



4 Diagnostic parasitaire chez les chats, les chiens et les chevaux

ESCCAP
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,
Worcestershire, WR14 3SZ, Royaume Uni

Première édition publiée par ESCCAP en novembre 2022

© ESCCAP 2022–2025

Tous droits réservés

Cette publication est mise à disposition sous réserve que toute redistribution ou reproduction d'une partie ou de la totalité du contenu sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit, électronique, mécanique, par photocopie, enregistrement ou autre, soit soumise à l'autorisation écrite préalable d'ESCCAP.

Cette publication ne peut être distribuée que sous la forme actuelle à moins d'obtenir l'accord écrit d'ESCCAP.

Une copie de cette publication est disponible à la Bibliothèque nationale britannique (British Library).

ISBN: 978-1-913757-81-6

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	6
Échantillonnage, envoi et stockage du matériel de diagnostic	7
Équipement standard d'un laboratoire de parasitologie	8
Milieus et solutions	10
1. EXAMENS FÉCAUX	10
1.1. Informations générales	10
1.2. Méthodes d'analyses coproscopiques	12
1.2.1. Sédimentation dans l'eau	12
1.2.2. Flottation avec centrifugation	13
1.2.3. Méthode combinée de sédimentation – flottation	14
1.2.4. Méthode modifiée de McMaster pour le comptage des œufs	15
1.2.5. Mini-FLOTAC	16
1.2.6. Méthode de double centrifugation pour la détection des œufs d' <i>Anoplocephala</i> dans les matières fécales de chevaux	17
1.2.7. Méthode de sédimentation formol-acide acétique-acétate de sodium	18
1.2.8. Méthode de Telemann-Rivas	19
1.2.9. Méthode de Baermann	19
1.2.10. Coproculture	20
1.2.11. Frottis fécal, coloration	20
1.2.12. Méthode de la cellophane adhésive	21
1.2.13. Kits commerciaux d'examen fécaux/tests InPouch™ TF Feline/tests de détection de coproantigènes	21

4

Diagnostic parasitaire chez les chats, les chiens et les chevaux

2. SEROLOGIE	23
2.1. Informations générales	23
2.2. Méthodes quantitatives pour la détection des anticorps	26
2.2.1. Test d'immunofluorescence indirecte (IFI)	26
2.2.2. Test d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA)	26
2.3. Méthodes qualitatives	27
2.3.1. Systèmes de test rapide	27
3. EXAMENS CUTANÉS	27
3.1. Informations générales	27
3.2. Peignage pour collecte de puces	27
3.3. Raclages cutanés	28
3.4. Méthode de la cellophane adhésive	29
3.5. Trichogramme	30
3.6. Détection d'acariens dans le cérumen	30
3.7. Techniques de biologie moléculaire	30

4. DIVERS	30
4.1. Frottis sanguins	30
4.1.1. Informations générales	30
4.1.2. Agents pathogènes détectables dans le frottis sanguin	31
4.2. Concentré leucocytaire	32
4.3. Ponction à l'aiguille fine	32
4.3.1. Informations générales	32
4.3.2. Agents pathogènes détectables dans les produits d'aspiration à l'aiguille fine	33
4.4. Détection et identification des microfilaires	33
4.4.1. Informations générales	33
4.4.2. Test de Knott	34
4.4.3. Test de Knott modifié	34
4.4.4. Méthode de filtration (Difil-Test®)	34
4.4.5. Coloration phosphatase acide	35
4.4.6. Taille des microfilaires	35
4.5. Détection et identification biomoléculaires : la polymérisation en chaîne (PCR) et l'amplification isotherme (LAMP)	36
4.5.1. Informations générales	36
4.5.2. Informations spécifiques	37
4.6. Détection des dermatophytes	40
4.6.1. Informations générales	40
4.6.2. Examen direct des poils	40
4.6.3. Examen à la lampe de Wood	40
4.6.4. Culture mycologique	40

ANNEXES

ANNEXE 1 – CONTEXTE	41
ANNEXE 2 – GLOSSAIRE, ABRÉVIATIONS ET LIENS UTILES	42

INTRODUCTION

Un diagnostic correct d'une infection ou d'une infestation et/ou d'une maladie est une condition préalable indispensable à un traitement approprié et à un contrôle efficace, et les maladies parasitaires ne font pas exception. Un diagnostic provisoire basé sur les signes cliniques, l'hématologie, la biochimie, la pathologie ou l'histopathologie peut être utile pour orienter le choix d'analyses diagnostiques spécifiques destinées à détecter les parasites de manière directe ou indirecte (ou une combinaison des deux).

L'élaboration de procédures standardisées et de bonnes pratiques de laboratoire est d'une importance fondamentale pour aider les vétérinaires praticiens. Qu'il s'agisse de confirmer un diagnostic d'infection/d'infestation chez des animaux de compagnie présentant des signes cliniques compatibles avec une maladie parasitaire, ou de dépister une infection/infestation dans le cadre d'un programme plus large de prévention et de contrôle, il est nécessaire de disposer de méthodes précises et fiables.

Détection directe

Les méthodes de laboratoire en parasitologie permettent fréquemment la détection directe des parasites par observation morphologique, ou la détection directe de molécules parasitaires telles que des antigènes ou de l'ADN parasitaire.

La détection directe de parasites est possible par :

- L'identification morphologique (macroscopique, microscopique, directe ou après concentration, après coloration ou marquage avec des anticorps spécifiques, après culture pour les champignons pathogènes par exemple)
- Diagnostic immunitaire par détection des antigènes parasitaires
- Détection par biologie moléculaire de l'ADN parasitaire
- Détection de macromolécules parasitaires par spectrométrie de masse
- Culture *in vitro* permettant la multiplication ou le développement des stades parasitaires

Les facteurs limitants incluent :

- Une distribution et excrétion irrégulières des parasites
- Mauvais(e) prélèvement, conservation ou transport
- Informations génétiques et protéomiques disponibles limitées
- Faible sensibilité ou spécificité dans certains cas

Mise en garde : la détection de l'ADN par biologie moléculaire ou d'antigènes peut occasionnellement conduire à des résultats faussement positifs, car ces molécules peuvent persister quelques temps après la disparition de l'infection.

Détection indirecte

Pour certaines infections ou infestations parasitaires, la détection directe n'est pas toujours possible. Cela peut être dû à la localisation des parasites dans l'organisme, à une densité très faible ne permettant pas une détection fiable par des méthodes directes, ou encore au fait que la méthode est trop techniquement contraignante ou invasive pour l'animal. Dans de tels cas, la détection indirecte, par la mise en évidence des réactions immunitaires orientées contre les parasites, peut être très utile. Les méthodes de détection indirecte consistent à détecter des anticorps spécifiques à partir de différents substrats.

Les facteurs limitants incluent :

- Des réactions immunitaires variables et retardées (selon le délai post-infection/post-infestation, l'intensité, la localisation et le type de réaction)
- La persistance et la réactivité croisée de certains anticorps
- Une faible sensibilité et spécificité dans certains cas

Les anticorps peuvent persister pendant des durées variables après la disparition de l'infection, ce qui peut limiter leur capacité à détecter des infections en cours.

Ce guide est destiné aux vétérinaires praticiens qui réalisent des procédures diagnostiques de routine dans leur pratique quotidienne pour la détection des infections/infestations parasitaires, ainsi qu'à ceux qui soumettent régulièrement des échantillons à des laboratoires de diagnostic extérieur.

Il est divisé en chapitres, selon le type de matériel analysé et les méthodes disponibles. Il comprend également des informations générales sur le prélèvement, la manipulation et la conservation des échantillons.

ÉCHANTILLONNAGE, ENVOI ET STOCKAGE DU MATÉRIEL DE DIAGNOSTIC

Généralités

La précision des tests diagnostiques dépend en grande partie d'un prélèvement, d'un stockage et d'une expédition corrects des échantillons. Chaque échantillon doit être étiqueté de manière appropriée (avec l'identification du patient et du propriétaire ainsi que la date du prélèvement), expédié dans des conteneurs hermétiques et incassables (étiquetés conformément à la législation nationale et internationale relative au transport de matières potentiellement infectieuses), transféré rapidement au laboratoire et accompagné de formulaires correctement remplis afin de permettre au personnel de ce dernier d'attribuer l'échantillon et d'effectuer le test demandé. Les échantillons de sang ou de sérum doivent être envoyés dans un tube en plastique étanche muni d'un bouchon à vis, dans un emballage réfrigérant, par courrier express. Le tube doit être placé dans un sac à fermeture zip ou un sac à échantillons au cas où il se fissurerait ou se casserait, emballé dans un matériau protecteur puis placé dans une boîte d'expédition solide.

De nombreux laboratoires fournissent des directives spécifiques concernant l'échantillonnage et l'expédition. Des précautions générales et spécifiques doivent être prises en compte. Les substances toxiques ou les matières infectieuses doivent être éliminées de manière appropriée.

Échantillonnage et stockage

1. Matières fécales

Les échantillons de matières fécales doivent être prélevés directement dans le rectum ou immédiatement après leur émission afin d'éviter toute contamination possible, notamment par des nématodes libres. L'analyse doit être effectuée sur des échantillons frais ou après conservation à +4 °C avec des récipients hermétiquement fermés et contenant le moins d'oxygène possible, afin d'empêcher le développement des éléments parasitaires. En effet, les œufs de certains helminthes et les oocystes de coccidies peuvent se développer, modifiant ainsi leurs caractéristiques diagnostiques. Dans les échantillons fécaux plus anciens, les larves de premier stade (L1) des vers pulmonaires peuvent ne pas être suffisamment viables pour migrer à l'aide de la méthode de Baermann. Enfin, les larves de *Strongyloides* spp. et des Strongylidés peuvent éclore après plusieurs heures ou plusieurs jours respectivement, et les échantillons peuvent donner un résultat faussement négatif pour la détection des œufs.

En parasitologie vétérinaire, les échantillons fécaux ne sont généralement pas conservés longtemps avant d'être examinés. Une conservation à plus long terme peut nécessiter une préservation, par exemple à l'aide de produits chimiques (voir la littérature spécifique pour les milieux de conservation) ou par congélation à -20 °C. Dans ce cas, il convient toutefois de noter que certains stades parasitaires, en particulier les larves de nématodes, les œufs de strongles et d'autres helminthes à paroi fine, ne peuvent pas être détectés de manière fiable dans ces échantillons conservés ou préalablement congelés.

2. Sérum

Dans la plupart des cas, les échantillons de sérum destinés à l'identification et à la quantification des antigènes ou des anticorps sont prélevés dans le sang périphérique. Idéalement, le sang doit pouvoir s'écouler librement dans le tube afin d'éviter l'hémolyse. Dans la mesure du possible, il convient de prélever au moins 5 ml de sang afin d'obtenir un volume de sérum de 2 ml pour l'ensemble du panel de tests. Après une coagulation d'au moins 20 minutes, le sérum est séparé du caillot par centrifugation, transféré dans un nouveau tube et, de préférence, expédié immédiatement. Si nécessaire, le sérum peut être conservé à +4 °C pendant 24 heures maximum avant l'expédition. Si une conservation plus longue est nécessaire, celle-ci doit être effectuée à -20 °C. Il est à noter que la centrifugation avant la coagulation complète peut provoquer une hémolyse susceptible d'interférer avec les tests, et que laisser le sang trop longtemps à reposer est susceptible d'entraîner une croissance microbienne et une dégradation de l'échantillon. Si le sérum n'est pas disponible, le plasma peut être utilisé pour certains tests ; cette possibilité doit être confirmée auprès du laboratoire avant le test.

3. Sang total

Pour la détection microscopique ou moléculaire de parasites ou d'ADN parasitaire dans le sang total (directement ou après concentration, par exemple dans le test de Knott), il faut utiliser des tubes à échantillons contenant un anticoagulant (EDTA, héparine de lithium). Les échantillons de sang total peuvent être conservés à +4 °C pendant 4 jours maximum. La congélation des échantillons à -20 °C permet une conservation plus longue. Elle permet toujours la détection de l'ADN, mais elle limite en revanche l'isolement et l'identification des stades parasitaires.

4. Parasites isolés

Les arthropodes vivants et les raclages cutanés doivent être conservés dans un récipient hermétiquement fermé pour prévenir toute fuite. Il est possible d'ajouter un peu de papier absorbant humide pour éviter leur déshydratation. Pour un examen plus approfondi, ils doivent être fixés dans de l'éthanol à 70 %. Les parasites provenant des fèces, des vomissures, de la peau, etc. doivent être collectés séparément et conservés dans une solution saline physiologique (à court terme) ou dans de l'éthanol à 70 %.

ÉQUIPEMENT STANDARD D'UN LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE

L'entretien du microscope optique est indispensable au diagnostic parasitologique car la microscopie est la technique standard pour l'évaluation des échantillons. Les mesures microscopiques sont souvent nécessaires pour l'identification ; par conséquent, un équipement permettant des mesures précises et standardisées doit être disponible. Pour les structures visibles à l'œil nu, un stéréomicroscope est généralement la meilleure option pour un examen détaillé (voir Tableau 1).

Tableau 1: Plage de grossissements recommandée et critères d'identification des stades parasitaires.

Stades	Plage de grossissement*
Oeufs et larves d'helminthes, petits arthropodes	Faible grossissement pour une observation générale (balayage) : 40–100x ; Pour les détails : 400x
Protozoaires	Grossissement moyen ou fort : 400–650x Frottis sanguin, structures très petites dans les fèces : 1000x (huile d'immersion)
Grands arthropodes, adultes d'helminthes (ou leurs parties, p.ex. proglottis)	Faible grossissement (stereomicroscope)

* Veuillez noter que le grossissement d'un microscope optique est calculé en multipliant le grossissement de l'oculaire (généralement 8 à 10x) par celui de l'objectif. En revanche, un stéréomicroscope n'utilise qu'un seul jeu de lentilles de grossissement.

Différentes caractéristiques telles que la taille, la forme, la couleur, et la morphologie de la surface, de la paroi elle-même et du contenu, doivent être prises en compte lors du diagnostic des stades parasitaires au microscope. Pour l'identification des larves de nématodes (nématodes pulmonaires, strongles des chevaux, ankylostomes des chiens et des chats ou *Strongyloides* spp.), leur mobilité peut être considérée lorsqu'elles sont vivantes. De plus, des structures spécifiques comme la morphologie de la partie antérieure, de l'œsophage et de l'extrémité postérieure sont utiles pour l'identification.

L'équipement supplémentaire pour un laboratoire de diagnostic parasitologique comprend généralement :

(A) Pour la coproscopie :

- Équipement de pesée
- Pilon et mortier
- Récipient en plastique et spatule, abaisse-langue, cuillère en plastique ou similaire
- Bâtonnet en plastique ou spatule fine
- Écouvillon
- Flacon souple en plastique
- Tubes de centrifugeuse (12–15 ml ; 50 ml)
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor à godets
- Bécher (250 ml) ou autre récipient adapté à la sédimentation
- Entonnoir
- Passoires à thé avec une taille de tamis d'environ 0,5–1 mm (pour la flottation ou la sédimentation–flottation) et 0,3 mm (pour la sédimentation)
- Anse (oese) de platine (pliée à angle droit, d'environ 6 mm de diamètre) ou autres dispositifs pour prélever des gouttelettes de solution de flottation en surface
- Lames de microscope
- Lamelles
- Huile à immersion
- Boîte de Petri (en verre ou en plastique, avec un fond quadrillé pour faciliter l'examen microscopique)
- Solution de bleu de méthylène (colorant)
- Trompe à eau (ou pipettes de 10–20 ml)
- Gaze de coton (20 x 20 cm)
- Pipettes Pasteur en plastique ou en verre
- Cellule de comptage des œufs ou des oocystes (par exemple, McMaster, FLOTAC)

De plus, pour la méthode de Baermann :

- Appareil de fixation d'entonnoir
- Tube en caoutchouc et pince de serrage pour tube
- Éprouvettes graduées (100 ml et plus)
- Agitateur magnétique et aimants d'agitation

Pour les coprocultures également :

- Pot de confiture de 500 ml (ou similaire)
- Boîte de Petri d'un diamètre légèrement supérieur à celui du pot en verre
- Chambre de culture à 25 °C, dans l'obscurité
- Sciure, charbon de bois ou vermiculite autoclavés

B) Pour l'hématologie et la sérologie

- Différents équipements sont nécessaires en fonction du format et de la méthode de lecture (par exemple, un microscope à fluorescence pour l'IF ou un lecteur de plaques pour l'ELISA, etc.), ainsi que des pipettes de laboratoire et du matériel de coloration.

