

Université de Montréal

Prévalence d'excrétion de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les humains, les animaux domestiques et les lémuriens de l'écosystème du Parc National de Ranomafana, Madagascar

par Fidisoa Rasambainarivo

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires option épidémiologie

Mars, 2013

© Fidisoa Rasambainarivo, 2013

Résumé

L'augmentation des interactions entre humains et animaux sauvages en lisière des habitats naturels pourrait faciliter la transmission d'agents pathogènes entre les humains et les différentes espèces animales d'un écosystème et ainsi favoriser l'émergence de maladies. Nous avons effectué une étude transversale portant sur l'infection par *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les humains, les animaux domestiques, les rongeurs et les lémuriens au sein de l'écosystème de Ranomafana, Madagascar. Des échantillons de fèces ont été collectés de manière non invasive chez des personnes volontaires, des mammifères domestiques et des rongeurs introduits habitant trois villages situés en lisière du Parc National de Ranomafana (PNR) ainsi que quatre espèces de lémuriens (*Propithecus edwardsii*, *Prolemur simus*, *Eulemur rubriventer* et *Microcebus rufus*) du PNR. Des analyses coproscopiques par la technique d'immunofluorescence directe ont été réalisées afin de détecter la présence de *Cryptosporidium* et *Giardia*. Leur prévalence a été estimée et certaines variables reliées à l'infection par les parasites ont été identifiées. *Cryptosporidium* et *Giardia* ont été détectés avec une prévalence estimée à 22,9 % et 13,6 % respectivement chez les humains. La prévalence de ces deux parasites variait de 0 % à 60 % chez les animaux domestiques et les rongeurs au sein des villages. L'espèce hôte, l'âge ainsi que la co-infection par un autre protozoaire sont les seules variables associées à l'infection par *Cryptosporidium* et *Giardia* dans cet écosystème tandis qu'aucune association avec une coinfection par un ordre de nématode n'a été détecté. De plus, *Cryptosporidium* a été détecté chez 10,5 % des lémuriens du PNR. Cette étude documente pour la première fois la présence de *Cryptosporidium* chez deux espèces de lémuriens du PNR. Par contre, *Giardia* n'a pas été détecté dans les échantillons issus de lémuriens du PNR.

Mots - clés : *Cryptosporidium*, *Giardia*, lémuriens, protozoaires, parasites, épidémiologie, Madagascar.

Abstract

Increasing human activities in the vicinities of natural habitats may facilitate the emergence and transmission of diseases between humans and domestic animals and wildlife species. We conducted a cross-sectional study investigating the prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium*, two ubiquitous and potentially zoonotic protozoan parasites in various populations of humans and animals from the Ranomafana National Park ecosystem (RNP), Madagascar. Fecal samples were obtained non-invasively from human volunteers, domestic animals and introduced rodents inhabiting three villages in the vicinity of the national park and from four species of free-ranging lemurs (*Propithecus edwardsi*, *Prolemur simus*, *Eulemur rubriventer* and *Microcebus rufus*) from the RNP. Samples were analyzed using the direct immunofluorescence technique. Prevalences of *Giardia* and *Cryptosporidium* were estimated and variables associated with infections by the protozoa were identified. *Cryptosporidium* and *Giardia* were detected with a prevalence of 22.9 % and 13.6 % in humans respectively. The prevalences of these two parasites varied from 0 % to 60 % in domestic animals and introduced rodents from the villages. Species, age category and co-infection with the other protozoan were significantly associated with the infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in this ecosystem, whereas coinfections by different helminths order were not significantly associated with *Cryptosporidium* or *Giardia*. Moreover, *Cryptosporidium* was detected in 10.5 % of lemurs sampled from the RNP. This study reports for the first time the occurrence of *Cryptosporidium* in two species of lemurs from the RNP. *Giardia* was not detected in fecal samples from lemurs inhabiting the RNP.

Keywords : *Cryptosporidium*, *Giardia*, lemurs, protozoan, parasite, Madagascar, epidemiology.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Recension de littérature.....	2
1.1 Notes sur l’histoire naturelle de Madagascar.....	2
1.1.1 Géographie.....	2
1.1.2 Biodiversité de Madagascar.....	2
1.1.3 Les lémuriens de Madagascar.....	2
1.1.4 Menaces sur la biodiversité de Madagascar.....	3
1.1.5 Le système d’aires protégées à Madagascar.....	4
1.2 Maladies émergentes et zoonoses.....	5
1.2.1 Maladies émergentes et impact sur la biodiversité.....	6
1.2.2 Maladies infectieuses à l’interface humains–primates sauvages.....	7
1.3 Deux protozoaires parasites potentiellement zoonotiques.....	9
1.3.1 <i>Giardia</i>	9
1.3.2 <i>Cryptosporidium</i>	14
1.3.3 Méthodes de diagnostic et de dépistage de <i>Giardia</i> et <i>Cryptosporidium</i>	21
1.4 Parasites des lémuriens.....	23
Objectifs du projet.....	25
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	26
2.1 Site d’étude.....	26
2.1.1 Parc National de Ranomafana.....	26
2.1.2 Villages.....	26
2.2 Sujets de l’étude.....	27

2.2.1 Lémuriens du Parc National de Ranomafana.....	27
2.2.2 Humains	28
2.2.3 Animaux domestiques.....	28
2.2.4 Rongeurs sauvages.....	28
2.3 Collecte des données.....	29
2.4 Collecte des échantillons fécaux.....	29
2.5 Analyse des échantillons.....	30
2.5.1 Importation des échantillons.....	30
2.5.2 Détection de <i>Giardia</i> et <i>Cryptosporidium</i>	30
2.5.3 Détection des helminthes	32
2.6 Analyse des données.....	33
2.6.1 Estimation des prévalences.....	33
2.6.2 Évaluations des facteurs de risque.....	33
Chapitre 3 : Résultats.....	35
3.1 Échantillonnage.....	35
3.2 Résultats des analyses coprologiques	35
3.2.1 <i>Cryptosporidium</i> et <i>Giardia</i>	35
3.2.2 Helminthes.....	42
3.3 Associations entre les différentes variables examinées et la présence de protozoaires..	52
Chapitre 4 : Discussion.....	55
4.1 Parasites chez les humains, animaux domestiques et rongeurs dans les villages	55
4.2 Variables associées à la présence de protozoaires	56
4.2.1 Différences entre les espèces	56
4.2.2 Variations selon catégories d'âge	58
4.2.3 Co-infection par <i>Cryptosporidium</i> et <i>Giardia</i>	59
4.3 <i>Cryptosporidium</i> chez les lémuriens.....	59
4.4 Autres parasites potentiellement zoonotiques et/ou anthroponotiques détectés.....	63
4.4.1 <i>Hymenelopsis</i>	63
4.4.2 <i>Schistosoma mansoni</i>	63
4.5 Limites de l'étude	64
Conclusions et orientations d'études	66

Références..... 68

Liste des tableaux

Tableau I : Les différentes espèces de <i>Giardia</i> en relation avec les espèces hôtes principales.	10
Tableau II : Les différentes espèces de <i>Cryptosporidium</i> et leurs espèces hôtes types.	15
Tableau III : Variables explicatives des modèles de régression logistique pour l'infection à <i>Giardia</i> et <i>Cryptosporidium</i> .	34
Tableau IV : Individus échantillonnés en fonction de l'espèce, la catégorie d'âge, la localisation et le sexe.	37
Tableau V : Prévalences observées de <i>Giardia</i> et <i>Cryptosporidium</i> chez les humains, animaux domestiques, rongeurs et lémuriens de l'écosystème de Ranomafana.	41
Tableau VI : Identification et caractères morphologiques des helminthes retrouvés chez les humains, animaux domestiques et lémuriens de l'écosystème du PNR.	48
Tableau VII : Prévalences estimées et intervalles de confiance à 95 % des ordres d'helminthes détectés chez les humains, animaux domestiques, rongeurs et lémuriens de l'écosystème de Ranomafana.	50
Tableau VIII : Modèle complet des régressions logistiques des variables associées à la détection de <i>Giardia</i> et <i>Cryptosporidium</i> chez les humains, animaux domestiques et rongeurs dans les villages de l'écosystème de Ranomafana.	53
Tableau IX : Modèle final de régressions logistiques des variables associées à la détection de <i>Giardia</i> et <i>Cryptosporidium</i> chez les humains, animaux domestiques et rongeurs dans les villages de l'écosystème de Ranomafana.	54

Liste des figures

Figure 1 : Localisation du Parc National de Ranomafana (PNR), Madagascar.....	5
Figure 2 : Schéma morphologique d'un kyste et d'un trophozoïte de <i>Giardia</i>	11
Figure 3 : Cycle évolutif de <i>Giardia</i>	12
Figure 4 : Oocystes de <i>Cryptosporidium</i> après coloration de Ziehl Neelsen modifiée	17
Figure 5 : Cycle évolutif de <i>Cryptosporidium</i>	18
Figure 6 : Localisation des villages à l'étude et des groupes de lémuriens échantillonnés au sein du Parc National de Ranomafana	27
Figure 7 : Kyste de <i>Giardia</i> à l'examen de fèces par immunofluorescence directe chez un humain.....	38
Figure 8 : Oocyste de <i>Cryptosporidium</i> à l'examen de fèces par immunofluorescence directe chez un microcèbe roux.	39
Figure 9 : Kystes de <i>Giardia</i> et oocystes de <i>Cryptosporidium</i> dans un échantillon fécal examiné par immunofluorescence directe chez un humain	40
Figure 10 : Œufs de parasites de l'ordre Ascaridida détectés	43
Figure 11 : Œufs de parasites de l'ordre Strongylida détectés.	44
Figure 12 : Œufs de parasites de l'ordre Oxyurida détectés.....	45
Figure 13 : Œuf d' <i>Hymenolepis nana</i> détecté dans un échantillon fécal issu de rongeurs du PNR.....	46
Figure 14 : Œuf de <i>Schistosoma mansoni</i> détecté dans un échantillon fécal d'humain de l'écosystème du PNR	47
Figure 15 : Zébus dans les pâturages en lisière du Parc National de Ranomafana.....	58
Figure 16 : Grand hapalémur pratiquant la géophagie dans le Parc National de Ranomafana.	61

Liste des abréviations

ACIA : Agence canadienne d'inspection des aliments

CITES : Convention internationale pour le commerce des espèces menacées

DFA : Analyse par immunofluorescence directe

EIA : Test enzymatique

GEE : modèle à équations d'estimation généralisée

GLM : modèle linéaire généralisé

IC : Intervalle de confiance

PBSP : *Prosimian Biomedical Survey Project*

PCR : Amplification en chaîne par polymérase

PNR : Parc National de Ranomafana

RC : Rapport de cotes

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

À mes Grands-mères,

À mes parents,

À mon frère.

