Spragg et al., 2004). L'obtention d'un pourcentage beaucoup plus élevé et variable de neutrophiles dans notre étude est liée, du moins en partie, à la technique de lavage puisque le segment de voies respiratoires échantillonnées par la technique de LBA à l'aveugle n'est pas constant d'un échantillon à l'autre. Il est reconnu que les voies respiratoires plus proximales comme la trachée peuvent contenir un pourcentage plus important de neutrophiles comparativement aux voies respiratoires plus distales (Mair et al., 1987). Donc, nous soupçonnons que lors de nos LBA, la région trachéobronchique puisse avoir été échantillonnée étant donné qu'un nombre important de cellules pavimenteuses et ciliées ont été récoltées. De plus, l'administration d'une seule aliquote de saline peut aussi expliquer le pourcentage élevé de neutrophiles obtenu puisque la première aliquote de saline résulte souvent en un échantillonnage plus important des voies respiratoires supérieures et peut contenir un pourcentage plus élevé de neutrophiles (King, 2004). Dans une étude, le pourcentage de neutrophiles était de 25% pour la première aliquote et de 11% pour les aliquotes subséquentes (Hawkins et Berry, 1999). Les conditions de garde en captivité incluant la qualité de l'eau et de l'air pourraient aussi avoir un effet sur les pourcentages anormalement élevés de neutrophiles obtenus. Par exemple, l'exposition à des particules en suspension dans l'air peut entraîner une inflammation neutrophilique au niveau des voies respiratoires (Mair et al., 1987; Jolie et al., 2000). Une inflammation suppurative subclinique pulmonaire est plausible puisque des lésions d'alvéolites ont été détectées lors de l'histopathologie pulmonaire chez plusieurs phoques exposés aux larves

d'*O. circumlitus* et des phoques témoins. Les lésions d'alvéolite de faible grade pourraient être secondaires à une exposition à de faible niveau d'irritants environnementaux.

La plupart des animaux exposés aux larves d'*O. circumlitus* possède un pourcentage d'éosinophiles dans le liquide de LBA statistiquement supérieur aux animaux témoins au moins à une reprise après l'exposition aux larves infectantes. Par conséquent, l'exposition aux larves de nématode est associée avec un accroissement du pourcentage d'éosinophiles dans les voies respiratoires de ces animaux. Cette observation n'est pas inattendue puisque les infections parasitaires sont, de façon générale, associées à une infiltration éosinophilique au niveau du tissu parasité (Williams, 2004). Le différentiel leucocytaire du liquide de LBA est donc un outil diagnostique sensible pour détecter les infections à *O. circumlitus* chez le phoque du Groenland. Dans un contexte clinique, retrouver plus de 2% d'éosinophiles dans le liquide de LBA d'un phoque du Groenland pourrait suggérer la présence d'une infection parasitaire pulmonaire. Cependant, étant donné que des conditions non parasitaires telles que des réactions allergiques (hypersensibilité), des infections fongiques et plus rarement des pneumonies bactériennes (Burkhard et al., 2001) ont été également associées à une éosinophilie respiratoire, l'observation de ce changement n'est pas spécifique d'une infection parasitaire pulmonaire. Des pourcentages d'éosinophiles dans le liquide de LBA supérieurs à 7% ont été observés au moins à deux reprises après l'exposition larvaire chez les animaux (#11, #12 et #13) chez lesquels des larves de premier stade ont été récoltées dans les fèces. Un pourcentage élevé d'éosinophiles aux jours 20 et 34 postexposition, mais pas au jour 53 a été noté chez le phoque #10 qui a obtenu un résultat positif de Baermann, mais chez lequel aucun parasite adulte n'a été détecté à la nécropsie. Des pourcentages d'éosinophiles ont été aussi observés chez trois autres phoques exposés (#8, #13 et #14) comparativement aux animaux témoins, malgré qu'aucun parasite ou larve n'ait été retrouvé à la nécropsie de ces trois phoques. Nous soupçonnons que ces quatre phoques aient acquis une infection transitoire de courte durée à *O. circumlitus* et qu'ils s'en soient débarrassés avant la fin du projet. Les raisons permettant d'expliquer l'obtention d'un résultat négatif au Baermann chez trois de ces phoques incluent