C) Pour les raclages cutanés

- Solution de KOH à 10 % ou lactophénol
- Huile minérale ou glycérine

MILIEUX ET SOLUTIONS

- NaCl à 0,9 % (solution saline physiologique)
- Milieu de flottation (voir Tableau 2) :
- Solution de Lugol (10 g d'iode de potassium, 5 g d'iode, 200 ml d'eau distillée)
- Diéthyléther¹
- SAF (acétate de sodium-acide acétique-formol) : 4,5 g d'acétate de sodium, 6,0 ml d'acide acétique concentré, 12,0 ml de formol¹
- Coloration de Ziehl-Neelsen : fuchsine phéniquée, vert de malachite, alcool acide (15 ml de HCl (37 %) dans 485 ml d'EtOH), méthanol (utiliser un kit de coloration)

¹ L'éther, le formol ou le merthiolate-iode-formaldéhyde (contenant du mercure) sont utilisés pour la méthode de concentration SAF (voir 1.2.7.), la méthode de Telemann-Rivas (voir 1.2.8.) et/ou la méthode MIFC (concentration au merthiolate-iode-formaldéhyde) (non décrite dans ce guide). Le choix de la méthode adoptée peut être déterminé, entre autres, par les différentes mesures de sécurité standard des laboratoires concernant ces solutions.

Tableau 2 : Ingrédients et propriétés des solutions de flottation pour les analyses parasitologiques coproscopiques (sélection)

Solution de flottation	Quantité	Volume d'eau	Gravité spécifique*
Solution saturée de sel (NaCl)	340–360 g NaCl	1000 ml	~1,18–1,2
Solution du sel et chlorure de Zinc (ZnCl ₂ + NaCl)	275 g ZnCl ₂ + 262 g NaCl	1000 ml	1,3
Solution de chlorure de Zinc (ZnCl ₂)	440 g ZnCl ₂	1000 ml	1,3
Solution de chlorure de Zinc (ZnCl ₂)	660 g ZnCl ₂	1000 ml	1,45
Solution de sulfate de zinc (ZnSO ₄)	760 g ZnSO ₄	1000 ml	1,3
Solution de sulfate de Magnesium (MgSO ₄)	350 g MgSO ₄	1000 ml	1,28
Solution de sucre **	550 g sucre	440 ml	1,28
Solution saturée de sel avec 50% de glucose	375 g glucose + 250 g NaCl	Up to 1000 ml	1,27
Solution saturée de sel et sucre**	50 g sucre + 100 ml solution saturée de sel		1,33

* à température ambiante, à mesurer à l'aide d'un hydromètre.

** ajouter 0,7 ml de formol (37 %) ou 1 g de phénol cristallisé pour 100 ml afin d'empêcher la prolifération bactérienne et fongique, ou conserver à 4 °C.

1. EXAMENS FÉCAUX

1.1. Informations générales

Examen macroscopique

Avant d'être analysé, chaque échantillon de matières fécales doit être examiné macroscopiquement pour détecter des helminthes (ex : ascarides, proglottis de cestodes, oxyures ; pour la conservation des parasites isolés, voir la partie "introduction") ou du sang.

Examen microscopique

Permet de détecter les œufs, les capsules ovifères, les larves, les oocystes, les trophozoïtes (uniquement dans les fèces fraîches, s'ils n'ont pas été mélangés à une solution de conservation) et les kystes excrétés.

Les œufs d'helminthes, les oocystes et les kystes doivent être identifiés sur la base de :

- la forme : rond, oval, polygonal, en « citron » ;
- la taille : grand = environ 80–150 (–300) μm (ex : œufs de *Fasciola hepatica*, capsules ovifères de *Dipylidium caninum*), moyen = environ 60–80 (–120) μm (ex : œufs d'Ancylostomatidae, œufs de Strongylidae), petit = environ 40–60 μm (ex : œufs de *Strongyloides*, œufs de Taeniidae) et très petit = environ < 40 μm (ex : oocystes de coccidies et de *Cryptosporidium*, kystes de *Giardia*) ;
- l'aspect de la paroi : épaisseur, aspect de la surface (ex : lisse, irrégulière, bosselée), couleur, éléments caractéristiques comme des bouchons polaires ou des micropyles ; et
- du contenu (pouvant dépendre de l'ancienneté des matières fécales) : cellules non segmentées, blastomères, embryon ou larve dans les œufs d'helminthes, nombre de sporocystes et de sporozoïtes et autres structures dans les coccidies et autres protozoaires.

L'identification morphologique des larves de nématodes est basée sur leur longueur, la morphologie de la gaine cuticulaire, du tube digestif et de leurs extrémités antérieure et postérieure. Elles se distinguent des larves de nématodes libres par l'absence de gaines supplémentaires chez les derniers. Les larves de nématodes libres ont une ouverture buccale distincte et sont d'une couleur plus foncée que les stades larvaires infectieux ; elles peuvent avoir des bulbes œsophagiens et plusieurs autres caractéristiques spécifiques.

Selon le principe d'analyse, on distingue différentes méthodes coproscopiques : les examens directs sans concentration (c'est-à-dire les frottis fécaux sans coloration, la détection des stades mobiles ou les frottis colorés) par opposition aux méthodes de concentration des stades parasites :

- Sédimentation
- Flottation (avec ou sans centrifugation)
- Combinaison sédimentation-flottation
- Méthode de Baermann
- Méthodes spécifiques de concentration, telles que la méthode de Telemann-Rivas, SAFC, ...

Conclusion sur les examens coproscopiques

Les méthodes énumérées peuvent fréquemment détecter différents parasites ; toutefois, aucune méthode n'est adaptée à tous les stades et à tous les parasites présents. La méthode préférée doit être sélectionnée en fonction des stades parasites attendus et plusieurs méthodes seront nécessaires pour couvrir le spectre complet des infections possibles.

En général, plus la quantité de fèces est importante, plus la probabilité de détecter des stades parasites est grande (sensibilité plus élevée, c'est-à-dire moins de faux négatifs). Toutefois, la quantité de fèces examinées sera limitée par le degré de contamination de l'échantillon traité : trop de débris diminue la sensibilité (c'est-à-dire plus de faux négatifs), ainsi que la spécificité.

Étant donné qu'une plus grande quantité de matières fécales peut être traitée à l'aide d'une **combinaison de méthodes de sédimentation-flottation**, le niveau de sensibilité est plus élevé, en particulier dans le cas de faibles niveaux d'excrétion. C'est donc la **méthode préférée** pour les examens de routine. Comme la flottation et la sédimentation, cette méthode est classée comme semi-quantitative lorsqu'elle est réalisée avec une méthodologie adaptée et des quantités définies d'échantillons fécaux. La flottation active réalisée par centrifugation est préférable à la flottation passive. Le choix de la solution de flottation, et donc de la densité de cette solution, est également fondamental, car certains parasites ne sont pas détectés lorsque la densité est élevée et d'autres ne le sont pas lorsque la densité est faible.

La sensibilité des méthodes coproscopiques est limitée par les facteurs suivants :

- Les infections doivent être en phase patente, c'est-à-dire que des stades (œufs, larves, (oo)kystes) doivent être présents dans les fèces, ce qui indique une infection en cours avec multiplication/génération de propagules. Les infections pré- ou post-patentes ne peuvent pas être détectées par coproscopie microscopique.
- Tous les stades/parasites ne sont pas excrétés en continu ; il peut être nécessaire de prélever plusieurs échantillons par animal (par exemple, pendant 3 jours consécutifs) ou de procéder à un nouvel échantillonnage.
- Souvent, les infections de faible niveau ne produisent qu'un petit nombre de stades détectables. L'augmentation de la quantité de fèces ou la réalisation de plusieurs analyses par animal peuvent être avantageuses, comme indiqué ci-dessus.

La diarrhée peut diluer les échantillons en augmentant le volume des fèces, diminuant ainsi la sensibilité. Ce phénomène peut être évité en utilisant la méthode combinée de sédimentation-flottation qui concentre les fèces liquides par sédimentation avant de concentrer les parasites par flottation.

En raison de la faible sensibilité de la coproscopie microscopique, les **résultats négatifs** doivent être interprétés avec prudence. Le fait qu'aucun stade parasitaire ne soit détecté dans les fèces n'exclut pas une infection parasitaire en présence de signes cliniques typiques (par exemple, des infections encore prépatentes). Ces cas justifient un examen plus approfondi. Dans certains cas, des méthodes alternatives peuvent être adoptées (par exemple, la détection d'antigènes ou d'anticorps).

D'autre part, la détection directe des parasites a, en général, une spécificité élevée et les résultats faussement positifs sont rares lorsque l'analyse est effectuée correctement. Les résultats faussement positifs peuvent provenir de la coprophagie chez les chiens (c'est-à-dire le passage intestinal observé des parasites du chat *Toxocara cati* ou *Toxoplasma gondii* dans les échantillons de matières fécales des Canidés). Il convient donc de conseiller aux propriétaires d'essayer d'éviter ce comportement, en particulier dans les jours précédant le prélèvement d'un échantillon fécal, afin d'éviter une détection faussement positive de stades parasitaires qui ne font que transiter dans le tube digestif. La détection d'antigènes, qui est disponible dans le commerce pour certaines espèces de nématodes canins, permet de contourner ce problème.

Pour l'interprétation des résultats dans un contexte clinique, les résultats parasitologiques doivent être évalués conjointement avec d'autres examens complémentaires (par exemple, examen clinique, hématologie, etc.) et, dans le cas des stades zoonotiques, avec leurs implications pour la santé humaine.

1.2. Méthodes d'analyses coproscopiques

1.2.1. Sédimentation dans l'eau

Principe :

Avec cette méthode, les éléments parasitaires ayant une densité relativement élevée (par exemple, les œufs de trématodes, en particulier ceux de *Fasciola hepatica* et *Opisthorchis felinus* mais aussi les oocystes de *Eimeria leuckarti*) et les particules fécales lourdes sédimentent rapidement dans l'eau. La sédimentation répétée et la décantation du surnageant permettent d'éliminer les particules fécales plus légères. Cette méthode est généralement utilisée pour détecter les œufs de douve du foie dans les fèces de chevaux, mais aussi de chats.

Prélèvement fécal :

5–10 g de matières fécales. Dans certains cas, pour augmenter la probabilité de détection, il peut être utile de collecter des échantillons de fèces pendant trois jours successifs et d'analyser un sous-échantillon du mélange des 3 fèces.

Mode opératoire :

1. Mélanger à l'aide d'une spatule l'échantillon fécal avec de l'eau pour obtenir une solution homogène. Si la consistance est très ferme, mélangez-la préalablement avec de l'eau à l'aide d'un pilon et d'un mortier.
2. Verser la suspension fèces/eau à travers un tamis (maille de 0,3 mm) dans un récipient approprié (par exemple, un béccher ou similaire) et rincer la passoire avec un fort jet d'eau jusqu'à ce que le béccher soit plein.
3. Laisser sédimenter pendant 3 minutes.
4. Éliminer doucement le surnageant en une seule fois (ou siphonner avec une pompe aspirante).
5. Re-remplir les bécchers avec de l'eau
6. Répéter les étapes précédentes de sédimentation 3 fois. A la fin, le surnageant doit être presque translucide.
7. Ajouter ensuite 1–3 gouttes de bleu de méthylène dans le dernier produit de sédimentation obtenu et homogénéiser.
8. Verser les sédiments dans une boîte de Petri (quadrillée).
9. Examiner les sédiments sous un microscope ou une loupe binoculaire (grossissement x20–50).

Pour la détection standardisée des œufs de *Fasciola hepatica* dans les échantillons de chevaux, un kit commercialisé, le FlukeFinder®, est également disponible.

1.2.2. Flottation avec centrifugation

Principe :

La flottation permet de détecter les œufs d'helminthes et les kystes et oocystes de protozoaires dont la densité est inférieure à celle de la solution de flottation. Dans une suspension d'un échantillon fécal mélangé à une solution de flottation de densité spécifique connue, les éléments parasitaires plus légers s'accumulent à la surface, tandis que les éléments plus lourds coulent ou restent en suspension.

Plusieurs solutions de flottation peuvent être utilisées (Tableau 2). La solution choisie doit être préparée au moins la veille de l'examen et sa densité contrôlée à l'aide d'un hydromètre.

En utilisant une solution saturée de chlorure de sodium, les œufs de *Strongyloides* (fèces fraîches), les Strongylidés, les Ascaridés, et les oocystes de coccidies peuvent être détectés. Avec cette méthode, les stades parasitaires flottent en raison de leur faible densité par rapport à celle plus élevée de la solution saline. La détection des œufs de *Trichuris*, *Capillaria*, Taeniidés, Spiruridés, Oxyuridés et des oocystes d'*Eimeria leuckarti* peut être incertaine car ils nécessitent des solutions de flottation d'une densité plus élevée. Les kystes de *Giardia* sont déformés, tandis que les œufs de trématodes ne sont pas détectés. Le stockage prolongé d'œufs d'helminthes ou de kystes/oocystes de protozoaires dans des solutions hypertoniques peut entraîner la déformation des stades, ce qui complique le diagnostic. Des larves de nématodes peuvent parfois être trouvées dans des préparations de flottation ; cependant, elles sont généralement rapidement déformées et le diagnostic morphologique est fortement compromis.

Outre les stades susmentionnés, les œufs de *Trichuris*, *Capillaria*, Taeniidés, Spiruridés et les kystes de *Giardia* (déformés) peuvent être détectés à l'aide de solutions de sulfate de zinc, de chlorure de zinc, de sulfate de magnésium ou de sel de saccharose/saccharose. Les solutions usagées contenant du zinc (métal lourd) doivent être collectées et éliminées comme des déchets spéciaux.

De nombreuses variantes de la technique de flottation existent, dont certaines sont décrites ci-dessous.

Prélèvement fécal :

Pour les chiens et les chats, un minimum de 4–5 g de fèces (environ la taille d'une noix) est prélevé. Dans certains cas, pour augmenter la probabilité de détection, il peut être utile de collecter des échantillons de fèces pendant trois jours successifs et d'analyser un sous-échantillon du mélange des 3 fèces. Pour les chevaux : jusqu'à 20 g de fèces.

Mode opératoire :

1. Préparer la solution de flottation à température ambiante et vérifier sa densité avec un hydromètre (en l'absence d'hydromètre, agiter la solution jusqu'à la dissolution quasi complète du sel).
2. Mélanger l'échantillon fécal avec un volume 10 fois supérieur de solution de flottation jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Si les fèces ont une consistance ferme, pré-tremper l'échantillon dans un peu d'eau.
3. Verser la suspension fécale à travers un tamis et à l'aide d'un entonnoir dans deux tubes à centrifuger par échantillon. Laisser une marge de 1 cm à partir du haut de chaque tube pour éviter les débordements dans la centrifugeuse.
4. Centrifuger les tubes pendant 3–5 minutes à 300 x g.
5. À l'aide d'une anse de platine (ou d'un dispositif similaire), prélever 3 à 5 gouttes de la surface de la suspension et les placer sur une lame de microscope.
6. Couvrir la lame avec une lamelle couvre-objet et l'examiner au microscope en commençant par un grossissement de 40x. Réaliser la mise au point avec les petites bulles d'air ou des particules comme référence. Toute la surface de la lamelle couvre-objet peut ensuite être examinée à un plus fort grossissement (100–400x). Dans le cas d'échantillons modérément sales, l'examen sans lamelle couvre-objet à un faible grossissement peut accroître la sensibilité, car les œufs et les kystes sont concentrés sur la surface convexe des gouttes.

Il existe plusieurs options pour l'examen microscopique des stades parasitaires qui flottent à la surface des échantillons :

- quelques gouttes de la surface de la suspension fécale peuvent être transférées sur une lame à l'aide d'une anse de platine pliée à angle droit, puis examinées (avec ou sans lamelle couvre-objet) au microscope. Veillez à ne pas briser la surface de la suspension lorsque vous retirez les gouttelettes et assurez-vous que l'ocillet est nettoyé entre les échantillons (lavage suivi d'un passage à la flamme).
- placer une lamelle couvre-objet sur un tube à centrifuger rempli préalablement jusqu'à former un ménisque (la lamelle doit être en contact avec la surface de la solution de flottation) et centrifuger avec la lamelle en place. Une centrifugeuse à panier est requise. La lamelle peut ensuite être retirée, placée sur une lame de microscope et examinée au microscope. Les stades parasitaires qui sont remontés adhérent à la face inférieure de la lamelle avec un peu de liquide et sont transférés sur la lame. La centrifugation avec une lamelle couvre-objet fonctionne mieux avec une solution de saccharose.
- En absence de centrifugeuse à panier, la lamelle couvre-objet est positionnée sur le tube (pour cela, le tube doit être rempli jusqu'en haut afin que la suspension forme un ménisque) puis attendre quelques minutes pour permettre aux stades parasitaires de flotter.