Remerciements

Au Dr Stéphane Lair, Directeur de recherche, pour avoir accepté de m'encadrer dans ce projet et pour les précieux enseignements dans le domaine de la gestion de la santé de la faune.

Au Dr Julie Arsenault, Co-directrice, merci d'avoir partagé vos connaissances et d'avoir « réveillé » cet intérêt pour l'épidémiologie.

Aux Drs David Francoz et Patrick Leighton, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury.

Au Dr Alain Villeneuve et le personnel du laboratoire de parasitologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour leurs conseils et assistance lors des analyses parasitologiques.

Au personnel du Centre québécois sur la santé des animaux sauvages (CQSAS) pour m'avoir accepté dans votre équipe et m'avoir fait une petite place dans le laboratoire.

Au Dr Normand Larivière pour avoir cru en moi et m'avoir embarqué dans cette aventure.

Aux Drs Patricia Wright et Thomas Gillespie, le personnel du centre Valbio, ce projet est aussi le votre, je vous remercie pour votre aide, votre support et l'inspiration que vous avez suscitée.

À CC, merci.

Introduction

L'augmentation constante de la taille de la population humaine et des activités agricoles effectuées en bordure des habitats naturels exercent une pression anthropogénique sur l'environnement et augmentent les risques d'interactions entre l'homme et les différentes espèces animales sauvages (Dobson et Carper, 1996). Ces interactions entre l'espèce humaine, leurs animaux domestiques et les animaux sauvages sont souvent à la source de conflits. Ces interactions peuvent aussi favoriser l'émergence ou la transmission de maladies, particulièrement entre les humains et les primates en raison de leur proximité génétique (Pedersen et Davies, 2009). Parmi les agents pathogènes zoonotiques transmis entre humains, animaux domestiques et primates sauvages, on retrouve *Cryptosporidium* et *Giardia*. Ces deux genres de protozoaires sont fortement prévalents dans les pays en voie de développement et sont associés à de très nombreux cas de diarrhées chez les humains et les animaux domestiques (Thompson et al., 2008). Des cas de diarrhées ont aussi été rapportés chez les animaux sauvages (Appelbee et al., 2005). L'occurrence de ces parasites à Madagascar est mal connue. Étant donné les risques potentiels associés à ces parasitoses chez les lémuriniens, il est pertinent d'étudier certains caractères épidémiologiques tels la prévalence et les facteurs de risque liés à l'infection chez les différentes populations interagissant en lisière des habitats naturels. L'information acquise permettra de mieux évaluer les risques que posent ces agents pathogènes potentiellement zoonotiques chez les humains et animaux de l'écosystème de Ranomafana à Madagascar, particulièrement chez les lémuriniens en danger d'extinction.

Chapitre 1 : Recension de littérature

1.1 Notes sur l'histoire naturelle de Madagascar

1.1.1 Géographie

Madagascar est une île de l'océan Indien située à près de 400 km des côtes orientales de l'Afrique et à plus de 5 000 km au nord de l'Antarctique. D'une superficie d'environ 587 000 km², elle est la 4^e plus grande île au monde. Madagascar s'est séparé des masses terrestres africaines puis de l'Inde il y a respectivement 160 millions et 80 millions d'années (Barron, 1987; Krause et al., 1997). De part sa position géographique, Madagascar jouit d'un climat tropical influencé alternativement par les régimes d'alizés secs pendant l'hiver austral (mai – septembre) et par la mousson pendant l'été (octobre – mars). La taille de l'île, sa position géographique et son climat diversifié ont ainsi permis l'évolution de formes de vie uniques au monde (Martin, 1972).

1.1.2 Biodiversité de Madagascar

Madagascar est une île réputée pour sa diversité biologique. On estime qu'il y existe plus de 12 000 espèces des végétaux dont 96 % sont endémiques (Schatz, 2002). Cette richesse et le caractère unique des plantes se retrouvent aussi dans le monde animal avec un niveau d'endémisme très élevé pour chaque groupe d'animaux présents naturellement sur l'île. Ainsi, 99 % des espèces d'amphibiens décrites à Madagascar aujourd'hui sont endémiques.

1.1.3 Les lémuriens de Madagascar

Parmi les mammifères de Madagascar, les lémuriens sont probablement les plus connus. Ceux-ci appartiennent à l'ordre des primates et au sous-ordre des prosimiens. On compte actuellement 99 espèces réparties en cinq familles (Mittermeier et al., 2008). Tous les lémuriens partagent des caractères anatomiques et physiologiques qui sont considérés comme primitifs telles : la présence d'un "*Tapetum lucidum*", la présence d'un rhinarium, un utérus bicornué, une placentation épitheliochoriale et un métabolisme basal réduit. D'autres caractéristiques morphologiques et physiologiques sont propres aux espèces et sont très

variables; tel le poids qui varie de 30 g chez les Microcèbes de Madame Berthe (*Microcebus berthae*) à 7 kg chez les Indri (*Indri indri*) (Yoder et al., 2000; Powzyk et Mowry, 2003). Les lémuriens ne se retrouvent à l'état sauvage qu'à Madagascar et aux îles Comores où deux espèces ont été introduites (Pastorini et al., 2003). Cette richesse biologique a fait que l'île a été classée parmi les points chauds de la biodiversité qui regroupent les localités de la planète où la richesse biologique est très élevée, mais aussi fortement menacée et constituent ainsi une des priorités de conservation au niveau international (Myers et al., 2000; Vieites et al., 2009).

1.1.4 Menaces sur la biodiversité de Madagascar

La biodiversité de Madagascar est soumise à des pressions anthropogéniques très élevées qui menacent fortement la richesse biologique de l'île. La déforestation et la coupe non sélective ainsi que les phénomènes de fragmentation d'habitat qui en découlent mettent en danger l'intégrité des forêts (Lehman et al., 2006b, a; Lehman et al., 2006c). On estime ainsi que près de 43 % de la surface forestière humide de Madagascar a été perdue par les phénomènes de déforestations entre 1950 et 2000 (Harper et al., 2007). À ceci s'ajoutent la chasse et la collecte illégale d'animaux endémiques afin d'alimenter le marché grandissant des animaux exotiques de compagnie et de l'utilisation des parties animales pour la médecine traditionnelle asiatique (Andreone et Luiselli, 2003).

Les différentes populations de lémuriens de Madagascar sont également menacées par ces modifications anthropogéniques. En effet, depuis l'arrivée de l'homme à Madagascar il y a environ 2 000 ans, on pense que 15 espèces de lémuriens se sont éteintes du fait de la destruction des habitats et de la chasse (Perez et al., 2005). Aujourd'hui, toutes les espèces de lémuriens sont protégées par des conventions nationales et internationales. On peut noter par exemple leur présence sur la liste rouge de l'Union internationale pour la conservation de la nature et l'Appendice I de la Convention internationale pour le commerce d'espèces menacées (CITES). Malgré ces efforts de conservation, plusieurs espèces de lémuriens continuent à décroître et se trouvent menacées d'extinction. On note ainsi la présence de cinq espèces de lémuriens sur la liste des 25 primates les plus en danger au monde (Mittermeier et al., 2009). Parmi celles-ci, le grand hapalémur (*Prolemur simus*), dont l'habitat s'étendait autrefois sur toute l'île. Aujourd'hui, il n'est présent que sur 1 % de son territoire originel avec une population totale estimée entre 100 et 160 individus, repartis en plusieurs sous-populations

isolées (Wright, 2008). Plusieurs de ces sous-populations se trouvent en dehors des aires protégées et se voient menacées principalement par la perte de leur habitat pour l'agriculture, la coupe des bambous, qui est leur principale source de nourriture, et la chasse (Arrigo-Nelson et Wright, 2004).

1.1.5 Le système d'aires protégées à Madagascar

En établissant une réserve naturelle intégrale en 1927, Madagascar fut l'un des premiers pays à instaurer des aires protégées. Aujourd'hui, les aires protégées de Madagascar sont gérées par *Madagascar National Park*, une association privée d'utilité publique opérant sous la juridiction du Ministère de l'Environnement, des Forêts et du Tourisme de Madagascar. On compte aujourd'hui 50 aires protégées couvrant 3 % du territoire malgache. Ces aires protégées ont été classifiées en réserves spéciales, réserves naturelles intégrales et parcs nationaux en fonction des activités humaines qui y sont permises. Parmi les parcs nationaux, six ont été reconnus par l'UNESCO comme patrimoine mondial de l'humanité dont le Parc National de Ranomafana.

Le Parc National de Ranomafana (PNR), situé au sud est de l'île (Figure 1), a été mis en place en 1991 à la suite de la découverte d'une nouvelle espèce de lémuriens y habitant, soit le lémur bambou doré (*Hapalemur aureus*) (Wright, 1997). Le PNR est composé de 43 500 ha de forêt humide de moyenne altitude. Il abrite 12 espèces de lémuriens diurnes et nocturnes dont trois espèces en danger critique d'extinction à savoir, le grand hapalémur (*Prolemur simus*), le lémur Vari blanc et noir (*Varecia variegata*) et le Hapalémur doré (*Hapalemur aureus*). Le PNR est aujourd'hui un des parcs nationaux les plus connus et les plus visités à Madagascar et reçoit annuellement près de 15 000 visiteurs. De plus, de nombreux villages sont situés en bordure du PNR. La taille de ces villages s'accroît principalement par la venue de nouveaux migrants et ces mouvements ont été corrélés avec une augmentation de la déforestation et de la destruction des habitats naturels même au sein du PNR (Brooks et al., 2009). Cette destruction de l'habitat est la principale menace pesant sur la biodiversité malgache en générale et sur les lémuriens en particulier.