l'expulsion ou la mort des parasites adultes avant la fin de la période de pré-patence, une infection transitoire par un seul nématode ou par plusieurs nématodes du même sexe, une excrétion intermittente ou d'un faible nombre de larves dans les fèces empêchant leur détection par la méthode employée. La technique de Baermann (et ses versions modifiées) est fréquemment utilisée pour détecter des larves de metastrongyloïdes dans les fèces d'animaux terrestres. Cette méthode possède des limitations qui sont principalement liées à une faible excrétion de larves (Forrester et Lankester, 1997) comme dans notre expérience. De plus, le prélèvement de matières fécales de mammifères aquatiques est problématique puisque l'échantillonnage rectal permet généralement d'obtenir une faible quantité de selles.

En ce qui concerne le dernier phoque (#9) exposé à *O. circumlitus*, le pourcentage d'éosinophiles dans le liquide de LBA a toujours été de 0% avant et même après l'exposition parasitaire. Il est très intéressant de mentionner qu'une régurgitation a été décelée chez cet animal ainsi que chez le phoque #14 immédiatement après l'administration orogastrique des larves de troisième stade et suivi par l'administration de 5 ml de saline pour rincer le tube. L'expulsion possible d'une petite quantité de larves administrées pourrait être responsable de l'absence ou la faible infection parasitaire chez ces deux phoques.

Les lésions macroscopiques et histopathologiques observées chez les phoques avec une infection active à *O. circumlitus* sont similaires à celles décrites dans les infections naturelles chez les phoques annelés (Onderka, 1989) et à d'autres pneumonies vermineuses chez les animaux domestiques (Stockdale et Hulland, 1970; Dungworth, 1993) et les canidés sauvages (Smith, 1978; Bourque et al., 2005). Les lésions les plus frappantes correspondent à une bronchite ou bronchiolite oblitérante focalement extensive généralement associée à une hyperplasie et une dilatation des glandes bronchiques (Onderka, 1989) vraisemblablement induites par la présence des nématodes adultes dans les bronches (Dungworth, 1993). L'oblitération des voies respiratoires causée par l'hypersécrétion de mucus entraîne le développement d'une atélectasie lobulaire

secondaire à une ventilation inadéquate de cette région du parenchyme pulmonaire (Lopez, 2006). Une infiltration multifocale subaiguë du tissu pulmonaire interstitiel possiblement associée à une migration larvaire (Lopez, 2006) a été constatée chez les phoques exposés infectés par *O. circumlitus*. Des granulomes étaient présents uniquement chez les phoques possédant des nématodes adultes dans les voies respiratoires lors de la nécropsie. Des larves d'*O. circumlitus* ont été observées au centre des granulomes chez un seul de ces deux phoques (#11).

Il est intéressant de mentionner que les lésions observées chez nos phoques exposés étaient limitées aux voies respiratoires et au tissu pulmonaire interstitiel. Aucun parasite adulte, aucune larve, ni aucune lésion n'a été détecté au niveau du système cardiovasculaire. L'absence de lésion à ce niveau est compatible avec les observations effectuées chez les phoques annelés lors d'infection par *O. circumlitus*. Chez cette espèce de phoques, des larves immatures ne sont que rarement retrouvées dans les vaisseaux sanguins (2/39) (Onderka, 1989), ce qui diverge des observations chez les éléphants de mer du nord. En effet, chez cette espèce pinnipède, des nématodes adultes ou des lésions parasitaires sont retrouvés fréquemment dans le ventricule droit du cœur et/ou dans les artères pulmonaires (Gulland et al., 1997). Une mortalité importante suivant le développement d'une coagulation intravasculaire disséminée suggère la faible adaptation de cet hôte final pour le parasite (Gulland et al., 1997; Elson-Riggins et al., 2004).