1.2.3. Méthode combinée de sédimentation – flottation

Avec cette méthode, les stades parasitaires sédiment dans l'eau dans un premier temps, puis flottent en raison de leur faible densité dans une solution de flottation de densité plus élevée. L'avantage de cette méthode combinée est sa plus grande sensibilité, car une plus grande quantité de fèces (jusqu'à 20 g) peut être examinée.

La méthode peut être utilisée pour identifier avec précision toutes les classes d'œufs d'helminthes et la plupart des oocystes et kystes de protozoaires. La détection des larves de nématodes et des œufs de trématodes nécessite une expertise car ils sont déformés. Cette méthode ne permet pas de détecter les trophozoïtes de protozoaires et les kystes d'amibes.

Prélèvement fécal :

Pour les chiens et les chats, un minimum de 4–5 g de fèces (environ la taille d'une noix) est prélevé. Dans certains cas, pour augmenter la probabilité de détection, il peut être utile de collecter des échantillons de fèces pendant trois jours successifs et d'analyser un sous-échantillon du mélange des 3 fèces. Pour les chevaux : jusqu'à 20 g de fèces.

Mode opératoire :

1. Placer l'échantillon fécal dans un mortier et le mélanger soigneusement avec de l'eau à l'aide du pilon.
2. Verser la suspension fécale à travers un tamis et à l'aide d'un entonnoir dans deux tubes à centrifuger par échantillon. Rincer les fèces à travers un tamis à l'aide d'un jet d'eau puissant (aucune matière ne doit être perdue au cours de l'opération).
3. Centrifuger pendant 8 minutes, à environ 500–700 x g, pour la sédimentation.
4. Eliminer doucement le surnageant en une seule fois (ou siphonner avec une pompe aspirante) jusqu'à ce que le liquide restant arase la surface du sédiment.
5. Remplir les tubes avec la solution de flottation.
6. Centrifuger les tubes pendant 3–5 minutes à 300 x g.
7. Procéder comme pour la méthode de flottation (voir 1.2.2.).

Alternativement, si aucune centrifugeuse n'est disponible, mélanger l'échantillon fécal avec de l'eau et laisser les tubes à température ambiante pendant 30 minutes à une heure. Verser ensuite le surnageant et mélanger les sédiments avec la solution de flottation jusqu'à former un ménisque. Ajouter une lamelle, attendre 10 à 20 minutes (en fonction de la solution de flottation), placer la lamelle sur une lame de microscope et examiner au microscope. Cette méthode est moins sensible que celles basées sur la centrifugation et ne détecte généralement que les stades parasitaires présents en plus grand nombre.

1.2.4. Méthode modifiée de McMaster pour le comptage des œufs

Principe :

Cette méthode est utilisée pour la **quantification** des œufs d'helminthes ou des oocystes de coccidies dans les fèces. Une suspension fécale avec une dilution définie est placée dans une lame spécifique graduée puis les stades parasitaires sont comptés sous le microscope. À partir du nombre de stades comptés, la quantité contenue dans 1 g de fèces est calculée et exprimée en opg (nombre d'œufs ou d'oocystes par g). Le comptage des œufs est fréquemment adopté pour la détermination quantitative des œufs de strongles chez les chevaux, mais il est également applicable à d'autres stades parasitaires qui flottent. En général, on utilise une solution de flottation de NaCl saturée ; l'utilisation de solutions de flottation ayant une densité spécifique plus élevée permet de détecter des œufs plus lourds.

Pour les études de terrain sur la résistance aux médicaments, la méthode est appliquée avant et après le traitement anthelminthique (test de réduction d'excrétion fécale, TREF ou *faecal egg count reduction test*, FECRT). Le TREF est un test de dépistage de l'efficacité du traitement.

Dans les programmes de contrôle avec des traitements ciblés sélectifs, les comptages d'œufs fournissent des informations sur la contribution individuelle des animaux dans la contamination des pâturages et peuvent être utilisés dans la prise de décision lors traitement sélectif des chevaux (voir le guide de recommandations d'ESCCAP : Traitement et prévention des parasitoses gastro-intestinales chez le cheval).

En raison de ses limites de détection (voir ci-dessous), la méthode de comptage des œufs de McMaster modifiée n'est pas recommandée pour le dépistage des parasites chez les animaux, en particulier pour les endoparasites majeurs (c'est-à-dire *Echinococcus* spp. chez les carnivores ou *Parascaris* spp. chez les chevaux).

Prélèvement fécal :

Au moins 4 g de fèces.

Mode opératoire :

1. Mélanger exactement 4 g de fèces avec environ 30 ml de solution de flottation dans un mortier avec un pilon.
2. Verser la suspension de fèces à travers un tamis et un entonnoir dans un récipient approprié (par exemple, un bécher ou similaire); presser le résidu du tamis à l'aide du pilon ; rincer le mortier et le pilon avec la solution de flottation.
3. Retirer le tamis et l'entonnoir et remplir avec la solution de flottation à 60 ml.
4. Bien mélanger en agitant continuellement, par exemple à l'aide d'un agitateur magnétique.
5. Prélever rapidement un échantillon à l'aide d'une pipette et remplir la première chambre de comptage de la lame. La chambre de comptage doit être entièrement remplie ; aucune bulle d'air ne doit être introduite.
6. Mélanger à nouveau soigneusement la suspension et prélever un deuxième échantillon pour remplir le deuxième compartiment de la lame.
7. Laisser reposer la lame pendant 5 à 10 minutes pour permettre aux œufs/oocystes de remonter à la surface.
8. Placer la lame de comptage sur le microscope et compter tous les stades parasitaires à l'intérieur de la grille de comptage (grossissement 40–100x).

opg =

nombre d'œufs comptés	x	volume de suspension fécale (ml)
quantité de fèces (g) x aire de la grille de comptage (cm ²)		hauteur de la chambre (cm) x nombre de grilles de comptage lues

opg = œufs/oocystes par gramme de fèces

surface de la grille : 1 x 1 cm = 1 cm²

hauteur de la chambre

volume sous la grille = 0,15 ml (calculé à partir de la hauteur de la chambre et la surface de la grille)

Nombre de grilles de comptage lues : inclus dans la formule car ce nombre peut varier

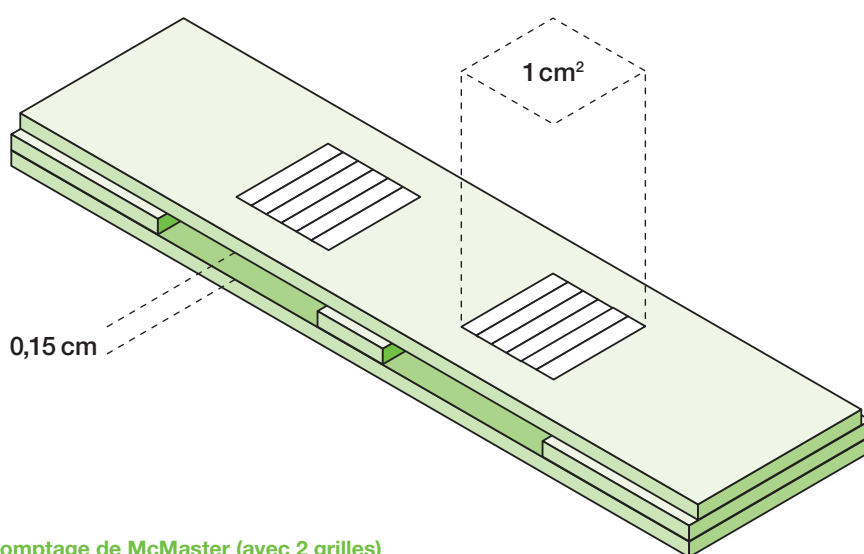


Figure 1 : Lame de comptage de McMaster (avec 2 grilles)

Exemple :

Lorsque la quantité de fèces = 4 g, le volume de la suspension = 60 ml et le volume sous la grille = 0,15 ml, (surface de la grille : 1 x 1 cm = 1 cm², hauteur de la chambre : 0,15 cm) la limite technique inférieure de détection est de 100 opg. Avec des lames à deux chambres et lorsque le nombre total d'œufs comptés sous les deux grilles est ajouté, la limite technique inférieure de détection par lame est de 50 opg.

1.2.5. Mini-FLOTAC

Principe :

Le Mini-FLOTAC permet la détection et la quantification des parasites gastro-intestinaux, y compris les oocystes de coccidies, les œufs d'helminthes et les larves de nématodes. Il est dérivé de l'appareil FLOTAC original mais présente l'avantage supplémentaire de ne pas nécessiter d'étape de centrifugation. Le Mini-FLOTAC peut être réalisé sur des échantillons fécaux frais ou fixés, ce qui permet de traiter les échantillons quelques jours ou quelques semaines après leur transfert au laboratoire. La sensibilité de Mini-FLOTAC est de 5 œufs/oocystes/larves par gramme de fèces.

Le Mini-FLOTAC est composé de deux éléments : la base et le disque de lecture. Il y a deux chambres de flottation de 1 ml pour l'examen des suspensions d'échantillons fécaux avec un grossissement maximum de 400x.

Fill-FLOTAC 2 et 5 sont des dispositifs d'échantillonnage qui font partie des kits FLOTAC et Mini-FLOTAC. Ils se composent d'un récipient, d'un collecteur (2 g ou 5 g) et d'un filtre. Ces kits facilitent la réalisation des quatre premières étapes consécutives des méthodes Mini-FLOTAC, à savoir la collecte de l'échantillon (y compris la pesée), l'homogénéisation, la filtration et le remplissage. Le kit et le processus du Mini-FLOTAC sont décrits ci-dessous.

Chiens et chats

Prélèvement fécal :

Au moins 2 g de fèces

Mode opératoire :

1. Remplir le récipient du Fill-FLOTAC 2 avec 18 ml de solution de flottation.
2. A l'aide d'une spatula, remplir le collecteur conique du Fill-FLOTAC avec 2 g de fèces et lisser la surface.
3. Déliter l'échantillon dans la solution de flottation en déplaçant de haut en bas le collecteur conique.
4. Placer une pointe de pipette sur le Fill-FLOTAC, homogénéiser brièvement et remplir les deux chambres du Mini-FLOTAC jusqu'à ce qu'un petit ménisque se forme.
5. Après 10 minutes, faites pivoter le disque de lecture dans le sens des aiguilles d'une montre et placez le dispositif sous un microscope à l'aide de l'adaptateur fourni avec le kit. Le Mini-FLOTAC peut être examiné avec un grossissement maximum de 400x.
6. Examiner l'échantillon en lisant les deux chambres du Mini-FLOTAC. Multiplier chaque œuf compté par 5 pour obtenir le nombre d'œufs/d'oocystes/de larves par gramme.

Remarque : pour une détection fiable des œufs de Taeniidés, il convient d'utiliser des solutions de flottation de densité plus élevée (voir tableau 2).

Chevaux

Prélèvement fécal :

Au moins 5 g de fèces

Mode opératoire :

1. Remplir le récipient du Fill-FLOTAC 5 avec 45 ml de solution de flottation (NaCl saturé).
2. A l'aide d'une spatule, remplir le collecteur conique du Fill-FLOTAC avec 2 g de fèces et lisser la surface.
3. Déliter l'échantillon dans la solution de flottation en déplaçant de haut en bas le collecteur conique.
4. Placer une pointe de pipette sur le Fill-FLOTAC, homogénéiser brièvement et remplir les deux chambres du Mini-FLOTAC jusqu'à ce qu'un petit ménisque se forme.
5. Après 10 minutes, faites pivoter le disque de lecture dans le sens des aiguilles d'une montre et placez le dispositif sous un microscope à l'aide de l'adaptateur fourni avec le kit. Le Mini-FLOTAC peut être examiné avec un grossissement maximum de 400x.
6. Examiner l'échantillon en lisant les deux chambres du Mini-FLOTAC. Multiplier chaque œuf compté par 5 pour obtenir le nombre d'œufs par gramme.

1.2.6. Méthode de double centrifugation pour la détection des œufs d'*Anoplocephala* dans les matières fécales de chevaux

La méthode de flottation standard avec 20 g de fèces a une sensibilité faible pour la détection des œufs de cestodes. La méthode combinée de sédimentation-flottation, utilisant 2 centrifugations à partir de 15 g de fèces, fournit une meilleure sensibilité.

Prélèvement fécal :

15 g

Mode opératoire :

1. Mélanger soigneusement à l'aide d'une spatule l'échantillon fécal (minimum 15 g) avec au moins 40 ml d'eau.
2. Placer le tamis au-dessus d'un bécher de 250 ml et transférer la suspension fécale dans le tamis. Faire passer tout le liquide à travers le tamis en pressant les résidus à l'aide de la spatule.
3. Transférer le filtrat dans des tubes de 50 ml.
4. Centrifuger pendant 10 minutes à 400 x g.
5. Éliminer le surnageant en une seule fois, ou siphonner à l'aide d'une pompe aspirante ou d'une pipette.
6. Dissoudre le culot restant dans 1 à 2 ml de solution de saccharose et transférer la suspension dans un tube de 15 ml.
7. Remplir avec la solution de saccharose.
8. Centrifuger pendant 10 minutes à 200 x g.
9. À l'aide d'une anse de platine (ou d'un dispositif similaire), transférer des gouttes de la surface (complète) de la suspension fécale centrifugée sur une lame de microscope et la recouvrir d'une lamelle couvre-objet.
10. Examiner au microscope la zone complète sous la lamelle couvre-objet comme décrit dans la section 1.2.2.

1.2.7. Méthode de sédimentation formol-acide acétique-acétate de sodium**Principe :**

La méthode de sédimentation formol-acide acétique-acétate de sodium (SAFC) permet de détecter les stades enkystés et végétatifs des protozoaires (par exemple, *Giardia*) et les petits œufs de certains trématodes comme *Opisthorchis* et *Metorchis*. La conservation préalable des échantillons de matières fécales fraîches dans une solution d'acétate de sodium, acide acétique et formaldéhyde (SAF) est utilisée. Le traitement de l'échantillon permet d'éliminer les composants gras à l'aide d'éther et de concentrer les stades parasites. Les variantes de la méthode de sédimentation formol-éther sont la méthode Telemann-Rivas (voir 1.2.8.) et la méthode de coloration au MIF (mercurothiolate, iode, formol, méthode non décrite dans ce guide).

Solution SAF :

20 ml d'acide acétique concentré
40ml de formaldéhyde (37 %)
15 g d'acétate de sodium
Ajouter 1 L d'eau distillée

Prélèvement fécal :

Minimum 1 g de fèces fraîches placées dans un tube avec 10 ml de solution SAF.

Mode opératoire :

1. Agiter le tube contenant les fèces et la solution SAF.
2. Verser la moitié de la suspension à travers une gaze dans un tube à centrifuger et centrifuger pendant 2 minutes (500 x g).
3. Décanter le surnageant, ajouter 8 ml de sérum physiologique et remuer le sédiment à l'aide d'une spatule ou d'un bâton en plastique.
4. Ajouter 3 ml d'éther diéthylique, fermer le tube et mélanger le contenu en agitant doucement.
5. Retirer le couvercle et centrifuger pendant 5 minutes (500 x g), ce qui permet la formation de plusieurs couches.
6. Détacher les débris de la paroi du tube à l'aide d'un bâtonnet et décanter le surnageant.
7. Transférer deux ou plusieurs gouttes du sédiment sur une lame. Ajouter éventuellement une solution de Lugol, puis couvrir les gouttes avec une lamelle couvre-objet.
8. Examiner au microscope la zone complète sous la lamelle couvre-objet comme décrit dans la section 1.2.2.

1.2.8. Méthode de Telemann-Rivas

Principe :

Cette méthode est une variante de la méthode SAFC. Elle permet de concentrer les œufs, oocystes et larves dans des échantillons de fèces riches en graisses (comme les fèces de carnivores).

Prélèvement fécal :

1 g de fèces.

Mode opératoire :

1. Peser 1 g de fèces fraîches.
2. Placer les fèces dans un bocal en verre et ajouter 5 ml d'acide acétique (concentration d'au moins 5 %).
3. Homogénéiser soigneusement à l'aide d'un bâtonnet et filtrer à travers une double couche de gaze.
4. Transférer la solution fécale dans un tube à centrifuger (12 ml).
5. Ajouter une quantité égale d'éther diéthylique et mélanger en agitant.
6. Centrifuger pendant 5 minutes (300 x g). Le mélange se sépare en 4 couches (de haut en bas) : éther diéthylique/détritus (y compris les composants gras/graisses)/acide acétique/sédiment. La couche de sédiments est souvent étroite.
7. Prélever le sédiment à l'aide d'une pipette et le transférer sur une lame. Ajouter éventuellement une solution de Lugol pour la détection de certains stades parasites (par exemple, les kystes de *Giardia*), couvrir les gouttes avec une lamelle couvre-objet.
8. Examiner au microscope l'ensemble de la zone située sous les lamelles comme décrit au point 1.2.2.