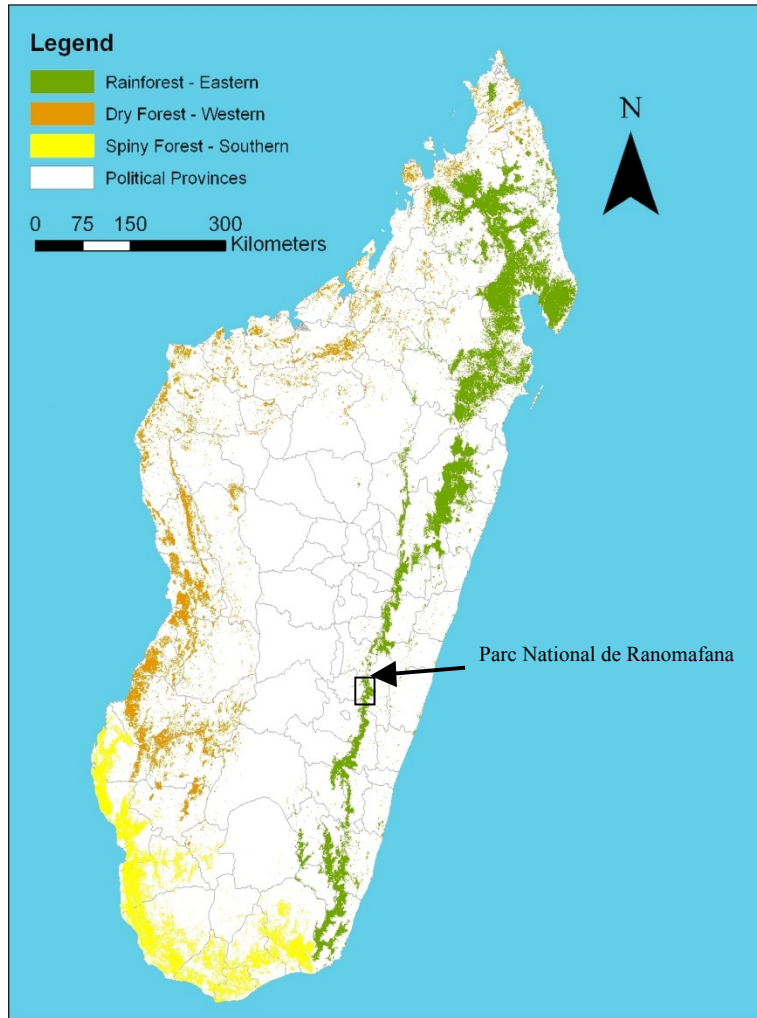


Figure 1 : Localisation du Parc National de Ranomafana (PNR), Madagascar (Source : Madagascar GIS© utilisée avec l'autorisation de B. Gerber).

1.2 Maladies émergentes et zoonoses

Les modifications anthropogéniques accentuent la fragmentation des habitats et les effets de lisière. On entend par effet de lisière les changements liés à l'adjonction de deux types de milieux écologiques (tels les champs en bordure de forêts). Ceux-ci peuvent augmenter les risques associés aux maladies sur des populations animales déjà en danger, particulièrement dans le cas de maladies infectieuses émergentes ou ré-émergentes (Murcia, 1995; Asquith et Mejia-Chang, 2005). Les maladies émergentes sont des maladies dont

l'incidence, la distribution géographique ou le nombre d'espèces hôtes a augmenté au cours des deux dernières décennies (Lederberg, 1992; Daszak et al., 2000).

Près de 60 % de ces maladies émergentes chez l'homme sont zoonotiques (Lederberg, 1992; Taylor et al., 2001). Ceci signifie que ces agents pathogènes peuvent se transmettre de manière naturelle de l'homme vers l'animal et inversement, soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur tel que les tiques ou les moustiques, ou encore par contact avec un environnement contaminé (Hubalek, 2003). Ces zoonoses sont particulièrement importantes dans le cas de transmission de l'animal vers l'homme comme pour l'émergence et les risques de pandémie due au virus de l'influenza ou de la fièvre de la vallée du Rift en Afrique (Christou, 2011). Ces maladies peuvent poser des risques importants pour la santé humaine et sont à l'origine de pertes économiques significatives (Tabachnick et al., 2002). Beaucoup de ces maladies résultent d'une modification des relations entre les différentes espèces hôtes et l'agent pathogène souvent à la suite de changements dans la démographie, le comportement ou la structure sociale de la population humaine (Dobson et Carper, 1996; Garnett et Holmes, 1996). On peut noter, par exemple, la transmission interspécifique fréquente de rétrovirus entre l'homme et les primates en Afrique centrale, qui pourrait causer l'émergence de nouvelles pandémies (Wolfe et al., 2004).

1.2.1 Maladies émergentes et impact sur la biodiversité

Les maladies transmises de l'homme à l'animal, ainsi que les maladies transmises des animaux domestiques aux animaux sauvages, revêtent une importance particulière dans le cadre de la conservation des espèces et des risques d'extinction. En effet, l'introduction d'agents pathogènes et les maladies y étant associées ont été liées à d'importantes réductions des populations animales sauvages, comme illustré lors des épizooties de morbillivirus canin (distemper) chez les lions du Serengeti (Roelke-Parker et al., 1996), ou encore des infections fongiques cutanées chez les amphibiens de manière globale (Daszak et Cunningham, 1999) et les chiroptères d'Amérique du Nord principalement (Frick et al., 2010). Aujourd'hui, la plupart des animaux sauvages vivent au sein d'habitats ayant subi des changements anthropogéniques. L'environnement est alors constitué d'une mosaïque d'habitations humaines, de terres cultivées et d'aires protégées isolées (Chapman et Peres, 2001). Ces changements forcent les populations humaines et animales à des contacts plus fréquents et

plus directs, qui à leur tour augmentent les risques de transmission des agents pathogènes (Daszak et al., 2001; Dobson et Foufopoulos, 2001). En plus des contacts avec les humains, les animaux domestiques maintenus à des densités souvent élevées en lisière des zones naturelles pourraient constituer un réservoir d'agents infectieux pour les animaux sauvages (Lafferty et Gerber, 2002).

1.2.2 Maladies infectieuses à l'interface humains–primates sauvages

Le risque de transmission interspécifique d'agents infectieux peut dépendre de facteurs intrinsèques aux agents pathogènes, des caractéristiques de l'hôte ou des interactions entre les différentes espèces d'hôtes (Cleaveland et al., 2001; Parrish et al., 2008). Ainsi, il a été montré que le risque de transmission de certaines bactéries entre les primates sauvages, les êtres humains et les animaux domestiques était positivement liée au degré de fragmentation des forêts qui accroissent le chevauchement des habitats et donc l'intensité des contacts entre ces groupes (Goldberg et al., 2008).

D'autre part, les primates sont d'une importance particulière par rapport à la transmission de maladies zoonotiques dû à la proximité génétique relative qu'ils ont avec l'espèce humaine ainsi que la superposition des habitats (Pedersen et Davies, 2009). Les primates peuvent ainsi être à la source de maladies infectieuses et constituer des réservoirs pour des maladies importantes chez les humains. Par exemple, on reconnaît aujourd'hui que le VIH (Virus d'immunodéficience humaine), agent étiologique du Syndrome d'Immuno Déficience Acquise (SIDA), est issu d'un virus apparenté d'origine animale qui aurait été transmis à l'homme à la suite de la contamination d'un chasseur de viande de brousse (Heeney et al., 2006; Van Heuverswyn et Peeters, 2007). Aussi, certaines espèces de primates constituent des réservoirs pour le virus de la fièvre jaune ou l'Herpèsvirus B (Monath, 2001; De Almeida et al., 2012), des maladies d'importance capitale pour la santé publique dans de nombreux pays. Cette proximité génétique facilite le passage et l'adaptation des virus et autres agents pathogènes entre primates et humains ce qui constitue un risque important d'émergence de maladies à la fois chez l'humain et chez l'animal (Wolfe et al., 2004; Pedersen et Davies, 2009).

D'autres agents infectieux d'importance, tels *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. et *Salmonella* spp. peuvent être transmis entre humains et animaux à

la fois en captivité et dans le milieu naturel (Nizeyi et al., 2001). Étant donné que ces bactéries sont à l'origine de morbidité et de mortalité importantes chez les primates en captivité, l'augmentation de leur prévalence chez les animaux sauvages soulève des questionnements importants sur les risques associés à l'augmentation des interactions entre humains et primates sauvages par l'écotourisme (Goldberg et al., 2007; Muehlenbein et al., 2010) ainsi que l'habituation de ces derniers (Nizeyi et al., 2001; Kaur et al., 2011). Une étude a ainsi montré un lien entre un parasite du genre *Encephalitozoon* chez les gorilles et les humains en contact fréquent avec ces animaux. Cette étude a montré que les gorilles et les humains fréquentant le parc partageaient une même et unique variante génotypique d'*Encephalitozoon intestinalis* ce qui suggère la transmission anthroponotique du parasite probablement par une contamination environnementale (Graczyk et al., 2002).

Ces différentes maladies constituent un risque certain pour les populations de primates déjà menacées par la perte de leur habitat ou par le braconnage (Wallis et Lee, 1999; Chapman et Peres, 2001; Smith et al., 2006). En effet, de nombreuses mortalités au sein de populations de primates ont été liées aux maladies infectieuses telles l'influenza, l'Ebola ou encore la fièvre jaune (Wallis et Lee, 1999; Huijbregts et al., 2003; Walsh et al., 2003; Leendertz et al., 2006). On pourra citer, par exemple, une épidémie de maladies respiratoires chez des chimpanzés (*Pan troglodytes*) du Parc National de Mahale en Tanzanie entre les années 2003 et 2006 due à un virus de la famille des Paramyxoviridae, probablement introduit par l'homme, et qui a causé un taux de mortalité voisinant les 5 % (Kaur et al., 2008). En plus des infections virales et bactériennes, les infections parasitaires peuvent également influencer les populations de primates sauvages, soit directement, soit indirectement en affectant la santé et la reproductivité de leur hôte (Hudson et al., 1992; Coop et Holmes, 1996; Coop et Kyriazakis, 1999). Parmi les parasites constituant un risque à la fois pour les populations humaines, le cheptel domestique et les animaux de la faune sauvages, on retrouve *Giardia* et *Cryptosporidium*.

1.3 Deux protozoaires parasites potentiellement zoonotiques

1.3.1 *Giardia*

1.3.1.1 Biologie

Giardia est un parasite protozoaire flagellé causant des infections intestinales chez plusieurs espèces de mammifères (y compris l'homme), d'oiseaux, de reptiles et d'amphibiens. *Giardia* appartient au phylum des Sarcomastigophora, à la classe des Zoomastigophora (tout comme les autres protozoaires flagellés tels que *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Trichomonas*) et à l'ordre des Diplomonadida (Levine et al., 1980).

La taxonomie des différentes espèces appartenant au genre *Giardia* est controversée, cependant, on reconnaît généralement six espèces différentes basées sur les caractères morphologiques et génotypiques du parasite à savoir : *Giardia lamblia* (aussi appelé *G. duodenalis* ou *G. intestinalis*), *G. agilis*, *G. muris*, *G. psittaci*, *G. ardeae* et *G. microti*.