La concordance s'est avérée faible entre les résultats des LBA *ante mortem* et l'examen histopathologique des sections pulmonaires en ce qui concerne le leucocyte qui prédomine. En effet, une association positive a été obtenue dans seulement la moitié des cas, ce qui est comparable aux observations réalisées dans différentes études (Larson et Bush, 1985; Norris et al., 2002). Les raisons permettant d'expliquer cette divergence (discordance dans 50% des cas) incluent que l'histopathologie permet d'échantillonner des régions focales de tissu pulmonaire et celles-ci ne sont pas nécessairement représentatives du processus en cours dans l'ensemble du poumon (Berrag et al., 1997; Norris et al., 2002). De plus, des régions distinctes sont échantillonnées par les deux méthodes

diagnostiques (Norris et al., 2002). Le LBA a l'avantage de permettre l'échantillonnage répété d'une surface plus étendue et multifocale au cours du processus pathologique (Norris et al., 2002). Il est aussi intéressant de mentionner que lors d'infection parasitaire pulmonaire focale, une augmentation du pourcentage d'éosinophiles peut se retrouver de façon diffuse dans les voies respiratoires du poumon et non pas seulement limitée dans les régions où des lésions macroscopiques et histopathologiques sont observées (Dawson et al., 2005). On peut donc dire que les lavages bronchoalvéolaires et les histopathologies pulmonaires sont des outils complémentaires dans le diagnostic des maladies pulmonaires quel qu'en soit l'origine (Norris et al., 2002), quoique le premier soit une technique *ante mortem* et le second une technique *post mortem*.

Conclusion

Des lavages bronchoalvéolaires à l'aveugle ont été réalisés à quatre reprises chez des phoques du Groenland sans aucune mortalité ni aucune complication. Cette méthode diagnostique peut donc être utilisée de façon sécuritaire chez cette espèce de pinnipèdes lorsqu'une évaluation pulmonaire *ante mortem* est nécessaire. L'examen du différentiel leucocytaire du liquide de LBA a permis de mettre en évidence des pourcentages élevés d'éosinophiles dans le liquide de LBA de tous les phoques après leur exposition aux larves de troisième stade d'*O. circumlitus*, à l'exception d'un seul animal. Cette observation suggère que le parasite a atteint les voies respiratoires chez six des sept phoques exposés. L'évidence d'une infection patente a été constatée chez seulement trois de ces six phoques et une infection de faible intensité a été observée 53 dpe chez seulement deux phoques exposés. Si on assume que les larves d'*O. circumlitus* administrées aux phoques avaient une capacité infectante similaire à celles associées aux infections naturelles, les résultats obtenus dans la présente étude suggèrent que le phoque du Groenland est susceptible à l'infection expérimentale par *O. circumlitus*. Les infections à *O. circumlitus* chez le phoque du Groenland semblent être transitoires (courte durée) et de faible intensité puisque peu de signes cliniques et peu de changements pathologiques ont été observés. La résistance relative de cette espèce de pinnipède aux infections vermineuses par *O. circumlitus* est soutenue par les observations sur le terrain chez les phoques du Groenland de l'âge moins d'un an (Gosselin et al., 1998; Measures, 2001; Lucas et al., 2003).