1.2.9. Méthode de Baermann

Principe :

Cette méthode est généralement utilisée pour isoler les larves de nématodes (L1 des vers pulmonaires, *Strongyloides*). La méthode de Baermann peut également être utilisée pour récupérer les larves de troisième stade (L3) des Strongylidés à partir d'une coproculture. Le principe repose sur la migration larvaire (hydrotaxie positive) et la gravité, et ne peut donc être appliqué qu'avec des larves vivantes provenant de matières fécales fraîches. En pesant les matières fécales et en comptant toutes les larves présentes (ou des aliquotes représentatives), il est possible d'effectuer une analyse quantitative.

Prélèvement fécal :

Au moins 4 à 10 g de matières fécales ; il est utile de prélever des échantillons pendant trois jours consécutifs afin de détecter la présence de L1 de nématodes cardio-pulmonaires.

Mode opératoire :

1. Préparez l'appareil de Baermann en plaçant l'entonnoir sur un support et le tuyau en caoutchouc à l'extrémité de l'entonnoir. L'extrémité du tuyau doit être biseautée et la pince parallèle au biseau et l'extrémité de la pince orientée vers le bas. Versez un peu d'eau du robinet dans l'entonnoir. Assurez-vous que la pince ne fuit pas, par exemple en remplissant l'appareil la veille de son utilisation.
2. Mélangez bien les matières fécales (vous pouvez utiliser de la sciure de bois pour les ramollir si l'échantillon est ferme et compact) et placez le mélange homogène dans la gaze.
3. Placer la gaze avec les fèces dans l'entonnoir et ajouter de l'eau jusqu'à recouvrir presque totalement les fèces.
4. Laissez reposer l'échantillon pendant au moins 12 heures à température ambiante. Les larves migrent hors des matières fécales vers le tube et coulent (par gravité) vers l'extrémité de l'entonnoir et du tuyau en caoutchouc.
5. En ouvrant la pince en caoutchouc, les premières gouttes peuvent être analysées au microscope (grossissement 40–400x). Si les larves bougent, on peut ajouter une goutte de solution de Lugol, qui les tue et facilite l'identification de leurs caractéristiques morphologiques. Sinon, prélevez 10 à 14 ml de liquide dans un tube, centrifugez pendant 2 minutes (500 x g), jetez le surnageant et examinez 0,5 à 1 ml du sédiment.

Pour déterminer quantitativement le nombre de larves par gramme de matières fécales (LPG), pesez préalablement les matières fécales, comptez toutes les larves (ou aliquotes) dans le sédiment et extrapolez le nombre de LPG.

1.2.10. Coproculture

Principe :

Les coprocultures sont réalisées à partir de matières fécales de chevaux afin de récupérer les larves de troisième stade (L3) des nématodes gastro-intestinaux : les œufs des Trichostrongylidés et des Strongylidés sont cultivés jusqu'au stade L3, ce qui permet une différenciation au niveau du genre.

Prélèvement fécal :

Au moins 50 g de matières fécales, prélevées directement dans le rectum ou immédiatement après la défécation afin d'éviter toute contamination par des nématodes du sol.

Mode opératoire :

1. Mélangez les excréments avec de la sciure stérilisée jusqu'à obtenir une masse humide et friable (si nécessaire, ajoutez de l'eau du robinet, mais veillez à ce que l'eau soit bien absorbée ; si le mélange est trop humide, les larves ne se développeront pas).
2. Transférez le mélange dans un bocal en verre à couvercle vissé, rempli à moitié, et fermez le couvercle sans le serrer (l'air doit pouvoir entrer dans le bocal).
3. Incubez le bocal pendant 7 à 10 jours dans l'obscurité à 25 °C, en laissant les larves développées migrer vers le haut des parois en verre du bocal.
4. Ouvrez le pot et pressez la culture fécale à l'aide d'un pilon ou d'une cuillère.
5. Remplissez soigneusement le bocal à ras bord avec de l'eau du robinet sans remuer la culture fécale.
6. Appuyez fermement le couvercle d'une boîte de Petri en verre sur le goulot du bocal en verre, puis retournez la culture.
7. Remplissez à moitié la boîte de Petri avec de l'eau et laissez reposer le bocal et la boîte pendant 12 heures, afin que les larves passent du verre de culture au liquide de la boîte de Petri.
8. Recueillir le liquide dans la boîte de Petri à l'aide d'une pipette et identifier les larves au microscope (voir 1.2.9.).

Alternative : après incubation et développement des larves au troisième stade (point 3), celles-ci peuvent être concentrées par la méthode de Baermann (voir 1.2.9.).

1.2.11. Frottis fécal, coloration

Principe :

Les frottis fécaux directs sur des lames de microscope peuvent constituer une option plus rapide pour détecter, par exemple un grand nombre de larves de vers pulmonaires ou de trophozoïtes protozoaires. Cependant, sans concentration, cette procédure présente une faible sensibilité et s'avère dans la plupart des cas insuffisante pour détecter de manière fiable les parasites. La seule exception est la coloration pour la détection de *Cryptosporidium* décrite ici.

Les oocystes de *Cryptosporidium* peuvent être détectés dans des frottis fécaux minces après coloration. Après une coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (coloration acido-résistante), les oocystes apparaissent sous forme d'objets arrondis de couleur rose (diamètre 4–6 µm) sur un fond turquoise. Après une coloration au carbolfuchsine selon Heine, les oocystes sont visibles sous forme de structures incolores sur un fond rougeâtre. D'autres colorations, telles que la coloration de Kinyoun, conviennent également pour détecter ces oocystes.

Prélèvement fécal :

1 g de matières fécales, semi-liquides ou liquides (mélangées à de l'eau si elles sont trop fermes).

Mode opératoire (coloration de Ziehl-Neelsen) :

1. Étalez les matières fécales en une fine couche sur une lame de microscope à l'aide d'un coton-tige.
2. Laissez sécher à l'air libre pendant environ 30 minutes à température ambiante.
3. Fixez dans du méthanol pendant 5 minutes dans une station de coloration.
4. Laissez sécher à l'air libre.
5. Colorez avec de la fuchsine carbolique pendant 4 minutes dans une station de coloration.
6. Rincez à l'eau froide du robinet.
7. Décolorez avec de l'alcool-acide à 1% dans une station de coloration jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de couleur qui s'écoule.
8. Rincez à l'eau froide du robinet.
9. Contre-colorez avec du vert de malachite pendant 4 minutes dans une station de coloration.
10. Rincer à l'eau froide du robinet.
11. Sécher à l'air libre.
12. Effectuer un examen microscopique avec un grossissement de 400 à 1000x (immersion dans l'huile), en recherchant des objets arrondis de couleur rose (diamètre : 4–6 µm).

Mode opératoire (coloration de Heine) :

1. Mélangez une goutte de matières fécales avec de la carbolfuchsine et étalez-la en fine couche sur une lame de microscope.
2. Laissez sécher à l'air libre jusqu'à ce que la surface semble terne, puis examinez immédiatement au microscope avec immersion dans l'huile, comme décrit ci-dessus.

1.2.12. Méthode de la cellophane adhésive

La méthode d'impression directe (également appelée méthode de la cellophane adhésive ou « scotch test ») utilise un ruban adhésif transparent collant sur une face (d'environ 1 cm de large et 4 cm de long) pour prélever des échantillons autour de l'anus des chevaux afin de détecter la présence d'œufs d'*Oxyuris equi*. La même méthode peut être utilisée pour prélever des œufs d'*Echinococcus* et d'autres ténias dans la région périanale des chiens. Le côté adhésif du ruban est pressé plusieurs fois sur la peau. Ensuite, il est collé sur une lame. Le ruban sert de lamelle couvre-objet et l'échantillon peut être évalué au microscope.

1.2.13. Kits commerciaux d'examens fécaux/tests InPouch™ TF Feline/ tests de detection de coproantigènes

Divers kits permettant d'effectuer la procédure de flottation sont disponibles dans le commerce afin de faciliter l'examen des fèces (par exemple, Parasite Diagnosis System®, ParaTest®, Fecalyzer®, Ovatec® Plus) ; ces kits fonctionnent avec une solution de flottation prête à l'emploi (densité 1,2) et des récipients pour l'analyse.

En général, ces kits sont particulièrement adaptés pour l'analyse des fèces chez les chiens et les chats. Ils sont intéressants car ils sont faciles à utiliser et permettent de manipuler et d'examiner les échantillons de fèces de manière hygiénique.

Cependant, il faut tenir compte du fait que ces kits ne permettent de traiter que de petites quantités de fèces, car le récipient est petit et que la procédure peut nécessiter de placer l'échantillon de fèces sous la grille du tamis. Par conséquent, les kits ne conviennent qu'aux échantillons prélevés sur des carnivores et, en cas d'infestation légère, leur sensibilité de détection est moindre (quantité de matières fécales examinée plus faible, densité plus faible des solutions de flottation, pas de concentration par centrifugation) par rapport à la méthode combinée de sédimentation-flottation décrite ci-dessus. De plus, il n'est généralement pas possible d'inspecter macroscopiquement l'échantillon (par exemple, pour détecter la présence de proglottis) si le propriétaire de l'animal a déjà fermé le récipient contenant l'échantillon de matières fécales avant de l'apporter pour analyse. Par rapport aux méthodes conventionnelles, l'analyse à l'aide d'un kit entraîne un coût plus élevé et produit plus de déchets plastiques, car elle utilise des composants jetables.

InPouch™ TF Feline

Cette procédure est utilisée pour la culture et la détection des trophozoïtes de *Tritrichomonas foetus* dans les matières fécales des chats. Les matières fécales (0,03 g, soit l'équivalent d'une tête d'épingle) sont introduites à l'aide d'un coton-tige stérile dans un sachet disponible dans le commerce (InPouch™ TF Feline) contenant un milieu de culture. Le sachet est étiqueté et daté, puis fermé pour être cultivé en position verticale à 37 °C pendant 24 heures, puis conservé à température ambiante dans l'obscurité. Le sachet est examiné au microscope à la recherche de trophozoïtes après 24 heures, 48 heures, puis tous les deux jours jusqu'à 12 jours.

Bien que le test soit considéré comme spécifique à *T. foetus*, des flagellés non pathogènes tels que *Pentatrichomonas* peuvent apparaître dans la culture, ce qui nécessite une différenciation moléculaire.

Tests coproantigéniques et autres tests de détection des parasites utilisant des anticorps

Les tests coproantigéniques recherchent de manière qualitative les antigènes des parasites dans les matières fécales et sont couramment utilisés en clientèle, mais aussi dans les laboratoires spécialisés, car leur sensibilité est élevée lorsqu'ils sont utilisés pour l'examen de l'espèce hôte visée. Les formats de détection des coproantigènes peuvent être des tests d'immunofluorescence directe (TID) sur lames, des tests antigéniques de type ELISA ou EIA (essai immunoenzymatique) dans des plaques à 96 puits, ou des tests immunochromatographiques sur bandelettes (TIC) (voir également le tableau 3). Comme il existe désormais des tests conçus pour être utilisés chez les chiens et les chats, ceux-ci sont préférés à ceux développés pour les échantillons de fèces humaines en raison d'une meilleure assurance qualité, notamment en termes de spécificité.

Dans le cas de *Giardia*, il convient de noter que la détection de coproantigènes n'est pas toujours corrélée à la maladie, et les résultats des tests doivent être interprétés conjointement avec les signes cliniques.

Tableau 3 : Exemples de tests coproantigéniques disponibles dans le commerce (sans prétention d'exhaustivité)

Test	Fabricant	Parasite détecté	Type d'analyse	Espèce hôte*
Anigen Rapid CPV/CCV/Giardia Ag 2.0	BioNote, Corée	<i>Giardia</i>	immunochromatographie	Chien, chat
FASTest® GIARDIA	Megacor, Autriche	<i>Giardia</i>	immunochromatographie	Chien, chat
FASTest® CRYPTO-GIARDIA	Megacor, Autriche	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>	immunochromatographie	Chien, chat
SNAP® Giardia	IDEXX, USA	<i>Giardia</i>	ELISA	Chien, chat
Merifluor® <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i>	Meridian Bioscience, Royaume-Uni	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>	Détection par immunofluorescence directe	Chien
Test antigénique Fecal Dx™**	IDEXX, Etats-Unis	<i>Giardia</i> , Ascaridés, Ankylostomatidés, trichures, <i>Dipylidium caninum</i> , <i>Cystoisospora</i> spp.	ELISA	Chien, chat***
Speed Giardia™	BVT-Virbac, France	<i>Giardia</i>	immunochromatographie	Chien, chat
Uranotest® Giardia	Uranovet, Espagne	<i>Giardia</i>	immunochromatographie	Chien, chat
WITNESS® GIARDIA	Operon S.A., Espagne****	<i>Giardia</i>	immunochromatographie	Chien, chat

* d'après les recommandations du fabricant; certains tests peuvent être réalisés chez d'autres espèces selon la littérature.

** Les kits PetChek™ IP sont fournis par les cliniques vétérinaires et les échantillons doivent être envoyés au fabricant. Fecal Dx™ fait référence aux mêmes tests et à la même entreprise.

*** usage décrit chez le chien

**** commercialisé par Zoetis

2. SEROLOGIE

2.1. Informations générales

Les tests sérologiques sont préférables à la détection directe lors d'infection chronique, où la faible densité parasitaire réduit le taux de réussite de la détection directe (par exemple, dans les cas de babésiose ou de néosporose), ou lorsque le tissu infecté ne peut pas être prélevé et que les stades ne sont pas directement accessibles dans les fluides corporels. Il s'agit notamment de protozoaires tissulaires à l'origine d'infections chroniques, par exemple dans le cerveau ou les tissus oculaires pour respectivement *Toxoplasma gondii* ou *Encephalitozoon cuniculi*. Concernant le diagnostic de la leishmaniose canine, les tests sérologiques quantitatifs ou semi-quantitatifs sont utilisés en complément de la détection directe pour aider à l'interprétation correcte de l'infection, évaluer le statut immunologique de l'animal, surveiller la réponse au traitement et anticiper une éventuelle rechute.

Détection des antigènes

À l'instar des tests coproantigéniques, qui détectent les antigènes dans les matières fécales (voir 1.2.13.), la détection sérologique des antigènes consiste à détecter directement dans le sang ou le sérum des fragments du parasite (antigènes somatiques) ou des antigènes d'excrétion/sécrétion parasitaires. Comme pour la détection de l'ADN, cela fournit une preuve directe de la présence du parasite dans la circulation sanguine et informe sur le statut actuel de l'infection. *Dirofilaria immitis* et *Angiostrongylus vasorum* sont des parasites sanguins dont les antigènes circulants peuvent être détectés par sérologie (voir tableau 4).

Tableau 4 : Sélection de tests sérologiques disponibles dans le commerce pour le diagnostic de parasites ou de bactéries vectorisés chez les chiens, les chats et les chevaux.