On reconnaît également que *G. lamblia* correspond à une espèce composée d'au moins sept groupes génétiques différents que l'on appelle assemblages (Tableau I) (Lasek-Nesselquist et al., 2009; Abe et al., 2010). Les assemblages A et B sont deux assemblages qui infectent couramment l'espèce humaine, les primates, ainsi que d'autres espèces de mammifères. Les autres assemblages sont plus spécifiques dans leur distribution d'espèces hôtes (Caccio et al., 2008). Ainsi, les assemblages C et D de *G. lamblia* sont restreints aux espèces de canidés, E infecte uniquement les ongulés domestiques, F ne se retrouve que chez le chat et G chez le rat. Ces différents assemblages partagent les mêmes caractéristiques morphologiques et sont ainsi difficiles à distinguer (Monis et al., 2003).

Tableau I : Les différentes espèces de *Giardia* en relation avec les espèces hôtes principales (adapté de Monis, 2003a).

Espèces de <i>Giardia</i>	Assemblage	Espèce hôte principale
<i>G. lamblia</i>	A	Humains, autres mammifères
	B	Humains, autres mammifères
	C	Chien
	D	Chien
	E	Ongulés
	F	Chat
	G	Rat
<i>G. muris</i>		Souris
<i>G. microti</i>		Campagnol
<i>G. ardae</i>		Hérons
<i>G. Psittaci</i>		Psittacidés
<i>G. agilis</i>		Amphibiens

1.3.1.2 Morphologie et cycle évolutif

Giardia lamblia est un protozoaire flagellé dont le cycle évolutif est direct et comprend un stade végétatif sous forme de trophozoïte et un stage infectieux sous forme de kystes. Les trophozoïtes sont pyriformes et mesurent entre 10 et 19 μm de long pour 5 à 12 μm de largeur et une épaisseur allant de 2 à 4 μm . Ils arborent quatre paires de flagelles et sont binucléés (Figure 2). Les trophozoïtes se logent dans la partie antérieure de l'intestin grêle (généralement le duodénum) de l'hôte où ils se multiplient par fission (Adam, 2001). Les trophozoïtes sont ensuite transportés dans l'iléon où ils sécrètent une membrane protectrice et deviennent ainsi des kystes. Les kystes sont ovoïdes et mesurent entre 7 et 10 μm de long pour une largeur de 8 à 13 μm (Gillin et al., 1987). Ces kystes sont rejetés dans le milieu extérieur via les fèces. Ils constituent la forme infectieuse de *Giardia*. L'infection se fait par ingestion de la forme infectante (forme kystique) à travers le cycle fécal oral, soit directement, soit indirectement par la consommation de nourriture ou d'eau contaminée (Figure 3).

Contrairement aux helminthes, les kystes de *Giardia* ne subissent pas de transformation dans le milieu extérieur et sont immédiatement infectieux (Kirkpatrick et Benson, 1987). La période prépatente de *Giardia* varie d'une espèce hôte à une autre, mais

dure en général 5 à 16 jours chez le chien et le chat avec une excrétion cyclique de kystes. Chez le veau, elle est de 7 à 8 jours et de 10 à 21 jours chez les ovins (Taminelli et al., 1989).

Les kystes peuvent survivre dans le milieu extérieur pendant une durée variable en fonction des conditions environnementales. La forme kystique peut ainsi demeurer infectieuse jusqu'à un mois dans l'eau à 21 °C ou plus de 2 mois dans l'eau à 8 °C (Bingham et al., 1979; Karanis et al., 2007). Ceux-ci sont détruits par l'ammonium quaternaire et l'ébullition, mais sont résistants aux concentrations de chlore généralement utilisés dans l'eau de boisson (Karanis et al., 2007).

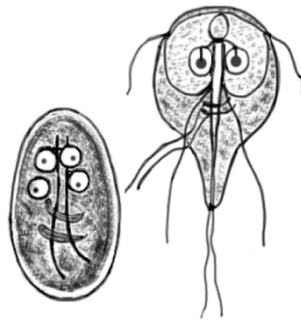


Figure 2 : Schéma morphologique d'un kyste et d'un trophozoïte de *Giardia*. Source : *Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta, USA).

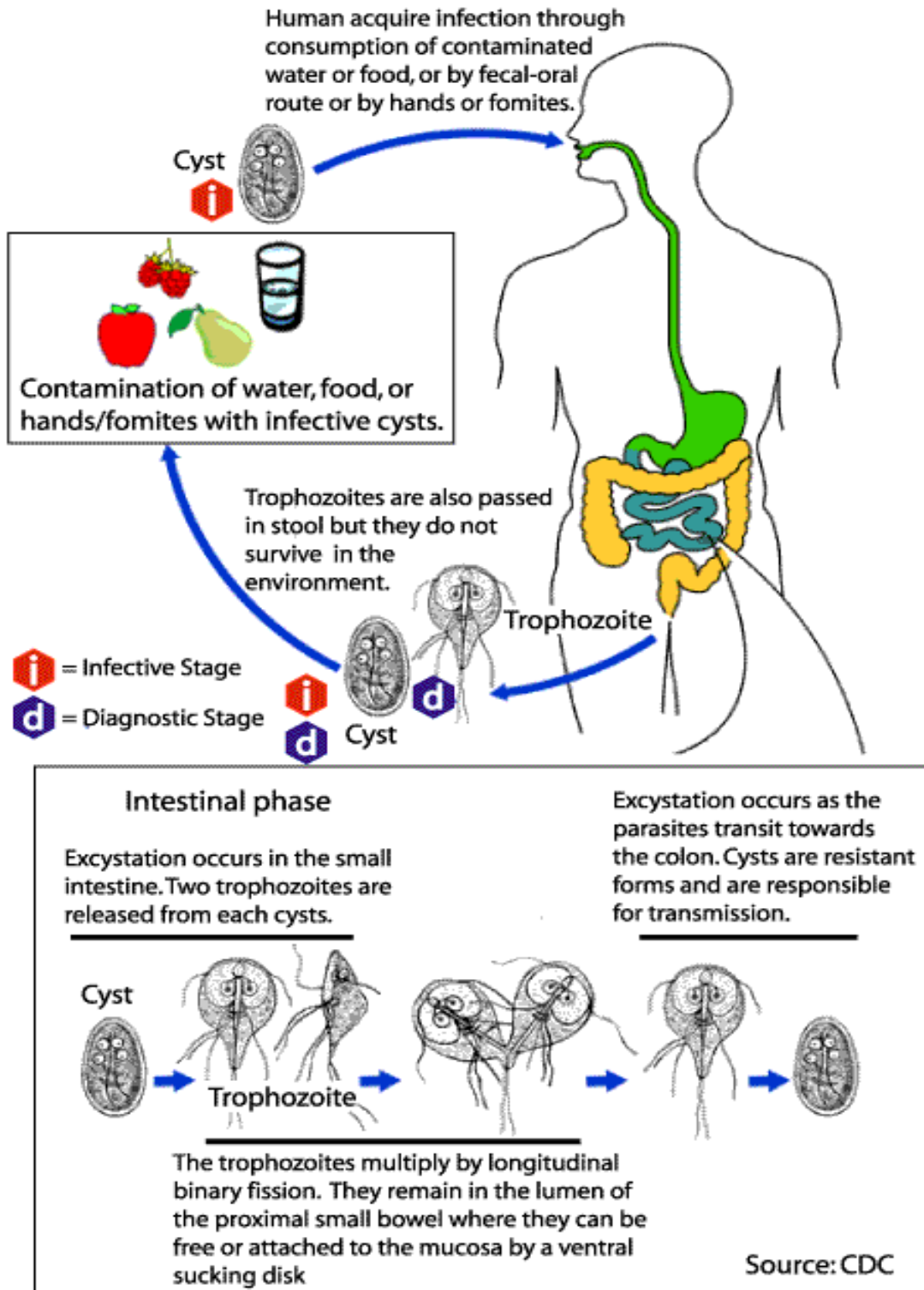


Figure 3 : Cycle évolutif de *Giardia* (source *Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta, USA).

1.3.1.3 Présentation clinique chez les humains

Giardia lamblia est l'agent étiologique de la giardiose, maladie dont la présentation clinique peut être très variable avec souvent une infection sous-clinique (Flanagan, 1992; Farthing, 1996). Les patients peuvent présenter des diarrhées mal absorbatives avec une perte de poids importante et des crampes abdominales ainsi que des nausées et de la fièvre. À l'examen histologique des intestins, on peut retrouver des trophozoïtes sur la surfaces de la muqueuse intestinale avec parfois, une réduction et un aplatissement des villosités intestinales (Ament et al., 1973; Gillon, 1985). Très rarement, une manifestation extra-intestinale est présente. Celle-ci se traduit par des urticaires (Farthing et al., 1983; Hamrick et Moore, 1983; Clyne et Eliopoulos, 1989), une arthrite (Goobar, 1977; Shaw et Stevens, 1987) ou une rétinite (Anderson et Griffith, 1985). Sans traitement, la maladie dure environ six semaines (Moore et al., 1969; Brodsky et al., 1974).

1.3.1.4 Épidémiologie

Giardia lamblia est le parasite intestinal le plus fréquemment isolé chez l'humain à travers le monde et est responsable de plus d'un milliard de cas de diarrhée annuellement, particulièrement chez les enfants des pays en voie de développement (Crompton et Savioli, 1993; Teodorovic et al., 2007). Ainsi, des études ont montré que près de 40 % des enfants péruviens ont été infectés par ce parasite avant l'âge de six mois, ainsi que 20 % du Zimbabwe ou du Bangladesh (Gilman et al., 1985; Mason et Patterson, 1987).

Chez les animaux domestiques, les prévalences sont également très élevés chez différentes espèces, comme les bovins, les chiens et les chats (Thompson, 2004; Trout et al., 2004). On note par exemple une prévalence allant jusqu'à près de 100 % chez des bovins d'élevage laitier mais ceux-ci présentent généralement peu de signes cliniques (Xiao et Herd, 1994; Ralston et al., 2003).

Chez les animaux comme chez les humains, la source principale d'infection est les matières fécales contenant des kystes de *Giardia*. Ces kystes se transmettent à travers un cycle féco-oral suite à la consommation d'eau ou de nourriture contaminée (Porter et al., 1990; Karanis et al., 2007; Shields et al., 2008; Takizawa et al., 2009).