Bibliographie

- ANDERSON, R. C. 2000. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2nd edition. CABI Publisher, Wallingford, Oxfordshire, England, 650 pp.
- BAKER, J. R. 1989. Natural causes of death in non-suckling grey seals (*Halichoerus grypus*). The Veterinary Record 125: 500-503.
- BAKER, R., AND J. H. LUMSDEN. 2000. The respiratory tract- nasal, bronchial and tracheal wash and lung. In Color atlas of cytology of the dog and cat, R. BAKER, AND J. H. LUMSDEN, (eds.). Mosby, St-Louis, Missouri, USA. pp. 131-157.
- BECK, G. G., AND T. G. SMITH. 1995. Distribution of blubber in the Northwest Atlantic harp seal, *Phoca groenlandica*. Canadian Journal of Zoology 73: 1991-1998.
- BECK, G. G., T. G. SMITH, AND M. O. HAMMILL. 1993. Evaluation of body condition in the Northwest Atlantic harp seal (*Phoca groenlandica*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50: 1372-1381.
- BERGERON, E. 1996. Étude de la biologie d'*Otostrongylus circumlitus*, parasite des poumons des phoques annelés de l'Arctique est-canadien. Université Laval, Québec, 81 pp.
- BERGERON, E., L. N. MEASURES, AND J. HUOT. 1997a. Experimental transmission of *Otostrongylus circumlitus* (Raillet, 1899) (Metastrongyloidea: Crenosomatidae), a lungworm of seals in eastern Arctic Canada. Canadian Journal of Zoology 75: 1364-1371.
- BERGERON, E., L. N. MEASURES, AND J. HUOT. 1997b. Lungworm (*Otostrongylus circumlitus*) infections in ringed seals (*Phoca hispida*) from eastern Arctic Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54: 2443-2448.
- BERRAG, B., A. RHALEM, H. SAHIBI, P. DORCHIES, AND J. CABARET. 1997. Bronchoalveolar cellular responses of goats following infections with *Muellerius capillaries* (Protostrongylidae, Nematoda). Veterinary Immunology and Immunopathology 58: 77-88.

- BERTA, A., AND J. L. SUMICH. 1999. Marine mammals: Evolutionary biology. 1st edition. Academic Press, San Diego, California, USA, 494 pp.
- BOURQUE, A., H. WHITNEY, AND G. CONBOY. 2005. *Angiostrongylus vasorum* infection in a coyote (*Canis latrans*) from Newfoundland and Labrador, Canada. *Journal Wildlife Diseases* 41: 816-819.
- BOWMAN, D. D. 1995. Georgi's parasitology for veterinarians. 6th edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 430 pp.
- BURKHARD, M. J., A. VALENCIANO, AND A. BARGER. 2001. Respiratory tract. *In* Atlas of canine and feline cytology, R. E. RASKIN, AND D. J. MEYER, (eds.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 135-185.
- CHABOT, D., AND G. B. STENSON. 2000. Implantation date, growth rate and allometric relationships in foetal Northwest Atlantic harp seals (*Phoca groenlandica*). *Canadian Journal of Zoology* 78: 501-505.
- CLAUSSEN, D., V. STRAUSS, S. ISING, M. JAGER, T. SCHNIEDER, AND M. STOYE. 1991. The helminth fauna from the common seal (*Phoca vitulina vitulina*, Linne, 1758) of the Wadden Sea in Lower Saxony. Part 2: Nematodes. *Zentralbl Veterinarmed B* 38: 649-656.
- COWELL, R. L., R. D. TYLER, C. J. BALDWIN, AND J. H. MEINKOTH. 1998. Transtracheal/bronchoalveolar washes. *In* Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat, R. L. COWELL, R. D. TYLER, AND J. H. MEINKOTH, (eds.). Mosby, St-Louis, Missouri, USA. pp. 159-173.
- CULLOUGH, S. M., AND J. BRINSON. 1999. Collection and interpretation of respiratory cytology. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 14: 220-226.
- DAILEY, M. D. 2006. Restoration of *Parafilaroides* (Dougherty, 1946) (Nematoda: Metastrongyloidea) with description of two new species from pinnipeds of eastern central Pacific. *Journal of Parasitology* 92: 589-594.
- DAWSON, S., R. W. ELSE, S. M. RHIND, AND D. D. COLLIE. 2005. Diagnostic value of cytology of bronchoalveolar fluid for lung diseases of sheep. *The Veterinary Record* 157: 433-436.