(Sources: www.megacor.at; www.laboklin.de; www.idexx.ch; uranovet.com et autres; non exhaustif)

Test	Fabricant	Parasites ou bactéries vectorisées détectés	Type de test	Espèce hôte
Tests antigéniques				
Anigen Rapid CHW Ag 2.0	BioNote, Corée du Sud	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
DiroCHEK®	Zoetis, États-Unis	<i>Dirofilaria immitis</i>	ELISA	chien
FASTest® HW Antigen	Megacor, Autriche	<i>Dirofilaria immitis</i>	ELISA	chien
Angio Detect™ Test	IDEXX, États-Unis	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
Speed Diro™	BVT-Virbac, France	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
Uranotest® Dirofilaria	Uranovet, Espagne	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien, chat
WITNESS® Dirofilaria	Zoetis, États-Unis	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
Tests de detection d'anticorps				
ANAPLASMA-ELISA DOG	Afosa, Allemagne	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ELISA	chien
Anigen Rapid Leishmania Ab	BioNote, Corée du Sud	<i>Leishmania infantum</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
BABESIA-ELISA DOG	Afosa, Allemagne	<i>Babesia canis</i>	ELISA	chien
EHRlichia-ELISA DOG	Afosa, Allemagne	<i>Ehrlichia canis</i>	ELISA	chien
Diagnosteq	Université de Liverpool, Royaume-Uni	<i>Anoplocephala perfoliata</i>	ELISA	Equidés
EquiSal	Austin Davis Biologics, Royaume-Uni	<i>Anoplocephala perfoliata</i>	ELISA (salive)	Equidés
LEISHMANIA-IgG ELISA DOG	Afosa, Allemagne	<i>Leishmania infantum</i>	ELISA	chien
SARCOPTES-ELISA 2001 DOG	Afosa, Allemagne	<i>Sarcoptes scabiei</i> var. <i>canis</i>	ELISA	chien
SNAP® Leishmania	IDEXX, États-Unis	<i>Leishmania infantum</i>	ELISA	chien
Speed Leish K™	BVT-Virbac, France	<i>Leishmania infantum</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
Uranotest® Ehrlichia-Anaplasma	Uranovet, Espagne	<i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
Uranotest® Ehrlichia	Uranovet, Espagne	<i>Ehrlichia canis</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
Uranotest® Leishmania	Uranovet, Espagne	<i>Leishmania infantum</i>	Immunochromatographie à flux latéral	chien
Tests combinés de détection d'antigènes (Ag) et d'anticorps (Ac)				
SNAP® 4Dx® Plus	IDEXX, États-Unis	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Borrelia burgdorferi</i> (Ac) <i>Ehrlichia canis</i> (Ac) (<i>E. ewingii</i> , <i>E. chaffeensis</i>) <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (Ac), <i>A. platys</i> (Ac)	ELISA	chien
Uranotest® Quattro	Uranovet, Espagne	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Leishmania infantum</i> (Ac) <i>Ehrlichia canis</i> (Ac), <i>A. platys</i> (Ac)	Immunochromatographie	Chien
SNAP Feline Triple	IDEXX, États-Unis	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) Virus de l'immunodéficience féline (Ac) Virus de la leucose féline (Ac)	ELISA	chat

Détection des anticorps

La détection d'anticorps spécifiques contre des parasites dans un seul échantillon indique que l'animal a déjà été exposé à cet antigène/parasite. La production d'anticorps étant retardée, ceux-ci ne peuvent généralement être détectés que deux à trois semaines après l'infection primaire. Les anticorps persistent également après l'élimination de l'agent pathogène, pendant de nombreuses semaines, voire des mois ou des années, avec de grandes variations individuelles et spécifiques à l'agent pathogène. Il est important de tenir compte des anticorps provenant d'autres sources que l'infection, comme les anticorps issus d'une vaccination antérieure (contre *Leishmania* spp. ou *Babesia* spp., par exemple) ou les anticorps maternels chez les très jeunes animaux. La réaction croisée avec d'autres organismes ou les réactions non spécifiques peuvent limiter la spécificité des tests sérologiques.

Pour réduire les résultats erronés, les tests sérologiques peuvent être répétés après un certain délai (généralement de 2 à 3 semaines) afin de vérifier si les taux d'anticorps ont varié. Si les valeurs d'un animal étaient auparavant négatives ou faibles et qu'elles augmentent ou deviennent positives, cela peut être interprété comme une infection active ; si elles diminuent ou deviennent négatives, l'infection est terminée. Il existe toutefois des exceptions à cette règle.

Pour tester les fluctuations des anticorps, des tests ELISA quantitatifs (avec des valeurs unitaires, des scores ou des concentrations) ou des tests IFA semi-quantitatifs (titres) peuvent être utilisés. Les tests rapides en clinique sont de nature qualitative et permettent uniquement de déterminer si un animal est séropositif ou séronégatif pour le ou les agents pathogènes recherchés.

Les types de tests utilisés pour la détection des anticorps sont similaires à ceux de détection des antigènes, à l'exception du substrat utilisé qui est inversé. La réalisation de la plupart de ces tests est réservée à des laboratoires spécialisés, car ils nécessitent un équipement spécifique. Aussi, les méthodes ne sont pas décrites en détail dans ce document. Seuls les différents types de tests disponibles dans la pratique sont répertoriés.

En général, la détection d'anticorps est utilisée pour la détection de l'infection par des protozoaires extra-intestinaux responsables d'infections chroniques, comme *T. gondii*, *E. cuniculi* (chats et chiens), *Neospora caninum* (chiens), *Sarcocystis neurona* (Equidés), ainsi que de nombreux agents pathogènes vectorisés, tels que *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis* (chats et chiens), *Angiostrongylus vasorum* (chiens), *Babesia caballi* et *Theileria equi* (Equidés). Pour les chiens, la détection d'anticorps contre les métacestodes de l'échinococcose alvéolaire peut être effectuée dans des laboratoires spécialisés.

De plus, l'infestation par *Anoplocephala perfoliata* chez les chevaux peut être diagnostiquée par la détection d'anticorps dans le sérum ou la salive. Chez les chiens, la détection de la gale sarcoptique peut être facilitée par un test sérologique de détection des anticorps.

Certains laboratoires proposent des « forfaits voyage » pour les chiens, combinant différents tests (sérologie, PCR, détection d'antigènes, test de Knott, etc.) pour détecter divers agents pathogènes « exotiques ». Cependant, il faut tenir compte des différences de temps d'incubation et d'apparition des signes cliniques entre ces différentes infections ou infestations. Dans certains cas, il peut être conseillé de refaire les tests.

Certains pays ont mis en place des réglementations nationales concernant le dépistage de la piroplasmose équine.

Assurance qualité des tests sérologiques

Comme tous les tests diagnostiques, les tests sérologiques présentent différents niveaux de sensibilité et de spécificité. Dans le cadre des bonnes pratiques cliniques, il est recommandé d'inclure des contrôles positifs et négatifs dans un test sérologique. De nombreux laboratoires fournissent des informations générales sur la qualité technique de leurs tests, ainsi que des aides à l'interprétation concernant notamment les interférences avec les anticorps vaccinaux, la réactivité croisée avec des agents pathogènes étroitement apparentés et d'autres facteurs à prendre en compte pour interpréter les résultats.

En fonction du tableau clinique et des exigences du test, il peut être conseillé de combiner un test sérologique à d'autres méthodes de détection directe ou, si cela n'est pas possible, à un autre système de test indirect permettant de détecter les anticorps. Le Western blot est souvent utilisé comme test de référence pour les infections humaines, mais en raison de contraintes de coût et de temps, son application au diagnostic vétérinaire est généralement limitée à la recherche, à quelques exceptions près.

Le cas échéant, les immunoglobulines produites lors d'infections actives et subaiguës (IgM) sont différenciées de celles qui dominent lors d'infections chroniques (IgG).

Dans le cas de la leishmaniose canine, la sérologie peut ne pas suffire à évaluer le succès du traitement, car les anticorps peuvent persister pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, après la guérison clinique, le parasite ne pouvant être éliminé. Il est donc recommandé de procéder à des analyses de laboratoire supplémentaires pour évaluer le statut immunitaire et l'état sanitaire du patient. La PCR quantitative permet d'estimer la charge parasitaire dans des tissus comparables, ce qui pourrait s'avérer utile pour le suivi du traitement d'une leishmaniose canine, même si cette approche doit encore faire l'objet d'évaluations approfondies.

2.2. Méthodes quantitatives pour la détection des anticorps

2.2.1. Test d'immunofluorescence indirecte (IFI)

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) repose sur la détection d'anticorps spécifiques qui se lient à des antigènes (de parasites entiers inactivés) fixés sur des lames de verre, puis sont détectés par un anticorps secondaire. Cet anticorps se lie à la région invariable de l'anticorps primaire (issu du sérum de l'échantillon), lié de manière covalente à un fluorophore. À l'aide d'un microscope à lumière fluorescente, le fluorophore de l'anticorps lié est détecté à la longueur d'onde appropriée. Cette méthode est très précise lorsqu'elle est correctement réalisée, mais elle est longue et requiert un certain niveau de formation et d'expertise. Elle est toutefois encore largement utilisée pour les petits animaux, car elle est moins sujette aux réactions non spécifiques. L'inconvénient de cette méthode est que tous les antigènes ne sont pas également accessibles aux anticorps, ce qui peut réduire sa sensibilité par rapport à d'autres tests. Comme les résultats sont exprimés en titres, ils fournissent une information semi-quantitative qui peut être utile pour des études de suivi.

2.2.2. Test d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA)

Le test d'immunoabsorption par enzyme liée (en anglais : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) permet de détecter des antigènes ou des anticorps spécifiques qui se lient à un antigène traité (un lysat complet d'antigènes natifs ou recombinants) ou à des anticorps absorbés sur une surface en plastique (ELISA indirect). Dans ce cas, l'anticorps secondaire est marqué par une enzyme qui provoque un changement de couleur d'un substrat chromophore, lequel peut être mesuré et quantifié en déterminant la densité optique. Une version plus élaborée de cette méthode est le test ELISA sandwich, qui ne lie pas l'antigène directement à la surface en plastique, mais utilise des anticorps liés à cette surface pour « capturer » des antigènes spécifiques. Cette méthode est utile lorsque la liaison directe de mélanges d'antigènes à la phase solide diminue la spécificité du test. D'autres types de tests ELISA sont possibles.

Le test ELISA est un format de test plus standardisé, car il se présente sous forme de plaques à 96 puits et est souvent personnalisé avec des contrôles inclus, de sorte qu'il n'est pas nécessaire de disposer d'une expertise spécifique aux agents pathogènes pour effectuer le test. Les résultats du test sont généralement exprimés sous forme de valeurs d'absorbance, de scores, de concentrations ou d'unités d'anticorps. Dans la plupart des cas, une seule dilution du matériel diagnostique est utilisée pour la détection d'anticorps spécifiques, et de faibles dilutions pour la détection d'antigènes. Par conséquent, l'intensité de la réaction n'est pas toujours corrélée à la quantité d'anticorps présents (dans le cas de réactions fortement positives, le système peut être saturé).

Les tests ELISA sont plus standardisés que les tests par IFI, la lecture optique étant moins subjective que la microscopie. Aussi, les tests ELISA quantitatifs sont préférables aux tests par IFI pour évaluer les variations temporelles des titres d'anticorps.

Dans des cas particuliers, d'autres substrats que le sang peuvent être testés, comme la salive des chevaux pour *Anoplocephala perfoliata* (EquiSal®).

2.3. Méthodes qualitatives

2.3.1. Systèmes de test rapide

Des tests rapides enzymatiques (utilisant des anticorps liés de manière covalente à une enzyme et nécessitant une étape de lavage) ou des tests immunochromatographiques (utilisant des anticorps liés à de l'or colloïdal et ne nécessitant aucune étape de lavage) sont disponibles pour diagnostiquer rapidement diverses infections au chevet du patient. Ces tests sont fournis par des entreprises spécialisées qui garantissent la qualité de leurs produits et fournissent tout le matériel nécessaire, y compris des contrôles positifs et négatifs. Ces tests sont faciles et rapides à réaliser, et ne nécessitent pas de formation spécifique. Cependant, ils ne doivent pas être utilisés pour d'autres cas ou hôtes que ceux spécifiés dans la documentation du test. Le niveau d'anticorps ou d'antigènes évalué n'est généralement pas assez précis pour déterminer une augmentation ou une diminution des titres.

3. EXAMENS CUTANÉS

3.1. Informations générales

Cette section est dédiée à l'identification des parasites externes qui causent des maladies (ou ectoparasitoses) directement du fait de leur présence sur la peau des chiens, des chats, des chevaux et des petits mammifères de compagnie.

Les puces, les poux, les acariens et les tiques provoquent tous des maladies parasitaires en lien avec leur présence directe et/ou bien indirectement par la transmission d'agents pathogènes à l'animal.

Le diagnostic d'une parasitose cutanée par des ectoparasites microscopiques tels que les acariens, et la différenciation des spécimens isolés nécessitent généralement une observation microscopique d'un ou plusieurs stades de vie du parasite. L'identification correcte dépend d'un prélèvement de qualité du matériel et, après préparation, d'un examen au microscope optique, de préférence avec le condenseur abaissé et la source lumineuse atténuée.

La section suivante décrit les méthodes d'isolement des ectoparasites les plus communes.

3.2. Peignage pour collecte de puces

Un peigne « à puces » est un peigne à dents fines permettant de collecter les débris du pelage d'un animal.

En l'absence d'observation de puces adultes se déplaçant dans le pelage, les déjections de puces peuvent être facilement mises en évidence en peignant l'animal puis en déposant le matériel collecté sur un papier blanc humide, un mouchoir ou du coton : les petites taches noires de déjection de puces se délitent et se retrouvent entourées d'un anneau rouge de sang digéré.



Figure 2: Peignage

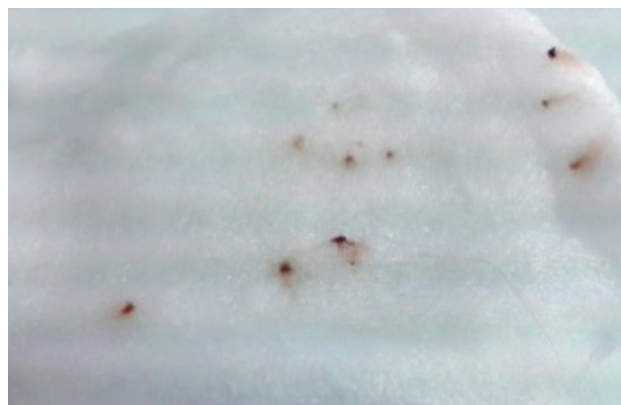


Figure 3: Sang digéré mis en évidence dans des déjections de puces par ajout d'eau

Le peignage peut également être utile pour diagnostiquer une infestation par *Cheyletiella* ou par les poux. Les produits de peignage peuvent être placés dans une boîte de Petri et examinés au microscope : des acariens peuvent être observés se déplaçant parmi les débris (« pellicules mobiles »). Une autre méthode permettant d'identifier les poux ou les *Cheyletiella* consiste à récupérer les pellicules du peigne à l'aide d'un ruban adhésif (voir 1.2.12). Une observation microscopique permet par la suite d'identifier les parasites ou leurs œufs.

3.3. Raclages cutanés

Les raclages cutanés permettent de prélever les premières couches (superficielles) ou l'ensemble des couches (profondes) de l'épiderme afin de détecter des ectoparasites qui restent soit à la surface de la peau, soit qui creusent ou résident dans des structures plus profondes, comme les follicules pileux. Le prélèvement s'effectue en bordure des lésions cutanées, à la limite avec la peau saine, ou sur les sites de prédilection des ectoparasites.

Les raclages sont réalisés à l'aide d'une lame de scalpel ou d'une curette. De l'huile minérale doit être appliquée sur la lame du scalpel et sur la peau afin de permettre aux débris et aux parasites d'adhérer à la lame. Si une tonte est nécessaire, seuls des ciseaux doivent être utilisés, et il est préférable de racler une peau qui n'a pas été endommagée par un grattage excessif (lésions d'excoriation).

L'échantillon doit être transféré dans un tube en plastique transparent à large ouverture puis fermé hermétiquement.

Dans un premier temps, le produit de raclage ainsi que les parois du tube en plastique peuvent être examinés à l'aide d'un microscope ou d'une loupe, car les acariens et autres arthropodes ont tendance à migrer hors des débris cutanés. Le matériel collecté peut ensuite être étalé sur une lame ; quelques gouttes d'huile minérale ou de glycérol doivent être déposées dessus, puis l'ensemble est recouvert d'une lamelle, puis examiné au microscope avec un grossissement de x40 à x100.

Les raclages cutanés superficiels et profonds devraient idéalement être réalisés sur des zones relativement étendues du corps, en bordure des zones atteintes, à la limite avec la peau saine.