1.3.1.5 *Giardia* chez les primates

Giardia est un parasite communément retrouvé dans les matières fécales de primates captifs et sauvages (Ghandour et al., 1995; Hope et al., 2004; Levecke et al., 2007). L'infection chez les primates est d'une importance particulière tant pour la santé publique que pour la conservation des espèces en danger. En effet, les primates sont généralement infectés par les parasites appartenant au groupe génotypique *G. lamblia* assemblage A ou assemblage B qui infectent également les humains. Les primates, en captivité et dans le milieu naturel pourraient ainsi constituer des réservoirs potentiels pour la transmission de ces parasites vers les humains. Inversement, les humains pourraient également constituer des réservoirs d'agents pathogènes pour les primates. En effet, la présence de ces parasites chez les primates sauvages suggère une augmentation des interactions entre les primates et les humains, ainsi qu'un niveau croissant de dégradation des habitats naturels (Nizeyi et al., 1999; Nizeyi et al., 2002b; Gillespie et Chapman, 2008).

Peu d'études ont mis en évidence le caractère pathogène de ce parasite chez les animaux sauvages et particulièrement chez les primates dans le milieu naturel (Appelbee et al., 2005; Johnston et al., 2010). On pense néanmoins que ces parasites peuvent être associés à de la diarrhée et des retards de croissance importants, particulièrement chez les jeunes animaux (Hamlen et Lawrence, 1994; Kalishman et al., 1996). De plus, il est difficile de prédire les effets que pourraient avoir l'exposition croissante aux agents pathogènes du genre *Giardia* sur des populations d'animaux sauvages immunologiquement naïfs par rapport à ce parasite (Johnston et al., 2010; Thompson et al., 2010).

1.3.2 *Cryptosporidium*

1.3.2.1 Biologie

Le genre *Cryptosporidium* regroupe des espèces de parasites protozoaires qui vivent et se multiplient dans le système digestif de plus de 150 espèces de mammifères (O'Donoghue, 1995), oiseaux (Sreter et Varga, 2000), reptiles (Upton et al., 1989), amphibiens et poissons (Muench et White, 1997). Ces parasites sont classés dans le phylum Apicomplexa qui regroupe différents genres de parasites communément connus comme les coccidies. Les cryptosporidies appartiennent à l'ordre des Eucoccidiorida et à la famille des

Cryptosporidiidae, qui partagent comme caractères communs un développement homoxène (un seul hôte) et des oocystes contenant quatre sporozoïtes (Fayer et Ungar, 1986). Aujourd'hui, on reconnaît l'existence de 13 différentes espèces ainsi que différents génotypes de *Cryptosporidium* (Tableau II). Parmi celles-ci, *Cryptosporidium parvum*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* et *C. muris* semblent être zoonotiques (Xiao et al., 2004).

Tableau II : Les différentes espèces de *Cryptosporidium* et leurs espèces hôtes types (adapté de Fayer et al., 2000).

Espèce de <i>Cryptosporidium</i>	Espèce hôte type
<i>Cryptosporidium canis</i>	Chien
<i>C. hominis</i>	Humain
<i>C. felis</i>	Chat
<i>C. parvum</i>	Souris, bovin, humain
<i>C. muris</i>	Souris
<i>C. wrairi</i>	Cobaye
<i>C. andersoni</i>	Bovin
<i>C. meleagridis</i>	Dindon
<i>C. baileyi</i>	Poulet
<i>C. serpentis</i>	Serpents
<i>C. saurophilum</i>	Lézards (scinques)
<i>C. nasorum</i>	Poissons
<i>C. molnari</i>	Poissons marins

1.3.2.2 Cycle évolutif

Les cryptosporidies possèdent les plus petits oocystes parmi les coccidies. Ils sont sphériques ou ovoïdes et mesurent environ 5 µm de diamètre pour *C. parvum* (Upton et Current, 1985) (Figure 4). Le cycle évolutif de *C. parvum* est similaire à celui des autres coccidies et correspond à un cycle évolutif direct (Figure 5). Un oocyste sporulé est excrété dans les matières fécales d'un hôte infecté. Par la contamination de l'environnement, de la nourriture ou de l'eau, les oocystes sont ensuite ingérés par un autre hôte (Current, 1986). Chaque oocyste contient quatre sporozoïtes de forme allongées qui constituent la forme infectante du parasite. Une fois dans le système gastro-intestinal de cet hôte, les sporozoïtes se désenkystent et parasitent les cellules épithéliales. Les sporozoïtes se retrouvent ainsi sur la surface luminale de cet épithélium où ils se différencient en trophozoïtes de forme sphériques de 2,5 à 3 µm de diamètre qui se multiplient de manière asexuée pour former des méronts (Current, 1986). Il existe deux types de méronts, soit les types I et II qui sont morphologiquement identiques et dont la taille varie de 4 à 5 µm de diamètre. Le type I produit entre 6 et 8 mérozoïtes de forme allongée alors que le type II va produire quatre gamétocytes. Ces gamétocytes vont se différencier en microgamétocytes (cellules mâles) et macrogamétocytes (cellules femelles). Les microgamétocytes vont fertiliser les macrogamétocytes pour former un zygote. La plupart de ces zygotes vont se couvrir d'une membrane protectrice de 50 nm d'épaisseur pour devenir des oocystes qui seront rejetés dans le milieu extérieur via les fèces et compléter le cycle (O'Donoghue, 1995; Tzipori et Griffiths, 1998).

La période prépatente varie selon l'espèce hôte. Ainsi, elle se situe entre 2 et 7 jours chez le bovin (Tzipori et al., 1983), 5 à 10 jours chez le chat (Fayer et al., 2006) entre 2 et 14 jours chez le chien (Lloyd et Smith, 1997). Chez l'humain, elle varie entre 5 et 21 jours. Une fois dans le milieu extérieur, les oocystes sont immédiatement infectieux.

Les oocystes de *Cryptosporidium* demeurent infectieux dans le milieu extérieur pendant une période de temps relativement longue. Ainsi, les oocystes peuvent survivre entre 6 et 9 mois dans un environnement aqueux à 4 °C (Tzipori, 1983). Ceux-ci sont inactivés par les températures élevées (65 °C pendant 30 minutes) ainsi que par la congélation (Tzipori, 1983).

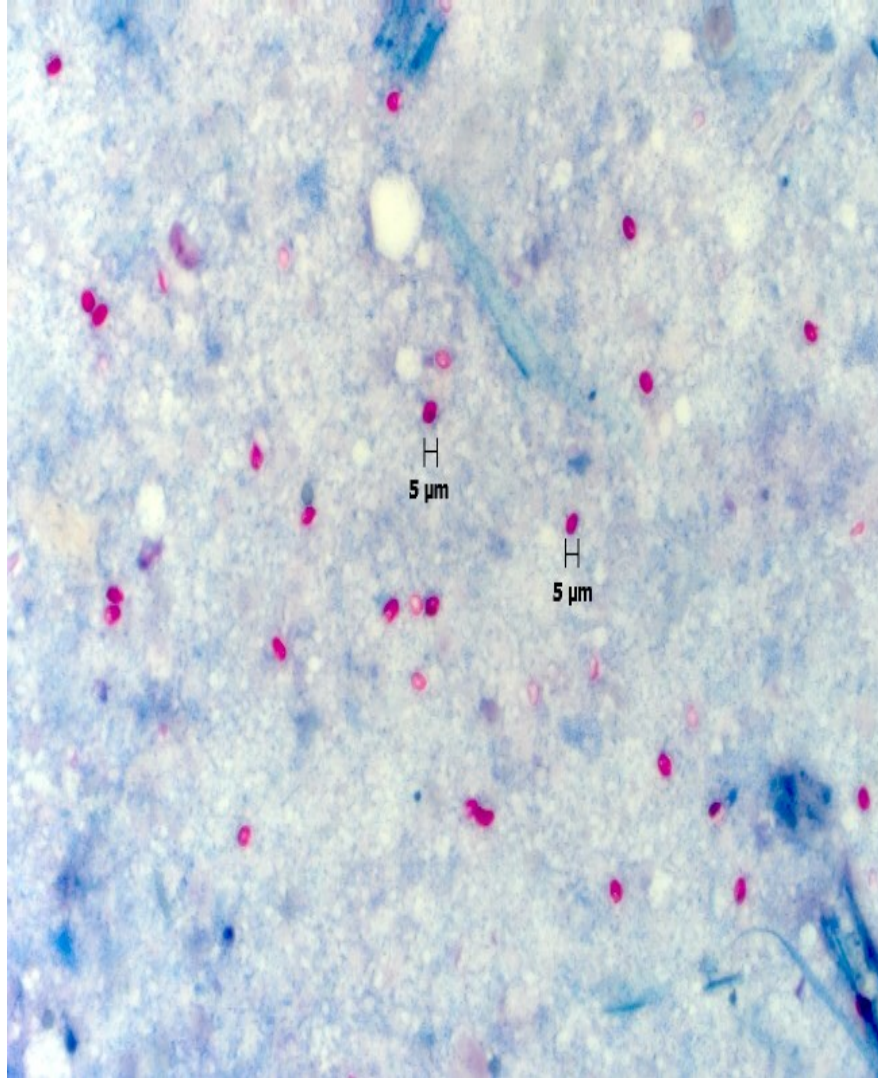


Figure 4 : Oocystes de *Cryptosporidium* après coloration de Ziehl Neelsen modifiée (Source : Raed Z. Ahmed, Medical Parasitology Lab., 2012, utilisée avec l'autorisation de R. Ahmed).