- DE BRUYN, W. M. 1933. Contribution to the knowledge of *Strongylus circumlitus* RAILLET from the lungs of seals: the new genus *Otostrongylus*. Zoolischer Anzeiger 103: 142-153. [in German]. Canadian Translation of Fisheries and Aquatic Sciences No. 5583. 1993.
- DUNGWORTH, D. L. 1993. The respiratory system. In Pathology of domestic animals, K. V. F. JUBB, P. C. KENNEDY, AND N. PALMER, (eds.). Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 539-687.
- ELSON-RIGGINS, J. G., S. A. RIGGINS, F. M. D. GULLAND, AND E. G. PLATZER. 2004. Immunoglobulin responses of Northern elephant seal and Pacific harbor seals naturally infected with *Otostrongylus circumlitus*. Journal of Wildlife Diseases 40: 466-475.
- FLEISCHMAN, R. W., AND R. A. SQUIRE. 1970. Verminous pneumonia in the California sea lion (*Zalophus californianus*). Pathologia Veterinaria 7: 89-101.
- FOGARTY, U. 1990. Evaluation of a bronchoalveolar lavage technique. Equine Veterinary Journal 22: 174-176.
- FORRESTER, S. G., AND M. W. LANKESTER. 1997. Extracting protostrongylid nematode larvae from ungulate feces. Journal of Wildlife Diseases 33: 511-516.
- FOSTER, S. F., P. MARTIN, J. A. BRADDOCK, AND R. MALIK. 2004. A retrospective analysis of feline bronchoalveolar lavage cytology and microbiology. Journal of Feline Medicine and Surgery 6: 189-198.
- GAGE, L. J. 2003. Pinnipedia (seals, sea lions, walruses). In Zoo and wild animal medicine, M. E. FOWLER, AND E. R. MILLER, (eds.). Saunders Company, St-Louis, Missouri, USA. pp. 459-475.
- GERACI, J. R., AND V. J. LOUNSBURY. 2002. Health. In Encyclopedia of marine mammals, W. F. PERRIN, B. WÜRSIG, AND J. G. M. THEWISSEN, (eds.). Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 562-569.
- GOSSELIN, J.-F., AND L. N. MEASURES. 1997. Redescription of *Filaroides* (*Parafilaroides*) *gymnurus* (Railliet, 1899) (Nematoda: Metastrongyloidea), with comments on other species in pinnipeds. Canadian Journal of Zoology 75: 359-370.

- GOSSELIN, J.-F., L. N. MEASURES, AND J. HUOT. 1998. Lungworm (Nematoda: Metastrongyloidea) infections in Canadian phocids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 825-834.
- GULLAND, F. M., M. HAULENA, AND L. A. DIERAUF. 2001. Seals and sea lions. *In* CRC Handbook of marine mammal medicine, L. A. DIERAUF, AND F. M. GULLAND, (eds.). CRC Press, New York, New York, USA. pp. 907-926.
- GULLAND, F. M. D., K. BECKMEN, K. BUREK, L. LOWENSTINE, L. WERNER, T. SPRAKER, M. DAILEY, AND E. HARRIS. 1997. Nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infestation of Northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) stranded along the central California coast. *Marine Mammal Science* 13: 446-459.
- HAMMILL, M. O., AND G. STENSON. 2005. Abundance of Northwest Atlantic Harp seals (1960-2005). *Canadian Science Advisory Secretariat* 2005/090. 34 pp.
- HAMMILL, M. O., AND G. B. STENSON. 2000. Estimated prey consumption by harp seals (*Phoca groenlandica*), grey seals (*Halichoerus grypus*), harbour seals (*Phoca vitulina*) and hooded seals (*Cystophora cristata*) in Atlantic Canada. *Journal Northwest Atlantic Fisheries Science* 26: 1-23.
- HAWKINS, E. C., AND C. R. BERRY. 1999. Use of a modified stomach tube for bronchoalveolar lavage in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 215: 1635-1639.
- HAWKINS, E. C., D. B. DENICOLA, AND N. F. KUEHN. 1990. Bronchoalveolar lavage evaluation of pulmonary disease in the dog and cat: state of the art. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4: 267-274.
- HAWKINS, E. C., D. B. DENICOLA, AND M. L. PLIER. 1995. Cytological analysis of bronchoalveolar lavage fluid in the diagnosis of spontaneous respiratory tract disease in dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 9: 386-392.
- HAWKINS, E. C., S. KENNEDY-STOSKOPF, J. LEVY, D. MEUTEN, L. CULLINS, D. DENICOLA, W. N. E. TOMPKINS, AND M. B. TOMPKINS. 1994. Cytologic characterization of bronchoalveolar lavage fluid collected through an endotracheal tube in cats. *American Journal of Veterinary Research* 55: 795-802.