Chez les chiens et les chats, les raclages cutanés sont recommandés afin d'établir un diagnostic de gale (par exemple, *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*), de démodécie (*Demodex* spp.), de cheyletiellose (*Cheyletiella* spp.) ou d'infestation par des aoûtats (larves de *Neotrombicula autumnalis*). En particulier :

- En cas de suspicion d'infestation par *Demodex canis* ou *Demodex cati*, il est recommandé de réaliser un trichogramme en première intention (voir 3.5.) : si des *Demodex* sont présents et attachés aux poils, il n'est alors pas nécessaire d'effectuer un raclage cutané, plus invasif.
- Pour le diagnostic de *Sarcoptes scabiei* chez le chien, il est recommandé de réaliser des raclages cutanés profonds au niveau des coudes, des marges des oreilles et des faces latérales des jarrets, en périphérie des lésions. Il a été rapporté que plus de 50 % des raclages effectués chez des chiens atteints de gale sarcoptique sont négatifs ; ainsi, pour améliorer la sensibilité diagnostique, plusieurs prélèvements (idéalement 6 à 10) doivent être effectués sur différentes zones suspectes de l'animal. En alternative, certains laboratoires proposent un test ELISA permettant de détecter les anticorps dirigés contre *S. scabiei*, contribuant ainsi à améliorer le diagnostic (voir Tableau 4).
- Pour la recherche de *Demodex gatoi* chez le chat, des raclages cutanés peuvent être réalisés, comme décrit pour la recherche de *S. scabiei* chez le chien.
- Pour la détection de *Cheyletiella*, des raclages peuvent être réalisés au niveau du dos et des pavillons auriculaires ; toutefois, la méthode recommandée est celle de la cellophane adhésive (voir section 3.4).
- Les raclages cutanés peuvent également permettre de détecter des larves de parasites internes à migration transcutanée, telles que celles des nématodes des genres *Pelodera*, *Ancylostoma*, *Uncinaria*, ou des formes promastigotes de *Leishmania*. Il est également possible de retrouver occasionnellement des microfilaires de *Dirofilaria*. Une confirmation de l'espèce par biologie moléculaire doit alors être réalisée.

Les raclages cutanés peuvent également être utilisés pour la détection d'acariens chez les petits mammifères de compagnie.

Les raclages cutanés profonds sont recommandés pour détecter les *Demodex* qui vivent profondément dans les follicules pileux. Pour détecter ces acariens, les zones d'alopecie doivent être raclées avec une lame ou une curette enduite d'huile minérale, dans le sens de la pousse du poil, jusqu'à l'apparition d'un saignement capillaire (« rosée sanguine »). La peau doit être pressée avant ou pendant le raclage afin de favoriser l'extrusion des *Demodex* des follicules pileux.

L'évaluation du nombre et de la vitalité des différents stades de vie est utile pour apprécier la réponse au traitement. Alors que les chiens en bonne santé hébergent souvent un faible nombre de *Demodex*, les animaux cliniquement affectés présentent généralement une forte infestation, et le diagnostic direct est alors très sensible. Cependant, il a été rapporté que les raclages profonds peuvent donner des résultats faux négatifs pour *Demodex*, notamment dans les zones difficiles à racler (yeux, espaces interdigitaux) et chez certaines races (Bobtail, Scottish Terrier, Shar-pei). Dans ces cas, les trichogrammes (voir 3.5.) peuvent être plus utiles pour obtenir suffisamment de matériel diagnostique. Récemment, il a été démontré que l'utilisation de la méthode de la cellophane adhésive (voir 3.4.) combinée à une compression de la peau offre un taux de succès diagnostique supérieur à celui des raclages profonds pour *Demodex* ; cette procédure est également moins douloureuse pour l'animal.

Chez les Equidés, les raclages cutanés profonds peuvent être utilisés pour détecter *Demodex* ainsi que les stades larvaires de nématodes (*Pelodera*, *Strongyloides* et *Habronema*).

Raclages cutanés superficiels

Chez le chien, pour la détection des formes courtes de *Demodex* (*D. cornei*), qui sont plus superficielles, des raclages cutanés superficiels peuvent être réalisés, en alternative à la méthode de la cellophane adhésive (voir 3.4.) et au trichogramme (voir 3.5.).

Chez les Equidés, les raclages cutanés superficiels peuvent être utilisés pour l'identification des acariens *Chorioptes*, *Psoroptes*, *Sarcoptes*, des larves de *Neotrombicula* ainsi que des acariens des fourrages (*Pediculoides ventricosus*, *Pyemotes tritici*, *Acarus farinae*).

Les raclages cutanés superficiels (ainsi que la méthode de la cellophane adhésive) sont également utiles pour détecter les poux.

Traitement du produit de raclage cutané avec une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) ou du lactophénol

Le produit de raclage peut être traité en ajoutant une solution à 10 % d'hydroxyde de potassium (KOH) ou du chloral lactophénol pendant au moins 2 à 3 heures, ou toute la nuit, à température ambiante. Alternativement, le chauffage de la solution de KOH dans un récipient approprié permet de raccourcir la procédure. La solution de KOH et le chloral lactophénol permettent de digérer les substances kératiniques de la peau tout en laissant intacts les exosquelettes chitineux des arthropodes. La suspension peut être examinée dans une boîte de Petri au microscope ou entre lame et lamelle au microscope (grossissement x40 à x100). Pour une identification précise, les arthropodes doivent être transférés sur une lame et différenciés. Les arthropodes pouvant être identifiés par cette procédure comprennent : les poux piqueurs et suceurs, et les acariens (*Cheyletiella*, *Neotrombicula*, *Demodex*, *Sarcoptes*, *Notoedres*).

3.4. Méthode de la cellophane adhésive

La méthode d'impression directe (également appelée méthode de la cellophane adhésive ou « scotch test ») utilise un ruban adhésif transparent (d'environ 1 cm de large et 4 cm de long) pour prélever les débris à la surface de la peau et du pelage, comme décrit en 1.2.12. Le côté collant du ruban est pressé plusieurs fois sur la peau. Ensuite, il est appliqué (côté collant vers le bas) sur une lame porte-objet en verre. Le ruban sert alors de lamelle couvre-objet (grossissement : x40 à x100).

Habituellement, plusieurs échantillons sont prélevés sur différentes zones de la peau. Cette méthode est particulièrement utile pour les *Cheyletiella* et les *Demodex* forme courte, car une plus grande surface peut être échantillonnée très rapidement.

Chez les Equidés, la méthode de la cellophane adhésive peut être utilisée pour détecter *Chorioptes equi*, *Dermanyssus gallinae* et les poux. Pour les *Demodex* vivant dans les follicules, la cellophane peut être appliquée sur la lésion choisie en alternative aux raclages cutanés profonds. La peau doit alors être pressée sous le ruban adhésif, puis celui-ci fixé sur une lame de verre.

3.5. Trichogramme

Un trichogramme est un examen microscopique de poils arrachés. Les poils arrachés positifs peuvent alors remplacer les raclages cutanés dans les zones difficiles à racler, telles que les paupières, la région périoculaire, le museau ou les espaces interdigitaux, ou lorsque les lésions sont très douloureuses. Des pinces plates sont utilisées pour arracher les poils en tirant dans le sens de la pousse. Si possible, la peau est pressée avant et pendant le prélèvement. Au moins 40 poils (idéalement entre 50 et 100) sont ensuite placés sur une lame porte objet avec de l'huile minérale, recouverts d'une lamelle, puis examinés au microscope à faible grossissement. En cas de suspicion d'infestation par *Demodex*, il est judicieux de commencer par un trichogramme : si des *Demodex* sont présents et attachés aux poils, il n'est alors plus nécessaire d'effectuer un raclage cutané.

3.6. Détection d'acariens dans le cérumen

Le prélèvement de cérumen chez les chiens et les chats donne souvent d'excellents résultats chez les animaux atteints par *Otodectes cynotis*. Les acariens présents dans le conduit auditif externe peuvent fréquemment être observés lors de l'examen à l'otoscope, et la présence abondante de débris de couleur brun foncé est typique. Ces débris peuvent être recueillis soit avec un coton-tige (lorsqu'ils sont cireux), soit avec une curette (lorsqu'ils sont secs et croûteux), puis examinés au microscope après avoir été écrasés à l'aide d'une lame de scalpel et mélangés à de l'huile minérale.

La même méthode peut être utilisée pour détecter *Psoroptes cuniculi* dans les conduits auditifs externes chez le lapin, bien que la quantité de débris produite lors d'une telle infestation puisse nécessiter une digestion à l'hydroxyde de potassium (KOH) ou au chloral lactophénol pour libérer les acariens.

3.7. Techniques de biologie moléculaire

Comme pour les parasites internes, dans les cas où la morphologie des arthropodes ne permet pas leur identification, des méthodes basées sur la détection de l'ADN peuvent être utilisées (voir 4.5.). Pour cette procédure, les arthropodes peuvent être conservés dans de l'alcool à 70% ou congelés en attendant d'être analysés.

4. DIVERS

4.1. Frottis sanguins

4.1.1. Informations générales

Des frottis peuvent être réalisés à partir de sang capillaire ou de sang veineux. Ils sont utilisés pour diagnostiquer de nombreuses parasitoses. Bien que la présence de parasites dans le sang soit rare, notamment dans les formes chroniques, la réalisation de frottis sanguins est rapide et peu coûteuse.

Matériel nécessaire :

- deux lames dégraissées
- du sang capillaire ou veineux (prélevé sur anticoagulant)

Mode opératoire :

1. Déposer une goutte de sang près de l'extrémité d'une lame.
2. Placer l'extrémité de l'autre lame sur la première de telle sorte que le bord de la lame soit juste à côté de la goutte de sang.
3. Tenir la deuxième lame à un angle de 30°.
4. Pousser la deuxième lame de telle sorte que le bord effleure à peine la goutte de sang ; par capillarité, un fin filet de sang s'étalera le long du bord de la lame.
5. Faire glisser rapidement la lame d'étalement sur toute la longueur de la première lame (le frottis doit se terminer par un bord arrondi).
6. Sécher à l'air libre et colorer.

Les lames rapidement séchées à l'air libre par agitation sont fixées dans du méthanol pendant 5 à 10 minutes, puis colorées par la méthode de May-Grünwald-Giemsa, voire des colorations rapides (de type Diff-Quick®). Il est à noter que les artefacts de coloration dus à des colorants mal conservés peuvent entraîner des résultats faussement positifs.

4.1.2. Agents pathogènes détectables dans le frottis sanguin

Piroplasmes

Certains protozoaires sont présents dans les érythrocytes. Le sang capillaire périphérique, prélevé au niveau du pavillon de l'oreille, de l'extrémité de la queue ou d'un concentré leucocytaire (voir 4.2.), permet d'observer un nombre plus élevé de cellules parasitées, ce qui permet un diagnostic dès la première consultation d'un animal malade. Dans les formes chroniques, la parasitémie est généralement faible. La taille des mérozoïtes dans les érythrocytes permet de distinguer les *Babesia* ou *Theileria* de grande taille (> 3 µm) et de petite taille (< 3 µm) (voir tableau 5). Cependant, les analyses biomoléculaires sont nécessaires pour une différenciation fiable, car les *Babesia* de grande taille peuvent parfois se présenter sous des formes atypiques de petite taille. Les différentes espèces de *Babesia* se distinguent principalement morphologiquement par le nombre de mérozoïtes, l'angle entre eux et leur position dans l'érythrocyte (voir tableau 5). L'anamnèse (séjour dans une zone enzootique, infestation par des tiques), les signes cliniques et le résultat d'autres analyses, comme des tests sérologiques ou des PCR (voir 4.5.), peuvent étayer le diagnostic.

Lors de l'importation de chevaux dans certains pays, des tests de dépistage de la piroplasmose sont réglementairement imposés.

Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des piroplasmes du chien, du chat et du cheval.

Pour plus d'informations concernant le pouvoir pathogène, les vecteurs et la répartition des piroplasmes, voir le guide de recommandations d'ESCCAP : Lutte contre les maladies à transmission vectorielle chez le chien et le chat.

Piroplasmes chez le chien			
	Taille (mérozoïtes)	Place dans l'érythrocyte	Disposition des mérozoïtes
<i>Babesia canis</i>	grande	centrale	suivant un angle aigu
<i>B. vogeli</i>	grande	centrale	suivant un angle aigu
<i>B. rossi</i>	grande	centrale	suivant un angle aigu
<i>B. gibsoni</i> et <i>gibsoni</i> -like	petite	centrale	-
<i>B. conradae</i>	petite	centrale	-
<i>B. vulpes</i> *	petite	centrale	-
Piroplasmes chez le chat			
<i>B. felis</i>	petite	centrale	en croix de Malte
<i>Babesia</i> spp.	grande	centrale	-
<i>Cytauxzoon</i> spp.	petite	variable	en forme de bâtonnet ou de virgule
Piroplasmes chez le cheval			
<i>B. caballi</i>	grande	centrale	En angle aigu
<i>Theileria equi</i>	petite	variable	Variable (1-4 mérozoïtes, aussi en croix de Malte)

* *Babesia vulpes* est synonyme de *Theileria/Babesia annae* et *Babesia microti*-like.

Hepatozoon spp.

Les espèces du genre *Hepatozoon* sont transmis lors de l'ingestion de tiques infectées. Dans le sud de l'Europe, *Hepatozoon canis* est un parasite fréquent chez les Canidés. *Hepatozoon americanum* est présent chez les Canidés aux États-Unis. *Hepatozoon felis* et *H. silvestris* sont des parasites peu fréquents chez les chats. L'espèce *H. canis* peut également être retrouvée chez les chats mais en de très rares occasions. Les gamontes des *Hepatozoon* se trouvent principalement dans les granulocytes neutrophiles, sous la forme de structures rectangulaires aux bords arrondis.

Larves (microfilaires) de *Dirofilaria* et d'autres filaires

Des microfilaires de filaires pathogènes (*D. immitis*, *D. repens*) et non pathogènes peuvent être mises en évidence dans les frottis sanguins et doivent donc être différenciées (voir 4.4.).

Rickettsies (Anaplasmataceae)

Ehrlichia est un genre de bactéries intracellulaires obligatoires, Gram négatif et transmises par des vecteurs. En Europe, *Ehrlichia canis* est l'agent responsable de l'éhrlichiose monocyttaire canine (EMC). Ce pathogène infecte principalement les monocytes où se développent les morulae, éléments typiques, mais rarement observées. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* est l'agent responsable de la néoehrlichiose canine. D'autres *Ehrlichia* (*E. chaffeensis*, *E. ewingii*) sont enzootiques dans les régions néotropicales et rarement identifiées en Europe. *Ehrlichia canis* ou une espèce étroitement apparentée a été décrite chez le chat, mais ne semble pas présenter un pouvoir pathogène important.

Anaplasma est un genre de bactéries intracellulaires obligatoires, Gram négatif, et transmises par des vecteurs. En Europe, l'espèce *A. platys* est rapportée chez le chien et *A. phagocytophilum* chez le chien, le chat, le cheval et d'autres animaux. Ces bactéries infectent les plaquettes (*A. platys*) ou principalement les granulocytes neutrophiles (*A. phagocytophilum*) et forment des morulae observables lors de la phase aiguë de l'infection.

Mycoplasma (syn. *Haemobartonella*) est un groupe de petites bactéries Gram négatives qui se fixent à la surface des érythrocytes, par exemple *Mycoplasma haemocanis* et *M. haemofelis*, respectivement chez le chien et le chat. D'autres espèces moins pathogènes ont été décrites, principalement chez le chat : *Candidatus Mycoplasma haemominutum* et *Candidatus Mycoplasma turicensis*, mais aussi chez le chien : *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. Les tests PCR facilitent la détection et permettent la différenciation.

4.2. Concentré leucocytaire

Un tube à micro-hématocrite est rempli de sang avec anticoagulant, scellé à une extrémité et centrifugé pendant 5 minutes. Les trypanosomes et les microfilaires s'accumulent dans la zone située entre la couche leuco-plaquettaire et le plasma. Les leucocytes doivent être concentrés pour la détection d'*Anaplasma phagocytophilum*, des *Ehrlichia* ou des *Hepatozoon*. Comme les *Babesia* infectent les réticulocytes plutôt que les érythrocytes matures, leur détection est facilitée dans la couche leuco-plaquettaire. Pour l'examen microscopique, il faut scier (à l'aide d'une petite lime pour ampoules ou en utilisant une pointe de diamant) entre le culot d'hématies et le concentré leucocytaire pour ensuite l'étaler sur une lame de verre dégraissée comme pour un frottis sanguin.

4.3. Ponction à l'aiguille fine

4.3.1. Informations générales

Certains protozoaires et bactéries vectorisées sont des parasites intracellulaires obligatoires des lymphocytes, monocytes ou macrophages. Ainsi, l'aspiration de tissus hématopoïétiques (par exemple, nœuds lymphatiques, moelle osseuse, rate) peut-elle être requise pour leur identification morphologique sur frottis et/ou pour le prélèvement de matériel destiné à des analyses biomoléculaires (voir 4.5). Les ponctions à l'aiguille fine d'organes internes, par exemple le foie, peuvent également être utilisées pour le diagnostic de l'infestation par des échinocoques (échinococcose alvéolaire ou kystique). Pour la rate, l'aspiration doit être réalisée sans pression négative afin d'éviter tout saignement.