Cryptosporidiosis

(*Cryptosporidium*)

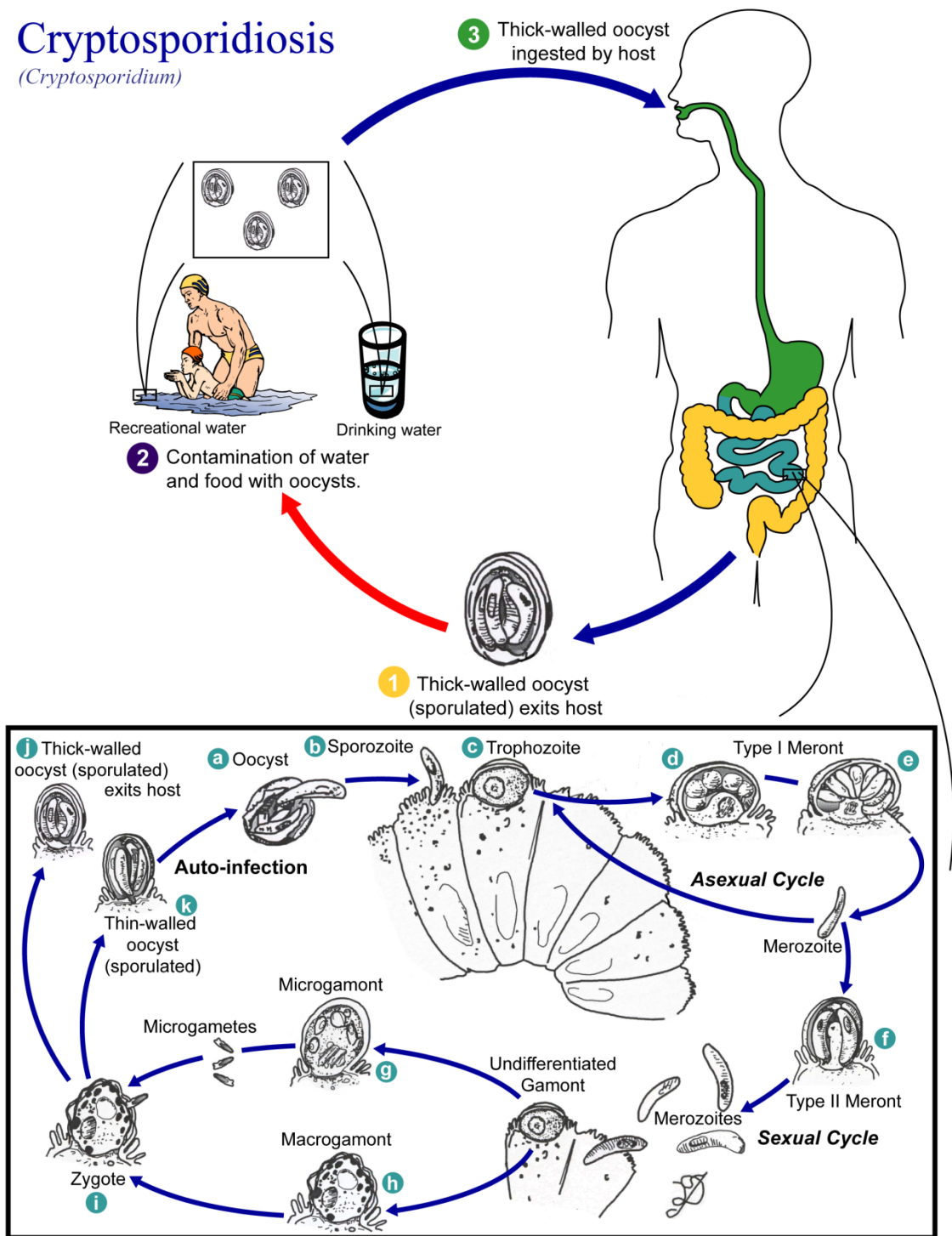


Figure 5 : Cycle évolutif de *Cryptosporidium* (Source : Center for Disease Control and prevention, Atlanta, USA).

1.3.2.3 Présentation clinique chez l'homme et les animaux.

Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont les agents étiologiques de la cryptosporidiose. Les mécanismes pathogéniques de *Cryptosporidium* sont peu connus, il semblerait toutefois que les parasites brisent la barrière épithéliale, ce qui provoque un raccourcissement et une fusion des villosités intestinales (Koudela et Jiri, 1997). Ce phénomène diminue la surface intestinale et réduit la capacité d'absorption intestinale (Tzipori et Ward, 2002). Ceci est à l'origine des signes cliniques principaux de la maladie. En effet, la cryptosporidiose se manifeste généralement par une diarrhée liquide et profuse contenant parfois du mucus et qui est rarement sanguinolente (Fayer et Ungar, 1986). La diarrhée peut s'accompagner de signes non spécifiques tels qu'une anorexie, de la fièvre et une céphalée (O'Donoghue, 1995). La sévérité ainsi que la durée des signes cliniques varie selon les individus et ce principalement selon leur statut immunitaire. Chez la plupart des personnes immunocompétentes, les signes cliniques disparaissent spontanément après une à deux semaines (Chappell et al., 1996). Par contre, chez les personnes immunocompromises telles que celles infectées par le virus du SIDA, l'infection aux cryptosporidies peut être fatale (Blanshard et al., 1992; Flanigan et al., 1992). D'autres facteurs semblent prédisposer à la maladie tels que le jeune âge, la malnutrition, la grossesse ou une co-infection virale (Tzipori et Ward, 2002). Chez les enfants, une infection aux cryptosporidies peut provoquer des pertes de poids et des retards de croissance même en cas d'infections sous-cliniques (Checkley et al., 1997; Checkley et al., 1998).

Chez les autres mammifères, les manifestations cliniques de la maladie sont semblables à celles des hommes et se traduisent par des diarrhées, une anorexie et une perte de poids (O'Donoghue, 1995). Chez les oiseaux, les signes respiratoires sont fréquents, particulièrement lors d'infections dues à *C. baylei* (Lindsay et al., 1989; Sreter et Varga, 2000).

1.3.2.4 Épidémiologie et modalité de transmission

Cryptosporidium a une distribution mondiale. Des cas de cryptosporidiose humaine ont été rapportés dans plus de 50 pays des six continents et se retrouvent principalement chez les enfants et les jeunes animaux des pays en voie de développement (Guerrant et al., 1990). Le parasite se transmet principalement par la voie fécale orale. La transmission peut se faire

d'homme à homme, par voie zoonotique de l'animal vers l'homme ou inversement, ou encore par la consommation d'eau ou de nourriture contaminée (Fayer et al., 2000). Il a été démontré que l'ingestion de moins d'une dizaine d'oocystes pouvait induire la maladie chez les humains (Okhuysen et al., 1999). Les individus infectés, humains et animaux excrètent dans leurs fèces un nombre variable de *Cryptosporidium*. Ainsi, les veaux peuvent excréter jusqu'à 4 millions de kystes de *Cryptosporidium* par gramme de fèces. Pour *Cryptosporidium*, il a été montré que la plupart des bovins excrètent entre 35 et 7 000 oocystes par gramme de fèces (Huetink et al., 2001), et ce nombre peut atteindre jusqu'à 26 millions par gramme de matière fécale (Xiao et Herd, 1994).

1.3.2.5 *Cryptosporidium* chez les primates

Parmi les 13 espèces de *Cryptosporidium* reconnues, *C. parvum*, *C. hominis* et *C. muris* ont été retrouvées chez des primates en captivité ou en milieu naturel. Par exemple, *C. parvum* a été retrouvé chez plus de 15 espèces de primates en captivité et en milieu naturel dont le singe-écureuil commun (*Saimiri sciureus*), le lémur vari-rouge (*Varecia variegata rubra*), des ouistitis (*Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus*), différentes espèces de macaques (*Macaca mulatta*, *M. nemestrina*, *M. fascicularis*), le singe-araignée à ventre blanc (*Ateles belzebuth*), le mangabey couronné (*Cercocebus torquatus lunulatus*), des cercopithèques (*Cercopithecus aethiops*, *C. campbelli*, *C. talapoin*), le patas (*Erythrocebus patas*), le babouin (*Papio anubis*) le propithèque de Coquerel (*Propithecus coquereli*) et le gorille des montagnes (*Gorilla gorilla beringei*) (O'Donoghue, 1995; Kalishman et al., 1996; Muriuki et al., 1997; Nizeyi et al., 1999; Gomez et al., 2000; Graczyk et al., 2001; Dubey et al., 2002; Charles-Smith et al., 2010). Ces trois espèces de parasites peuvent également infecter l'humain et constituent ainsi des agents pathogènes zoonotiques potentiels. Ces protozoaires ont surtout été retrouvés chez les animaux vivants à la lisière des parcs ou ayant un contact accru avec les humains (Ekanayake et al., 2006). Ceci suggère que les humains et les animaux domestiques constitueraient une source d'infection pour les primates sauvages (Gillespie et al., 2005; Gillespie et Chapman, 2006; Salzer et al., 2007).

Les signes cliniques de l'infection par les cryptosporidies chez les primates sont encore largement méconnus; cependant, des cas de diarrhées ont été associés à l'infection aux

cryptosporidies chez les gorilles, les cercopithèques et les babouins (Muriuki et al., 1997). Chez d'autres primates (Gillespie et al., 2009), on a confirmé la présence de ces parasites sans que ceux-ci ne présentent de signes clinique.

1.3.3 Méthodes de diagnostic et de dépistage de *Giardia* et *Cryptosporidium*

Il existe différentes techniques pour la détection des parasites du genre *Giardia* et *Cryptosporidium*. La méthode la plus courante est l'examen de frottis direct ou de concentrés de fèces après coloration au lugol (pour *Giardia*), de Ziehl Neelsen (pour *Cryptosporidium*) ou encore une coloration de Giemsa (Fayer et Ungar, 1986; Weber et al., 1991). Ces méthodes de diagnostic par microscopie se basent sur la détection et l'identification morphologique des agents pathogènes. Cette détection est aidée par la concentration et la coloration des protozoaires d'intérêts. Néanmoins, ces méthodes sont particulièrement sujettes à des biais d'interprétation car elles sont fortement dépendantes de l'expérience de l'examineur et du nombre de kyste ou oocystes présent dans l'échantillon analysé (Zimmerman et Needham, 1995; Fayer et al., 2000; Gates et Nolan, 2009). Ainsi, différentes études ont évalué la sensibilité des méthodes de microscopie usuelles et ont montré que celles-ci varient de 60 à 78 % à l'examen d'un seul échantillon fécal contenant au moins 10 000 oocystes/g de fèces (Garcia et al., 1987; Addiss et al., 1991; Weber et al., 1991; Johnston et al., 2003). En utilisant les techniques de concentration des oocystes par la méthode de flottation, le seuil de détection des oocystes peut être abaissé à 5 000 oocystes/g de fèces (Weber et al., 1992)

À ces méthodes de microscopie usuelles s'ajoute la technique de diagnostic par immunofluorescence directe (DFA) qui permet la détection des kystes et oocystes en marquant leurs antigènes de surface à l'aide d'anticorps lié à un fluorophore (Zimmerman et Needham, 1995). Un échantillon est ainsi considéré positif lorsqu'il arbore un organisme teint d'une coloration verte en microscopie à fluorescence et dont les caractéristiques morphologiques correspondent à celles d'un kyste de *Giardia* ou un oocyste de *Cryptosporidium*. La sensibilité et la spécificité des méthodes de diagnostic de *Giardia* et *Cryptosporidium* par DFA avoisinent les 100 % faisant de cette technique la méthode de référence pour la détection de ces deux protozoaires chez les humains (Garcia et Shimizu, 1997). En utilisant les méthodes de concentration par flottation à la solution sucrée, le seuil de détection de cette méthode est de 66 kystes /g de fèces (O'Handley et al., 2000; Nguyen et al., 2012). De plus, la technique

par DFA est relativement rapide à réaliser et facile à interpréter. Cependant, comme toutes les méthodes microscopiques, la DFA s'appuie sur la coloration des organismes d'intérêt, leur détection ainsi que leur identification morphologique et leurs mensurations. Du fait des ressemblances morphologiques existant entre les différentes espèces de *Giardia* et *Cryptosporidium*, il est difficile voire impossible de préciser les différentes espèces d'agents pathogènes présents dans les échantillons et de déterminer le génotype de ces protozoaires (Thompson, 2004). Ceci limite leur application épidémiologique, car elles ne permettent pas de déterminer l'espèce du parasite et donc sa source probable ainsi que ses potentialités zoonotiques (Appelbee et al., 2005).