- HAWKINS, E. C., F. I. TOWNSEND, G. A. LEWBART, M. A. STAMPER, V. G. THAYER, AND H. L. RHINEHART. 1997. Bronchoalveolar lavage in a dolphin. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211: 901-904.
- HOFFMAN, A. M., AND L. VIEL. 1997. Techniques for sampling the respiratory tract. *The Veterinary Clinics of North America Equine Practice* 13: 463-475.
- HOWARD, E. B. 1983. *CRC Pathobiology of marine mammals diseases*. CRC Press, Boca raton, Florida, USA, 238 pp.
- JOLIE, R., L. OLSON, AND L. BÄCKSTRÖM. 2000. Bronchoalveolar lavage cytology and hematology: a comparison between high and low health status pigs at three different ages. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12: 438-443.
- KELLY, T. R., D. GREIG, K. M. COLEGROVE, L. J. LOWENSTINE, M. DAILEY, F. M. GULLAND, AND M. HAULENA. 2005. Metastrongyloid nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infection in a stranded California sea lion (*Zalophus californianus*)- a new host-parasite association. *Journal of Wildlife Diseases* 41: 593-598.
- KING, J. E. 1983. *Seals of the world*. 2nd edition. Comstock Publishing Associates, New York, New York, USA, 240 pp.
- KING, L. G. 2004. *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*. Saunders, St-Louis, Missouri, USA, 665 pp.
- KOVACS, K. M., D. M. LAVIGNE, AND R. E. A. STEWART. 1985. Early post-natal mortality in Northwest Atlantic harp seals (*Phoca groenlandica*). *Journal of Mammalogy* 66: 556-558.
- LARSON, V. L., AND R. H. BUSH. 1985. Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. *American Journal of Veterinary Research* 46: 144-146.
- LAUCKNER, G. 1985. Diseases of mammalia: Pinnipedia. *In* *Diseases of marine animals*, O. KINNE, (ed.). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg. pp. 682-793.
- LAVIGNE, D. M., AND K. M. KOVACS. 1988. *Harp & hoods: Ice-breeding seals of the Northwest Atlantic* University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, 174 pp.

- LAWRENCE, J., J. D. BUCK, AND T. R. ROBECK. 2001. Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. *In* CRC handbook of marine mammal medicine, L. A. DIERAUF, AND F. M. GULLAND, (eds.). CRC Press, New York, New York, USA. pp. 309-328.
- LEATHERWOOD, S. 1992. Sierra club handbook of seals and sirenians. Sierra Club Books, San Francisco, California, USA, 376 pp.
- LÉCUYER, M., P.-G. DUBÉ, R. DIFRUSCIA, M. DESNOYERS, AND A. LAGACÉ. 1995. Bronchoalveolar lavage in normal cats. *Canadian Veterinary Journal* 36: 771-773.
- LOPEZ, A. 2006. Respiratory system. *In* Pathologic basis of veterinary disease, M. D. MCGAVIN, AND J. F. ZACHARY, (eds.). Mosby, St-Louis, Missouri, USA. pp. 463-558.
- LUCAS, Z., P.-Y. DAOUST, G. CONBOY, AND M. BRIMACOMBE. 2003. Health status of harp seals (*Phoca groenlandica*) and hooded seals (*Cystophora cristata*) on Sable Island, Nova Scotia, Canada, concurrent with their expanding range. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 16-28.
- LUNA, L. G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company, New York, New York, USA, 258 pp.
- LYDERSEN, C., AND K. M. KOVACS. 1996. Energetics of lactation in harp seals (*Phoca groenlandica*) from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Journal of Comparative Physiology B* 166: 295-304.
- MAIR, T. S., C. R. STOKES, AND F. J. BOURNE. 1987. Cellular content of secretions obtained by lavage from different levels of the equine respiratory tract. *Equine Veterinary Journal* 19: 458-462.
- MCCAULEY, M., R. B. ATWELL, R. H. SUTTON, AND J. S. LUMSDEN. 1998. Unguided bronchoalveolar lavage techniques and residual effects in dogs. *Australian Veterinary Journal* 76: 1998.
- MCDONELL, W. 1972. Anesthesia of the harp seal. *Journal of Wildlife Diseases* 8: 287-295.