Matériel

- Seringue de 15 mL
- aiguille fine de 22–20 g
- lames en verre

Mode opératoire

1. Insérer l'aiguille dans le tissu et créer une pression négative dans la seringue en tirant sur le piston jusqu'à obtenir un volume de 5 à 10 ml.
2. Maintenir cette pression négative et orienter l'aiguille dans plusieurs directions sans retirer la pointe du tissu.
3. Relâcher le piston de la seringue et retirer l'aiguille du tissu (ne pas retirer l'aiguille du tissu sans relâcher le piston, car tout le matériel collecté sera aspiré dans la seringue).
4. Déconnecter la seringue de l'aiguille et la remplir d'air.
5. Reconnecter la seringue à l'aiguille et utiliser l'air pour projeter l'échantillon hors de l'aiguille sur une ou plusieurs lames de verre.
6. Étaler, sécher et colorer comme pour un frottis sanguin (voir 4.1.).

4.3.2. Agents pathogènes détectables dans les produits d'aspiration à l'aiguille fine

Leishmania infantum

Les ponctions ganglionnaires, notamment chez les animaux atteints d'adénopathie, sont plus pratiques, alors que les prélèvements de moelle osseuse ou de rate sont plus invasifs, mais peuvent être indiqués chez les chiens infectés mais cliniquement sains.

Les amastigotes, présentant une structure typique en « T » (noyau/kinétoplaste), sont visibles dans le cytoplasme des monocytes/macrophages et peuvent également être observés librement dans le matériel étalé.

En cas de boiterie, les amastigotes peuvent être observés dans des ponctions à l'aiguille fine de liquide synovial.

Les ponctions de lésions cutanées constituent également un moyen efficace de détecter une infection par la mise en évidence des amastigotes de *L. infantum* dans les macrophages.

Ehrlichia canis

La sensibilité de la détection microscopique est plus élevée dans les biopsies à l'aiguille fine des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse ou de la rate ou dans le concentré leucocytaire par rapport au frottis sanguin. Cependant la détection d'ADN par PCR est la méthode actuellement recommandée pour le diagnostic.

4.4. Détection et identification des microfilaires

4.4.1. Informations générales

Chez les carnivores domestiques, le diagnostic de l'infestation par des filaires peut être obtenu par l'isolement et l'identification des microfilaires circulantes. Les échantillons sanguins doivent être analysés après concentration par la méthode de Knott ou par une méthode de filtration (à l'aide de kits commerciaux). L'observation directe d'une goutte sang entre lame et lamelle ne permet pas l'identification de l'espèce et présente une très faible sensibilité.

Il est important de souligner que le nombre de microfilaires circulantes n'est pas nécessairement corrélé au nombre de filaires adultes. Ainsi, des chiens fortement microfilarémiques peuvent héberger peu de filaires adultes. De plus, le moment du prélèvement sanguin peut influencer la sensibilité de détection des microfilaires : pour *D. repens* et *D. immitis*, une microfilarémie plus élevée est décrite pendant la nuit.

Les microfilaires peuvent être différenciées par des mesures morphométriques, par coloration à la phosphatase acide ou, surtout en cas de doute, par des méthodes biomoléculaires permettant la diagnose des espèces à partir du sang et une fois les microfilaires concentrées par centrifugation. L'identification morphologique des microfilaires circulantes présente certaines limites. Les différentes méthodes de fixation peuvent modifier la taille des larves. La coloration phosphatase acide peut ne pas fonctionner et il existe des cas de co-infestation par différentes espèces de filaires. Les tests PCR spécifiques pour chaque filaire demeurent la référence pour la diagnose d'espèce.

Enfin, même si l'infestation par *D. immitis* peut être diagnostiquée de manière fiable par sérologie, il est toujours recommandé de rechercher la présence de microfilaires circulantes.

Chez les chats amicrofilarémiques ou négatifs à la détection d'antigènes mais présentant des signes cliniques compatibles avec une dirofilariose cardiopulmonaire, la détection d'anticorps est une alternative pour démontrer l'infestation.

4.4.2. Test de Knott

Cette méthode concentre par centrifugation toutes les microfilaires présentes dans 1 ml de sang prélevé sur EDTA. Les microfilaires sont ensuite colorées au bleu de méthylène.

Les étapes de cette méthode sont les suivantes : 1 ml de sang prélevé sur EDTA est dilué dans 9 ml de formol à 2 %. La solution est agitée pendant plusieurs minutes puis centrifugée à 400 g pendant 5 minutes. Après retrait du surnageant, le sédiment est coloré avec une goutte de bleu de méthylène à 1 % pour l'examen direct ou soumis à la coloration par la phosphatase acide, bien que la méthode habituelle pour l'identification des microfilaires soit actuellement biomoléculaire (voir 4.4.1.). Les lames sont examinées à un grossissement de 40x pour la présence de larves et à un grossissement de 100x pour l'examen des caractéristiques morphologiques. Pour une sensibilité maximale, l'ensemble du sédiment doit être analysé.

4.4.3. Test de Knott modifié

Les microfilaires vivantes peuvent être détectées plus rapidement par leur mouvement en utilisant une méthode de Knott modifiée. Pour cela, quatre gouttes d'une solution de saponine à 2 % et 5 ml d'eau distillée sont ajoutées à 1 ml de sang prélevé sur EDTA pour détruire les érythrocytes. La suspension peut être examinée au microscope, comme indiqué précédemment. Les larves vivantes sont mobiles et peuvent être facilement détectées (grossissement 40x).

4.4.4. Méthode de filtration (Difil-Test®)

Ce kit commercial concentre les microfilaires à partir de 1 ml de sang prélevé sur EDTA sur un filtre dont la surface est de la taille d'une petite lamelle. Grâce à cette méthode, les microfilaires ont tendance à être droites plutôt qu'en spirale ou ondulées.

Le kit comprend la solution de lyse, le colorant, les filtres et une cartouche. Le mode opératoire est le suivant :

- Le filtre est placé à la base de la cartouche de filtration et celle-ci est assemblée.
- 1 ml de sang est ajouté à 9 ml de solution de lyse dans une grande seringue et mélangé.
La solution de sang hémolysé est filtrée en fixant le filtre à l'orifice de la cartouche.
- Le filtre est rincé en introduisant un volume égal d'eau à travers l'orifice de la cartouche.
- La cartouche est ouverte, le filtre est retiré et placé sur une lame en verre.
- Une goutte de colorant, fourni dans le kit, est déposée sur le filtre.
- Une lamelle est placée sur le filtre pour disperser le colorant et la lame est prête à être observée.

4.4.5. Coloration phosphatase acide

Plusieurs caractéristiques permettent de différencier les microfilaires de *D. immitis* de celles de *D. repens* (et des filaires non pathogènes). Ceci est particulièrement important dans les zones où *D. immitis* et *D. repens* co-existent (voir le guide de recommandations d'ESCCAP : Lutte contre les maladies à transmission vectorielle chez le chien et le chat).

Les microfilaires des différentes espèces de filaires se distinguent par leurs profils de coloration à la phosphatase acide (voir Tableau 6) :

- Les microfilaires de *D. immitis* présentent deux taches colorées (pores excréteur et anal).
- Les microfilaires de *D. repens* ne présentent qu'une seule tache colorée (pore anal).
- Les microfilaires d'*Acanthocheilonema dracunculoides* présentent trois zones d'activité enzymatique (pore anal, corps interne et pore excréteur).
- Les microfilaires d'*A. reconditum* présentent un motif rouge clair diffus.

Il existe des kits commerciaux utilisables en laboratoire. Cependant, les méthodes de coloration sont progressivement remplacées par les méthodes biomoléculaires.

4.4.6. Taille des microfilaires

La mesure des microfilaires peut aider à les différencier : pour cela, la longueur moyenne doit être établie à partir de 10 larves (voir également le guide de recommandations d'ESCCAP : Lutte contre les maladies à transmission vectorielle chez le chien et le chat). Il convient de noter que la préparation (en particulier la méthode de fixation) peut modifier considérablement la longueur et les caractéristiques des microfilaires.

Tableau 6 : Caractéristiques morphologiques des microfilaires

Espèces	Longueur (µm)	Largeur (µm)	Caractéristiques
<i>Dirofilaria immitis</i>	301,77 ± 6,29 290–330	5–7	Absence de gaine, extrémité céphalique pointue, queue droite avec l'extrémité pointue. Ph-A : deux taches colorées situées autour des pores anal et excréteur
<i>D. repens</i>	369,44 ± 10,76 300–370	6–8	Absence de gaine, extrémité céphalique arrondie, queue pointue et filiforme se terminant souvent en crosse. Ph-A : une tache colorée autour du pore anal.
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	264,83 ± 5,47 260–283	4	Absence de gaine, extrémité céphalique arrondie avec un crochet céphalique proéminent, bouton de la queue crochu et courbé. Ph-A : coloration de toute la larve.
<i>A. dracunculoides</i>	259,43 ± 6,69 190–247	4–6,5	Présence d'une gaine, extrémité céphalique arrondie, extrémité caudale pointue et allongée. Ph-A : trois taches colorées, dont une supplémentaire au milieu de la larve.

¹ Microfilaires (n=10) mesurées après concentration par la méthode de Knott ; lors de l'utilisation du test Difil®, les longueurs sont plus courtes. Ph-A : coloration phosphatase acide.

4.5. Détection et identification biomoléculaires : la polymérisation en chaîne (PCR) et l'amplification isotherme (LAMP)

4.5.1. Informations générales

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode de plus en plus populaire et performante pour le diagnostic de nombreuses affections. Spécifique et, selon le substrat testé et le stade de l'infection, très sensible, elle peut aider le praticien à diagnostiquer une infection active lorsque des signes cliniques sont évocateurs. Elle est indiquée pour les agents pathogènes et les parasites à transmission vectorielle pour lesquels la mise en évidence directe et l'identification sont souvent difficiles.

Si les tests PCR sont utilisés à des fins de diagnostic et non d'identification, la sensibilité dépendra, entre autres facteurs, du nombre de copies du gène cible.

Les tests PCR sont réalisés uniquement dans des laboratoires spécialisés. L'exactitude des résultats dépend du recueil, de la conservation et de l'envoi corrects des échantillons. L'utilisation de deux protocoles de PCR différents peut accroître la sensibilité et la spécificité.

Les recommandations générales incluent :

- La PCR étant très sensible, la contamination des échantillons doit être évitée. Dans la mesure du possible, les échantillons doivent être prélevés et conservés dans du matériel à usage unique.
- Les échantillons doivent être conservés au réfrigérateur (+4°C) et expédiés avec des blocs réfrigérants ou congelés en continu à -20°C ou moins.
- Les échantillons doivent parvenir au laboratoire au plus tard 3 jours après le prélèvement.

L'amplification isotherme (LAMP) est une technique simple et de faible coût. Des tests LAMP sont déjà utilisés par les vétérinaires cliniciens pour détecter certains agents pathogènes, que ce soit comme simple test de dépistage sur le terrain ou au chevet du patient. Des réactifs sont disponibles dans le commerce auprès de certaines entreprises. Contrairement à la PCR, où la réaction s'effectue par une série de cycles de température alternés, l'amplification isotherme est réalisée à température constante et ne nécessite pas de thermocycleur. Il a été observé que la présence d'inhibiteurs d'amplification dans des échantillons complexes tels que le sang ou les matières fécales, a un effet plus limité sur la méthode LAMP que sur la PCR probablement en raison de l'utilisation d'une ADN polymérase différente (généralement l'ADN polymérase Bst issue de *Bacillus stearothermophilus* pour les tests LAMP versus la Taq polymérase dans les tests PCR).

L'extraction d'ADN peut être réalisée à partir de tout type de substrat biologique, mais le sang et les ponctions de tissus sont les échantillons les plus fréquemment analysés.

Sang :

La présence de plusieurs agents pathogènes à transmission vectorielle, tels qu'*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* et *Babesia* spp., peut être mise en évidence par l'identification de leur ADN dans le sang périphérique. La PCR a également été utilisée pour détecter et différencier les espèces de filaires qui libèrent des microfilaries dans la circulation sanguine.

Il existe de nombreux protocoles de PCR pour le sang, et chaque laboratoire possède le sien (y compris le meilleur anticoagulant à utiliser). La plupart privilégie l'EDTA, mais il est préférable de se renseigner auprès du laboratoire. Un volume de 0,5 à 1 ml de sang suffit généralement.

Ponctions de tissus :

Leishmania infantum et *Ehrlichia* spp. sont présents dans les organes lymphoïdes et les ponctions à l'aiguille fine peuvent être utilisées pour des tests PCR. Des biopsies cutanées peuvent également être réalisées pour les tests PCR de *L. infantum*. Après ponction, le produit d'aspiration peut être déposé sur un papier filtre ou un coton-tige, qui peut ensuite être conservé dans un tube à essai stérile à +4°C. L'examen direct après étalement sur une lame en verre est moins sensible que la PCR.

Parasites :

Il peut arriver que l'identification moléculaire de parasites (helminthes, arthropodes) soit nécessaire. Pour cela, ils doivent être conservés dans de l'éthanol à 70 % et expédiés dans des contenants hermétiques.

Matières fécales :

Les échantillons fécaux sont également utilisés pour la détection et l'identification moléculaires des parasites. À titre d'exemple, la recherche d'ADN de *Tritrichomonas foetus* dans les fèces de chats est actuellement recommandée plutôt que la coproculture (voir 1.2.13.). La biologie moléculaire est actuellement utilisée pour la détection d'*E. multilocularis*, de différentes coccidies (*Toxoplasma/Hammondia*), de *Cryptosporidium* spp. et *Giardia duodenalis* dans les matières fécales.

Pour les parasites nécessitant une différenciation des espèces ou des génotypes, impossible à réaliser morphologiquement, par exemple pour *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., les oocystes de *Toxoplasma/Hammondia*, les œufs d'Ascaridés ou de Taeniidés, le génotypage (à partir des fèces ou des parasites isolés) peut être utile. Dans certains cas où le nombre de stades parasitaires est faible, ou lorsque l'extraction d'ADN est difficile (par exemple, pour les œufs de Taeniidés ou d'Ascaridés, voir ci-dessous), il est préférable de concentrer au préalable les stades parasitaires dans les fèces. À titre d'exemple, la méthode de flottation et de tamisage séquentiel peut être utilisée (voir ci-dessous).

Flottation et tamisage séquentiel :

Les œufs d'helminthes peuvent être concentrés à partir d'échantillons fécaux en combinant une flottation dans une solution de chlorure de zinc suivie d'un tamisage séquentiel à l'aide de tamis à mailles décroissantes (21–200 µm). Ainsi, en utilisant la maille appropriée du dernier tamis, les œufs (en particulier les œufs de Taeniidés et les œufs de *Toxocara* pour la différenciation) peuvent être concentrés, permettant, par exemple l'isolement de l'ADN.

4.5.2. Informations spécifiques

En principe, l'ADN de tous les parasites d'intérêt vétérinaire peut être détecté par PCR ou d'autres méthodes moléculaires. Plusieurs appareils permettant la détection automatisée et simultanée d'agents pathogènes sont déjà commercialisées, mais ne sont pas validées en médecine vétérinaire.

Selon le parasite, les options suivantes peuvent être disponibles :

- le recours à des amorces spécifiques amplifiant uniquement le genre et/ou l'espèce ciblés ;
- une PCR multiplex combinant différentes amorces (spécifiques) ;
- une PCR traditionnelle ou en temps réel ; et
- une méthode LAMP.

Lorsqu'un produit de PCR est obtenu, il peut être identifié en fonction de sa taille par électrophorèse sur gel (avec ou sans fragmentation préalable par des enzymes de restriction), ou par séquençage des séquences nucléotidiques et comparaison avec les séquences déjà disponibles dans une banque de données.

Interprétation :

Tous les résultats de PCR doivent être interprétés au regard des signes cliniques et des résultats des autres examens complémentaires.

Voici quelques exemples, sans prétention d'exhaustivité :

Protozoaires

Leishmania infantum

La PCR peut être utilisée à la fois pour le diagnostic de l'infection et pour le suivi des chiens traités. Plusieurs laboratoires proposent également des PCR en temps réel qui peuvent indiquer la quantité de parasites et l'augmentation/diminution de la charge parasitaire. Ces tests sont également utiles pour suivre la réponse au traitement.

Bien que les prélèvements tissulaires (ganglions lymphatiques, rate, moelle osseuse) ou cutanés soient les échantillons de choix pour la recherche de *L. infantum*, les laboratoires effectuent également des analyses sanguines. Des faux négatifs suscitent des inquiétudes en raison de la faible sensibilité, bien que la sensibilité des PCR en temps réel ciblant les gènes multicopies semble satisfaisante. Des prélèvements non invasifs, comme les écouvillons conjonctivaux, sont désormais également recommandés. Pour cela, les deux yeux doivent être prélevés et les échantillons doivent contenir un nombre suffisant de cellules.