Chez les hommes et les animaux domestiques, des trousse de diagnostic rapides se basant sur la méthode d'ELISA (EIA) ont été développées pour la détection de *Giardia* et *Cryptosporidium* dans les matières fécales. Une étude comparant différentes méthodes de détection de *Cryptosporidium* montre que cette dernière technique, dont la sensibilité est de 94 %, permet d'obtenir des résultats similaires à ceux par la méthode de DFA (Bialek et al., 2002). La méthode d'EIA permet de tester un grand nombre d'échantillons simultanément, car cette méthode de diagnostic rapide ne nécessite pas l'examen microscopique de l'échantillon. Cependant, cette technique semble rapporter plus de faux positifs et pourrait ainsi fausser l'interprétation des résultats cliniques et épidémiologiques (Doing et al., 1999).

Enfin, des méthodes utilisant la biologie moléculaire, par l'amplification en chaîne par polymérase (PCR), permettent de détecter et caractériser génétiquement les kystes et oocystes de *Giardia* et cryptosporidies (Limor et al., 2002; Coupe et al., 2005). Ces méthodes ont une sensibilité et une spécificité de 100 % avec un seuil de détection aussi bas que 3 oocystes par grammes de fèces (Orlandi et Lampel, 2000). Cependant, le coût élevé ainsi que le temps nécessaire à la réalisation des méthodes moléculaires font que celles-ci sont peu utilisées en dehors du domaine de la recherche.

Chez les gorilles, par exemple, les méthodes par examen microscopique et particulièrement par la méthode DFA sont privilégiées car celles-ci allient sensibilité, spécificité, facilité d'utilisation et coût d'analyse raisonnable (van Zijll Langhout et al., 2010).

1.4 Parasites des lémuriens

Les lémuriens de Madagascar ont, depuis plusieurs décennies, reçu une attention particulière dans le monde de la recherche scientifique. Toutefois, on connaît encore peu de chose sur la diversité des agents pathogènes ainsi que l'écologie des maladies qui les affectent. La plupart des travaux de recherche sur les parasites des lémuriens ont été effectués au milieu du siècle passé et ont surtout été orientés vers l'identification et la description des parasites macroscopiques propres aux lémuriens (Chabaud A.G., 1959; Chabaud et al., 1961; Chabaud A.G., 1965). Plus récemment, des travaux de recherche sur la santé des lémuriens ont permis d'étendre les connaissances par rapport aux parasites des lémuriens dans le milieu naturel (Junge et Louis, 2007; Dutton et al., 2008; Junge et al., 2008; Clough, 2009; Irwin et al., 2010; Junge et al., 2011) et en captivité (Rasambainarivo et Junge, 2010).

Ces études ont permis de mettre en évidence la présence de plus de 27 espèces d'helminthes dont 22 espèces de nématodes, trois espèces de plathelminthes et deux espèces d'acanthocéphales, ainsi que de 12 espèces de protozoaires affectant les lémuriens dans leur milieu naturel (Irwin et Raharison, 2009). Peu, voire aucun effet pathogène n'a été jusqu'ici associé à l'infection des lémuriens en milieu naturel par ces parasites avec lesquels ils ont vraisemblablement évolué (Irwin et Raharison, 2009).

À ces parasites infectant les lémuriens dans leur milieu naturel, s'ajoutent les parasites acquis en captivité auxquels des signes cliniques et des mortalités ont été associés. On note par exemple des cas de nombreux cas de mortalité suite à l'infection des lémuriens au parasite des chiens *Spirocerca lupi*, causant des anévrismes au niveau de l'aorte et dont la rupture cause la mort subite du lémurien hôte (Blancou, 1976). On peut citer également les cas de mortalité aiguë de certaines espèces par l'infection aux protozoaires *Toxoplasma gondii* (Spencer et al., 2004). L'infection aux protozoaires du genre *Giardia* et *Cryptosporidium* a également été associée à des cas de diarrhées voire même des mortalités en captivité (Junge, communication personnelle).

Ainsi, des parasites du genre *C. parvum* ont été identifiés chez 65 % des individus d'une espèce de lémuriens (*Propithecus verreauxi coquerelli*) au sein d'une institution zoologique aux États - Unis (da Silva et al., 2003). Des ookystes de *C. parvum* ont également été retrouvés chez d'autres espèces de lémuriens dans un parc zoologique d'Espagne (Gomez

et al., 1992). Ces infections ont été associées à des cas de diarrhée chronique allant jusqu'à 54 jours et des mortalités particulièrement chez les jeunes animaux. En effet, les jeunes animaux (moins de 5 ans) se trouvaient être plus susceptibles à la maladie, se voyaient être réinfectés plus souvent et développer des signes cliniques de manière récurrente. Lors d'une étude rétrospective recensant les cas de cryptosporidiose chez les lémuriens dans une institution zoologique américaine pendant une durée de 9 ans, 96 % des animaux excrétaient des oocystes de *Cryptosporidium* développaient une diarrhée, 36 % étaient léthargiques et 16 % présentaient également une anorexie (Charles-Smith et al., 2010). De plus, *G. lamblia* assemblage A et B ont été retrouvé chez différentes espèces de lémuriens de parcs zoologiques européens, mais aucune manifestation clinique n'a été démontrée (Levecke et al., 2007). Ces résultats montrent que les lémuriens peuvent constituer un réservoir pour les animaux et les humains ainsi qu'une contamination de l'environnement (Levecke et al., 2007).

Objectifs du projet

Par ce projet, nous souhaitons documenter la présence de *Giardia* et *Cryptosporidium* parasites potentiellement zoonotiques au sein de l'écosystème du Parc National de Ranomafana. La présence de ces parasites dans les populations humaines et dans le cheptel domestique vivant en lisière du parc national pourrait constituer une menace pour les animaux endémiques. Le premier objectif de notre étude est donc d'évaluer la prévalence de ces deux parasites au sein des populations humaines et animales dans l'écosystème de Ranomafana.

De plus, les études effectuées chez de nombreuses espèces de primates révèlent des associations entre les niveaux d'infection et la qualité de l'habitat, l'âge des animaux ou les interactions entre humains et animaux sauvages. En deuxième lieu, nous souhaitons ainsi évaluer certains critères de risques associés à l'infection par *Cryptosporidium* et *Giardia* chez les espèces chez qui l'infection a été détectée. Aussi, nous souhaitons décrire la présence des helminthes retrouvés chez les humains, animaux domestiques, rongeurs péri domestiques et lémuriers sauvages afin d'évaluer l'association possible entre les infections aux helminthes et aux protozoaires. En fonction des résultats obtenus et au vu des caractères épidémiologiques liés à ces infections, des mesures préventives pourraient être recommandées afin d'éviter ou de limiter la transmission de ces parasites vers les animaux endémiques déjà menacés par la perte de leur habitat et la chasse.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1 Site d'étude

2.1.1 Parc National de Ranomafana

Le Parc National de Ranomafana (PNR) a été établi en 1991 comme étant le 4^e parc national de Madagascar. Il est situé à 60 km de l'océan Indien, au sud est de Madagascar. Le PNR est une aire protégée constituée de 44 300 ha de forêt humide de moyenne altitude. Le climat du PNR est subtropical avec des variations de températures allant d'un minimum de 4 à 12 °C entre juin et septembre à un maximum de 36 à 40 °C entre décembre et février et des précipitations annuelles variant entre 1 700 et 4 300 mm. Du point de vue du couvert végétal, le PNR est une des forêts qui abrite la plus grande diversité floristique au monde. La diversité faunique est également exceptionnellement élevée avec plus de 114 espèces d'oiseaux, plus de 130 espèces de reptiles et d'amphibiens ainsi que des mammifères dont 13 espèces de lémuriers (Tan, 1999). Le PNR est entouré d'une mosaïque d'installations humaines telles que des villages et des terres cultivées. On compte ainsi environ 25 villages et hameaux dans la zone dite tampon située à moins de 5 km du PNR.

2.1.2 Villages

Parmi les huit villages situés dans la zone dite tampon s'étendant sur un couloir de 5 km de largeur en périphérie du PNR, trois villages ont été sélectionnés de manière aléatoire suite à un tirage au sort à partir d'une liste exhaustive des villages (Figure 6). Chacun des villages sélectionnés est constitué de 20 à 30 ménages composés chacun de 3 à 15 personnes (moyenne 6). Les activités économiques dans ces villages reposent principalement sur l'agriculture et l'élevage, effectués en bordure du parc national. Certains animaux, particulièrement les zébus (*Bos indicus*) élevés de manière extensive, sont laissés librement au sein même du PNR (Peters, 1999).