- MEASURES, L. N. 2001. Lungworms of marine mammals. *In* Parasitic diseases of wild mammals, W. M. SAMUEL, M. J. PYBUS, AND A. A. KOCAN, (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 279-300.
- MEASURES, L. N., AND J.-F. GOSSELIN. 1994. Helminth parasites of ringed seal, *Phoca hispida* from northern Quebec, Canada. *Journal Helminthological Society Washington* 61: 240-244.
- NORRIS, C. R., S. M. GRIFFEY, V. F. SAMII, M. M. CHRISTOPHER, AND M. S. MELLEMA. 2002. Thoracic radiography, bronchoalveolar lavage cytopathology, and pulmonary parenchymal histopathology: a comparison of diagnostic results in 11 cats. *Journal of the Animal Hospital Association* 38: 337-345.
- ONDERKA, D. K. 1989. Prevalence and pathology of nematode infections in the lungs of ringed seals (*Phoca hispida*) of the western Arctic of Canada. *Journal of Wildlife Diseases* 25: 218-224.
- PANG, D. S., Y. RONDENAY, E. TRONCY, L. N. MEASURES, AND S. LAIR. 2006. Use of end-tidal partial pressure of carbon dioxide to predict arterial partial pressure of carbon dioxide in harp seals during isoflurane-induced anesthesia. *American Journal of Veterinary Research* 67: 1131-1135.
- RAILLET, M. A. 1899. Sur quelques parasites rencontrés à l'autopsie d'un phoque (*Phoca vitulina L.*). *Compte Rendu de la Société de Biologie* 51: 128-130.
- RENOUF, D. 1990. The behaviour of pinnipeds. Chapman and Hall, London, England, 424 pp.
- SCHREER, J. F., AND K. M. KOVACS. 1997. Allometry of diving capacity in air-breathing vertebrates. *Canadian Journal of Zoology* 75: 339-358.
- SCHULZ, T. M., AND W. D. BOWEN. 2004. Pinniped lactation strategies: evaluation of data on maternal and offspring life-history traits. *Marine Mammal Science* 20: 86-114.
- SERGEANT, D. E. 1991. Harp seals, man and ice. *Canadian Special Publications of Fisheries and Aquatic Sciences*, 114: 153 pp.

- SIMPSON, J. G., AND M. B. GARDNER. 1972. Comparative microscopic anatomy of selected marine mammals. *In* Mammals of the Sea: Biology and Medicine, S. H. RIDGWAY, (ed.). Thomas Books, Springfield, Illinois, USA. pp. 298-418.
- SKRJABIN, K. I. 1933. *Kutassicaulus* n.g., nouveau représentant des nématodes de la sous-famille des Dictyocaulinae. *Annales de Parasitologie* 11: 359-363.
- SMITH, H. G. 1978. Parasites of red foxes in New Brunswick and Nova Scotia. *Journal of Wildlife Diseases* 14: 366-370.
- SPRAGG, R. G., P. J. PONGANIS, J. J. MARSH, G. A. RAU, AND W. BERNHARD. 2004. Surfactant from diving aquatic mammals. *Journal of Applied Physiology* 96: 1626-1632.
- STENSON, G. B., M. O. HAMMILL, J. LAWSON, J.-F. GOSSELIN, AND T. HAUG. 2005. 2004 Pup production of harp seals, *Pagophilus groenlandicus*, in the northwest Atlantic. Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2005/037. 37 pp.
- STOCKDALE, P. H. G., AND T. J. HULLAND. 1970. The pathogenesis, route of migration, and development of *Crenosoma vulpis* in the dog. *Pathologia Veterinaria* 7: 28-42.
- STROUD, R. K. 1978. Parasites and associated pathology observed in pinnipeds stranded along the Oregon coast. *Journal of Wildlife Diseases* 14: 292-298.
- SWEENEY, C. R., Y. ROSSIER, E. L. ZIMMER, AND S. R. LINDBORG. 1994. Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *American Journal of Veterinary Research* 55: 1501-1504.
- SWEENEY, J. C. 1974. Common diseases of pinnipeds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 165: 805-814.
- SYLVESTRE, J. P. 1998. Guide des mammifères marins du Canada. Broquet Inc., Ottawa, Ontario, Canada, 330 pp.
- TIZARD, I. R. 2004. Acquired immunity to parasites. *In* *Veterinary Immunology*. An introduction. Saunders, St-Louis, Missouri, USA. pp. 293-307.