Babesia spp.

La sensibilité de la PCR s'est avérée supérieure à celle du frottis sanguin, notamment pour des chiens avec une infection chronique. Cependant, des résultats faussement négatifs ne peuvent être exclus. L'identification des espèces et des sous-espèces peut être importante pour les options thérapeutiques (*Babesia* de grande ou de petite taille) et le pronostic.

Toxoplasma gondii

Les oocystes de *Toxoplasma gondii* excrétés par les chats sont difficilement différenciables morphologiquement de ceux de *Hammondia hammondi*. Parallèlement aux tests sérologiques permettant la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum de chats ou d'hôtes intermédiaires, la PCR peut être réalisée à partir d'oocystes ou pour l'identification de kystes à bradyzoïtes de *T. gondii* dans les muscles. Pour des chiens ou des chats présentant des troubles neurologiques compatibles avec la toxoplasmose, des tests PCR à partir du liquide céphalorachidien ou de l'humeur aqueuse peuvent être réalisés.

Neospora caninum

Les oocystes de *N. caninum* sont excrétés pendant une très courte période et en faible quantité dans les matières fécales des chiens. Comme pour *T. gondii*/*H. hammondi*, les oocystes de *N. caninum* sont difficilement différenciables de ceux d'*Hammondia heydorni* (présents dans les fèces de chiens ou de renards). Il peut également y avoir un risque de confusion avec les oocystes de *T. gondii*/*H. hammondi* en cas d'ingestion de fèces de chats. Par conséquent, une analyse moléculaire est indiquée pour l'identification de *N. caninum*.

Chez les chiens présentant des signes cliniques évocateurs de néosporose, une analyse sérologique ainsi que des tests PCR à partir de biopsies musculaires ou du liquide céphalo-rachidien permettent de confirmer le diagnostic.

Giardia duodenalis

Les tests classiques de dépistage de l'infection par *Giardia duodenalis* ne permettent pas une caractérisation précise du parasite. Si, pour clarifier le potentiel zoonotique, il est nécessaire de déterminer l'assemblage génétique, une PCR multilocus et un séquençage peuvent être réalisés.

Tritrichomonas foetus

Les tests PCR, permettant de distinguer *T. foetus* dans les fèces de chat des autres Trichomonadidés, permettent d'obtenir un résultat fiable et rapide comparativement à la mise en culture (InPouch™, voir 1.2.13.).

Bactéries vectorisées

Bartonella

Bien que l'hémoculture soit la méthode de référence pour le diagnostic de la bartonellose, cette méthode peut être longue et coûteuse. Il est également possible de détecter l'ADN des bartonelles dans le sang, les tissus, le liquide céphalorachidien ou l'humeur aqueuse. L'association d'une culture d'enrichissement suivie d'une amplification par PCR permet d'augmenter la sensibilité.

Ehrlichia/Anaplasma

Un test PCR positif confirme généralement la présence d'une infection par ces bactéries transmises par les tiques. Cependant, un test PCR négatif n'exclut pas la présence d'une infection.

Pour les bactéries du genre *Ehrlichia*, la sensibilité de la PCR semble supérieure lorsque le test est réalisé à partir de ponctions de nœuds lymphatiques, de rate, ou de moelle osseuse ou à partir du concentré leucocytaire.

Helminthes

Oufs de Taeniidés

Dans les zones d'enzootie d'échinococcose, il est recommandé de différencier les œufs d'*Echinococcus* spp. des autres Taeniidés afin de clarifier le potentiel de transmission zoonotique. Les œufs peuvent être isolés par flottation, par la méthode du ruban adhésif de la zone périnéale ou par flottation et tamisage séquentiel des fèces, sous réserve du respect des règles de biosécurité (dans des laboratoires spécialisés). La PCR est réalisée avec des amorces spécifiques, par une méthode multiplex ciblant différentes espèces de Taeniidés, ou par une méthode incluant tous les helminthes, suivie d'un séquençage.

Toxocara spp.

Il a été démontré qu'environ un tiers des chiens présentant une coproscopie positive pour *Toxocara* excrète des œufs de *Toxocara cati* (suite à un comportement de coprophagie). Ces œufs peuvent être différenciés de ceux de *T. canis* par leur taille ou, de manière plus fiable, par un test PCR.

Strongles respiratoires

Aelurostrongylus abstrusus est le strongle respiratoire du chat le plus fréquent. Cependant, dans certains pays, d'autres strongles, tels que *Troglostrongylus* spp. et *Oslerus rostratus* sont présents. Une expertise est alors requise pour différencier morphologiquement les larves L1. Une solution consiste à réaliser un test PCR à partir des L1 isolées des fèces, ou à partir d'écouvillons trachéaux ou d'un lavage bronchoalvéolaire (avec une sensibilité plus faible).

Les larves L1 des strongles respiratoires les plus fréquents chez le chien, *Angiostrongylus vasorum* et *Crenosoma vulpis*, sont facilement différenciées morphologiquement. Cependant, dans certains cas isolés, il peut être utile d'utiliser un test PCR pour confirmation.

Capillaires

Les chiens, les chats et d'autres mammifères peuvent héberger des espèces de capillaires, dont les cycles évolutifs diffèrent. Leur classification n'est pas encore clairement définie mais les analyses PCR peuvent aider à leur identification.

Filaires

L'analyse PCR spécifique et en temps réel à partir de sang prélevé sur EDTA est la méthode de choix pour la différenciation des espèces de microfilaires (voir 4.4.1.). L'analyse morphologique et la coloration à la phosphatase acide peuvent aussi être utilisées.

Helminthes non identifiables morphologiquement

Une analyse PCR peut être réalisée à partir d'helminthes non identifiables morphologiquement, à partir de coupes histologiques ou de raclages cutanés.

Arthropodes

Dans les cas où l'examen morphologique d'un arthropode ne permet pas son identification, des tests PCR peuvent être utilisés.

Dermatophytes

Des tests PCR en temps réel sont disponibles pour la détection des dermatophytes du genre *Microsporum* ou *Trichophyton*, ainsi que la détection spécifique de *M. canis*. Ces tests offrent une sensibilité et une spécificité élevées. Des prélèvements cutanés et/ou des poils doivent être prélevés et envoyés au laboratoire. Les résultats sont disponibles en quelques jours.

4.6. DÉTECTION DES DERMATOPHYTES

4.6.1. Informations générales

Le diagnostic des dermatophytoses repose sur une combinaison de tests complémentaires, dont la lampe de Wood (pour les chiens et les chats uniquement), l'examen direct de raclages cutanés et la culture mycologique pour identifier le dermatophyte impliqué et surveiller la réponse au traitement. Pour les formes nodulaires ou atypiques, une biopsie cutanée peut être indiquée. La détection des dermatophytes par PCR est désormais possible chez les chiens et les chats en Europe (voir 4.5.2.).

4.6.2. Examen direct des poils

La mise en évidence de poils teigneux est une des premières étapes du diagnostic des dermatophytoses. La qualité du prélèvement et l'expertise de l'examineur influencent fortement la sensibilité de cet examen. Avec un trichogramme, le risque d'un résultat faussement négatif ne peut être exclu (voir 3.5.). Une solution de soude (KOH) ou de l'huile minérale, avec ou sans ajout de colorants (bleu de coton lactophénol, par exemple), peuvent être utilisées pour mieux détecter les éléments fongiques. Les poils infectés par des dermatophytes se présentent généralement sous forme de structures irrégulières d'aspect fibreux. Typiquement, la surface du poil présente des amas ou des chaînes de spores fongiques (appelées arthroconidies) (d'un diamètre de 2 à 4 µm pour *Microsporum canis*).

4.6.3. Examen à la lampe de Wood

L'examen du pelage à la lampe de Wood est une méthode de dépistage de l'infection par *M. canis* chez le chien et le chat. Exposés à la lumière ultraviolette émise par la lampe, les poils infectés par certaines espèces de dermatophytes, plus particulièrement *M. canis*, prennent une couleur verte fluorescente. Les poils infectés par d'autres espèces de dermatophytes ne sont jamais fluorescents et certains médicaments topiques peuvent masquer la fluorescence. Ainsi, un résultat négatif à la lampe de Wood n'exclut-il pas une dermatophytose. L'observation de la fluorescence doit être confirmée par un examen microscopique des poils (même si la reconnaissance des poils infectés n'est pas toujours aisée et peut nécessiter un œil expérimenté) (voir 4.6.2.).

4.6.4. Culture mycologique

La culture mycologique reste la méthode la plus fiable pour confirmer une dermatophytose chez le chien et le chat. Le prélèvement peut se faire par raclage cutané, prélèvement de poils (sous lampe de Wood) ou brossage du pelage avec une brosse à dents stérile, un carré de moquette stérile ou une compresse. Plusieurs milieux (comme la gélose de Sabouraud) conviennent pour les cultures mycologiques. Des colonies de dermatophytes peuvent se développer en quelques jours. Les milieux de culture de type DTM (Dermatophyte test medium) sont régulièrement utilisés en médecine vétérinaire. Cependant, très peu d'études ont été réalisées pour évaluer la performance de ce type de milieu avec des échantillons prélevés sur des animaux. Ainsi, l'utilisation d'un milieu DTM, sans identification microscopique des colonies fongiques, n'est pas recommandée pour le diagnostic des dermatophytoses animales. Idéalement, le matériel prélevé sur les animaux devrait être envoyé à un laboratoire spécialisé en mycologie vétérinaire. Au laboratoire, l'identification spécifique est réalisée par l'examen microscopique des colonies fongiques. Le nombre de colonies peut aider à distinguer les porteurs mécaniques des animaux infectés. Le transport mécanique est dû à la contamination de l'environnement et est généralement associé à un nombre limité de colonies de dermatophytes en culture. L'infection entraîne une production massive de spores fongiques (arthroconidies) et est généralement associée à un nombre très élevé de colonies de dermatophytes en culture.

ANNEXE 1 – CONTEXTE

L'ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites) est une organisation indépendante à but non lucratif qui élabore des lignes directrices et promeut les bonnes pratiques en matière de contrôle et de traitement des parasites chez les animaux de compagnie. Grâce à des conseils avisés, le risque de transmission de maladies et de parasites entre les animaux et les humains peut être réduit au minimum. L'ESCCAP aspire à voir une Europe où les parasites des animaux de compagnie ne menacent plus la santé et le bien-être des animaux et des humains.

Il existe une grande diversité des parasites, mais leur importance est variable en fonction des régions en Europe. Les directives de l'ESCCAP résument et soulignent les différences importantes qui existent dans différentes régions d'Europe et, si nécessaire, préconisent des mesures de contrôle spécifiques.

L'ESCCAP estime que :

- Les vétérinaires et les propriétaires d'animaux de compagnie doivent prendre des mesures pour protéger leurs animaux contre les parasitoses.
- Les vétérinaires et les propriétaires d'animaux de compagnie doivent prendre des mesures pour protéger la population animale contre les risques liés aux voyages et leur potentiel à modifier la situation épidémiologique locale en matière de parasites par l'exportation ou l'importation d'espèces parasitaires non endémiques.
- Les vétérinaires, les propriétaires d'animaux de compagnie et les médecins doivent travailler ensemble pour réduire les risques liés à la transmission zoonotique des maladies parasitaires.
- Les vétérinaires doivent être en mesure de conseiller les propriétaires d'animaux de compagnie sur les risques d'infection parasitaire et les maladies, ainsi que sur les mesures à prendre pour minimiser ces risques.
- Les vétérinaires doivent s'efforcer d'éduquer les propriétaires d'animaux de compagnie sur les parasites afin de leur permettre d'agir de manière responsable non seulement pour la santé de leur propre animal, mais aussi pour celle des autres animaux de compagnie et des personnes de leur entourage.
- Les vétérinaires doivent, lorsque cela est approprié, effectuer des tests diagnostiques afin de déterminer le statut infectieux des parasites et de fournir les meilleurs conseils possibles.

Pour atteindre ces objectifs, l'ESCCAP produit :

- Des directives détaillées à l'intention des vétérinaires et des parasitologues vétérinaires.
- Des traductions, des extraits, des adaptations et des versions résumées des directives qui répondent aux diverses exigences des pays et régions européens.

Les différentes versions de chaque directive sont disponibles sur le site www.esccap.org.

Avertissement :

Tout a été mis en œuvre pour garantir l'exactitude des informations contenues dans ces recommandations, qui reposent sur l'expérience des auteurs. Cependant, les auteurs et les éditeurs déclinent toute responsabilité quant aux conséquences pouvant découler d'une mauvaise interprétation des informations contenues dans le présent document, et aucune condition ou garantie n'est implicite. L'ESCCAP souligne que les réglementations nationales, régionales et locales doivent être prises en compte à tout moment avant de suivre les conseils de l'ESCCAP.

ANNEXE 2 – GLOSSAIRE, ABRÉVIATIONS ET LIENS UTILES

GLOSSAIRE

Sensibilité	Le taux d'échantillons véritablement positifs (tel qu'évalué par un test de "référence" ou "Gold Standard") ou la probabilité qu'un animal infecté / infesté soit détecté comme positif par le test.
Sensibilité [%]	$\frac{\text{Échantillons vrais positifs}}{(\text{Échantillons vrais positifs} + \text{Échantillons faux négatifs})} \times 100$
Spécificité	Le taux d'échantillons véritablement négatifs (tel qu'évalué par un test de "référence" ou "Gold Standard") ou la probabilité qu'un animal non infecté/infesté soit détecté comme négatif par le test.
Spécificité [%]	$\frac{\text{Échantillons vrais négatifs}}{(\text{Échantillons vrais négatifs} + \text{Échantillons faux positifs})} \times 100.$
Méthodes de détection directes	Détecter la présence du pathogène lui-même, soit par visualisation (par exemple, par microscopie), soit par détection de matériel génétique (par exemple, PCR ou LAMP), soit par détection de molécules spécifiques au parasite en question (par exemple, antigène, généralement composé de protéines sous différentes formes).
Méthodes de détection indirectes	Les méthodes sérologiques déterminent un contact antérieur avec les parasites par la détection d'anticorps spécifiques induits par l'infection. Comme les anticorps sont généralement produits un certain temps après l'infection initiale et persistent après la disparition du parasite, leur présence n'indique pas nécessairement une infection active. La détection des anticorps peut être réalisée selon différents formats, par exemple par Western blot, par des tests d'immunofluorescence directe ou indirecte, par de l'ELISA, par des tests rapides à flux latéral, et autres. La détection s'effectue à l'aide d'anticorps secondaires marqués. Beaucoup de ces tests, mais pas tous, permettent une quantification du taux d'anticorps (titres), par exemple pour des études de suivi de l'évolution de la maladie ou du traitement.

ABREVIATIONS

DTM	Dermatophyte test medium
EIA	Essai immunoenzymatique
ELISA	Test d'immunoabsorption par enzyme liée
EMC	Ehrlichiose monocyttaire canine
IFI	Test d'immunofluorescence indirecte
KOH	Solution d'hydroxide de potassium
L1	Larve de premier stade
L3	Larve de troisième stade
LAMP	Amplification isotherme
LPG	Larves par gramme
MIFC	Concentration au merthiolate-iode-formaldéhyde
OPG	Œufs ou oocystes par gramme
PCR	Polymérisation en chaîne
SAF	Solution d'acétate de sodium acétate-acide acétique-formaldéhyde
SAFC	Sédimentation formol-acide acétique-acétate de sodium
TIC	Test immunochromatographique sur bandelette
TID	Test d'immunofluorescence directe
TREF	Test de réduction d'excrétion fécale

LIENS UTILES

Comment mesurer avec un microscope :

www.youtube.com/watch?v=CkcYrns-6I
www.youtube.com/watch?v=eu9OrNM_wY
www.youtube.com/watch?v=GdRLPAo_j1Y
parasitology.cvm.ncsu.edu/vmp930/m_keys.html

La méthode de McMaster modifiée de comptage d'œufs

youtu.be/rkSGe-L4Sec

Des images des différents stades de parasites peuvent être trouvées aux pages suivantes :

www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html

www.ksvdl.org/resources/news/diagnostic_insights_for_technicians/august2019/common-intestinal-parasites-pt1.html

www.ncvetp.org/parasite-image-database.html

quizlet.com/64375340/parasites-in-veterinary-medicine-flash-cards/



ISBN: 978-1-913757-81-6

Secrétariat d'ESCCAP
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,
Worcestershire, WR14 3SZ, Royaume Uni

0044 (0) 1684 585135
info@esccap.org
www.esccap.fr



4

Diagnostic parasitaire chez les chats, les chiens et les chevaux