- VAN DER KAMP, J. S. 1987. Pulmonary diseases in seals- a histopathological review. *Aquatic Mammals* 13: 122-124.
- VERCRUYSSSE, J., A. SALOMEZ, A. ULLOA, M. ALVINERIE, A. OSTERHAUS, AND T. KUIKEN. 2003. Efficacy of ivermectin and moxidectin against *Otostrongylus circumlitus* and *Parafilaroides gymnurus* in harbour seals (*Phoca vitulina*). *The Veterinary Record* 152: 130-134.
- WILLIAMS, T. J. 2004. The eosinophil enigma. *The Journal of Clinical Investigation* 113: 507-509.
- WORTHY, G. A. J., AND D. M. LAVIGNE. 1983. Energetics of fasting and subsequent growth in weaned harp seal pups, *Phoca groenlandica*. *Canadian Journal of Zoology* 61: 447-456.
- ZINKL, J. G. 2002. Lower respiratory tract. *In* Diagnostic cytology and hematology of the horse, R. L. COWELL, AND R. D. TYLER, (eds.). Mosby, St-Louis, Missouri, USA. pp. 73-86.

Annexe I - Résultats des analyses coprologiques, cytologiques (LBA) et *post mortem* chez les phoques témoins et exposés aux larves infectieuses d'*Otostrongylus circumlitus*.

ID Phoque	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Groupe	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Témoin	Exposé	Exposé	Exposé	Exposé	Exposé	Exposé	Exposé
# Larves fèces	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0	0	> 32	5	3	0	0
Période pré-patente (dpe)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	42	38	45	n/a	n/a
Éosinophiles >1% dans LBA	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
# Parasites adultes à la nécropsie	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	4	4	Non	Non
Lésions pulmonaires macroscopiques	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Lymphadénopathie trachéobronchique	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Non	Non
Pleurésie	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Inflammation interstitielle	Oui	Non	Non	Oui	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Mucus – voies respiratoires	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Non
Bronchite	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non
Hyperplasie glandulaire	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Bronchiolite	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Non
Atélectasie	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non
Alvéolite	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Inflammation granulomateuse	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Caroline Piché		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Pathologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Caroline Piché, Lena Measures, Christian Bédard, Stéphane Lair	
Titre Bronchoalveolar lavage and pulmonary histopathology in harp seals (<i>Phoca groenlandica</i>) experimentally infected with <i>Otostrongylus circumlitus</i>	
Revue Journal of Wildlife Diseases	Date de publication Sera soumis en avril 2007

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Caroline Piché inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Évaluation des changements pathologiques pulmonaires induits par l'infection expérimentale de phoques du Groenland par le nématode pulmonaire <i>Otostrongylus circumlitus</i></i>		
Coauteur Lena Measures	[REDACTED]	Date 2007-03-21
Coauteur Christian Bédard	[REDACTED]	Date 2007-3-30
Coauteur Stéphane Lair	[REDACTED]	Date 2007-03-21
Coauteur	[REDACTED]	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