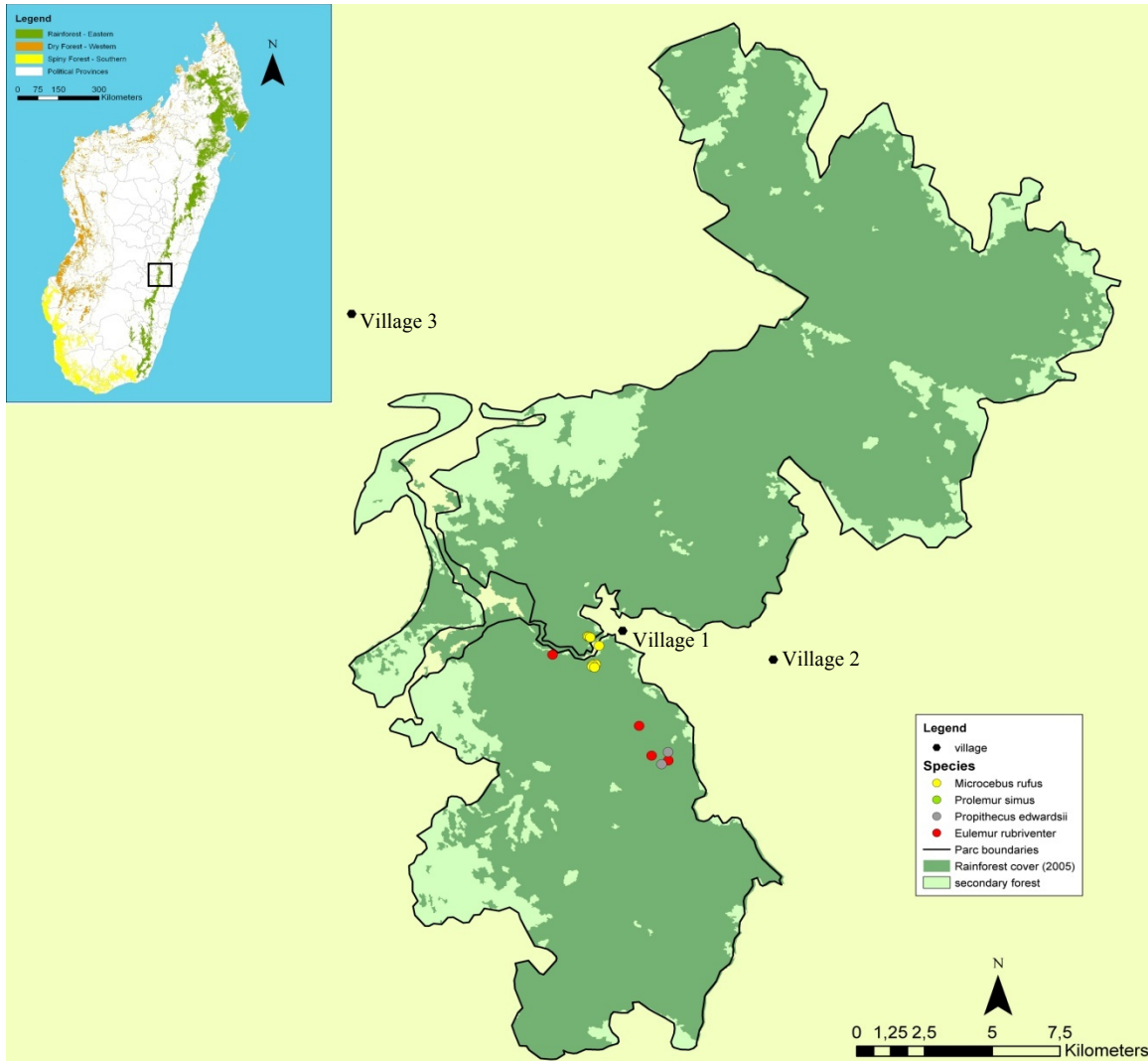


Figure 6 : Localisation des villages à l'étude et des groupes de lémuriens échantillonnés au sein du Parc National de Ranomafana (Source Madagascar GIS©, données utilisées avec l'autorisation de B. Gerber).

2.2 Sujets de l'étude

2.2.1 Lémuriens du Parc National de Ranomafana

Quatre espèces de lémuriens ont été choisies comme sujets d'étude issus du PNR à savoir le propithèque de Milne-Edwards (*Propithecus edwardsii*), le grand hapalémur (*Prolemur simus*), le lémur à ventre roux (*Eulemur rubriventer*) et le microcèbe roux (*Microcebus rufus*). Certains groupes issus de ces espèces de lémuriens sont suivis

régulièrement pour des études de comportement et habitués à la présence humaine pour les visites touristiques. L'échantillonnage des lémuriens s'est ainsi fait par convenance et grâce à la collaboration avec des biologistes et agents de recherche du PNR. Les lémuriens sont marqués et identifiés par des colliers émetteurs et colliers de couleur. Ce marquage des animaux a permis l'identification des lémuriens lors de la collecte individuelle des échantillons issus des lémuriens. Chaque individu des quatre groupes de Propitèque d'Édouard, trois groupes de lémur à ventre roux et un groupe de grand hapalémur a été échantillonné. De plus quatre individus de Microcèbe roux ont été échantillonnés.

2.2.2 Humains

Dans chacun des villages étudiés et avant la période de collecte, le projet a été présenté à l'ensemble du village. Sur une base volontaire, une fiche de consentement pour participer à ce projet a été signée par au moins un membre adulte de chacun des ménages. Dans chacun des villages, nous avons effectué un échantillonnage par agrégats (« cluster sampling ») où, parmi les ménages ayant complétés la fiche de consentement, 10 ménages ont été sélectionnés de manière aléatoire suite à un tirage au sort. Chaque personne composant ce ménage a ensuite été invitée individuellement à participer de manière volontaire à l'étude. Avant leur recrutement au sein de l'étude, l'approbation des parents a été obtenue pour les enfants âgés de moins de 6 ans.

2.2.3 Animaux domestiques

Tous les mammifères domestiques issus des espèces suivantes : zébu (*Bos indicus*), porc (*Sus scrofa*), chien (*Canis familiaris*), chat (*Felis catus*) appartenant aux ménages sélectionnés ont également fait partie de l'étude. Des échantillons ont été collectés à partir des animaux avec le consentement des propriétaires.

2.2.4 Rongeurs sauvages

En plus des animaux domestiques, des échantillons fécaux issus de rongeurs sauvages et péri domestiques soit des rats (*Rattus rattus*) et souris (*Mus musculus*) ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration avec une recherche sur la peste et hantavirose. Pour cela, 10

pièges de type Shermann (Tomahawk Live Trap LLC., Hazelhurst, WI, USA) ont été placés dans chacun des ménages sélectionnés. Ces pièges ont été appâtés à l'aide d'un mélange de beurre d'arachide, de bananes et de flocons d'avoine par la méthode décrite par Astua et al. (2006) pour la capture de rongeurs. Les rongeurs capturés ont été anesthésiés et euthanasiés suite à un surdosage d'isoflurane (Abbott Laboratories, North Chicago, IL) en vue d'étudier la présence et la prévalence de peste et d'Hantavirose dans le même écosystème.

2.3 Collecte des données

La collecte des données et échantillons pour cette étude s'est déroulée entre le 22 juin et le 8 juillet 2011, soit pendant la saison sèche.

Pour chacun des sujets d'étude, les coordonnées géographiques du lieu de collecte de l'échantillon ont été enregistrées à l'aide d'un GPS, ainsi que l'espèce, le sexe et la classe d'âge de l'individu. Deux classes d'âge ont été définies chez les humains, les jeunes (subadultes) correspondants à tout individu de moins de 15 ans et les adultes pour une personne âgée de 15 ans ou plus. Pour la plupart des animaux, l'âge exact étant inconnu, la détermination des classes d'âge de l'individu s'est fait visuellement et deux classes d'âge ont été définies. Nous avons défini par subadultes les animaux qui semblent visuellement immatures et présentent des caractères morphologiques ou comportementaux immatures lors de l'étude par opposition aux adultes. Pour les humains, les animaux domestiques et les rongeurs péri domestiques, le village et le ménage d'appartenance de l'individu ont été enregistrés.

2.4 Collecte des échantillons fécaux

Pour chaque sujet d'étude, des échantillons de fèces fraîches ont été collectés. Pour les lémuriniens, les échantillons fécaux ont été obtenus de manière opportuniste et non invasive chez des individus des espèces étudiées. Un échantillon d'environ 5 g de fèces issus de chaque individu a été collecté sur le sol immédiatement après la défécation. Pour les microcèbes roux, environ 1 g de fèces a été récolté au fond des pièges Sherman utilisés pour capturer les individus en vue d'études sur leur biologie et comportement. De plus, des échantillons

provenant de rats sauvages (*Rattus rattus*) issus du parc national ont été obtenus dans des pièges placés au sein du PNR en vue de capturer des microcèbes roux.

Dans les villages bordant le PNR, chaque personne enrôlée dans l'étude a été invitée à soumettre un échantillon de fèces recueillies le jour même dans un tube en plastique stérile préalablement identifié. Chez les animaux domestiques, un échantillon de fèces a été obtenu soit directement à partir du rectum avec le consentement du propriétaire, soit de manière non invasive immédiatement après la défécation. Aussi, environ 1 g d'échantillon de fèces a été collecté de manière non invasive à l'intérieur des pièges ayant servis à capturer les rongeurs sauvages et péri domestiques.

Chaque échantillon a été examiné macroscopiquement immédiatement après la collecte pour noter la consistance et la présence éventuelle de mucus ou de parasites. Un maximum de 5 g de l'échantillon a été placé dans un tube de 15 ml contenant 10 ml de solution de formol tamponné à 10 %.

2.5 Analyse des échantillons

2.5.1 Importation des échantillons

Les échantillons ont été conditionnés en suivant les directives de l'Association internationale des transports aériens pour le transport des marchandises dangereuses et de l'Agence canadienne de l'inspection des aliments (ACIA) visant l'importation des échantillons au Canada. Ces directives requéraient l'homogénéisation des échantillons formolés en plaçant chaque tube d'échantillon sur une plateforme mobile pendant 72 heures et la mise en place d'un emballage étanche et individuel de chaque tube par une double couche de papier absorbant. L'exportation au départ de Madagascar a été autorisée par la direction des services vétérinaires et l'importation au Canada permise par le Bureau du confinement des biorisques et de la sécurité de l'ACIA.

2.5.2 Détection de *Giardia* et *Cryptosporidium*

Les échantillons ont été analysés à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal par la méthode d'immunofluorescence. Ce protocole divisé en deux parties permet dans un premier temps de concentrer les kystes et oocystes contenu dans une masse

prédéterminée d'échantillon fécal et dans un second temps l'analyse quantitative des échantillons.

2.5.2.1 Préparation des échantillons de fèces et concentration des kystes et oocystes

Le tube conique contenant l'échantillon fécal est centrifugé à 4 500 rpm pendant 10 minutes afin de décanter l'échantillon de fèces et le séparer de la solution de formol. Trois grammes d'échantillon de fèces sont pesés et homogénéisés avec 10 ml de solution saline tamponnée. Cette suspension est ensuite filtrée à travers une couche de compresses chirurgicales afin de séparer les débris de matières fécales. Le filtrat est déposé au dessus de 5 ml de solution de sucrose (densité 1,2) au sein d'un tube à centrifuger de 15 ml qui est centrifugé pendant 5 minutes à 4 500 rpm. La couche supérieure ainsi que l'interface entre les solutions de saline tamponnée et sucrose ont été collectés soigneusement à l'aide d'une pipette puis transférés dans un tube à centrifuger. Ce tube est ensuite centrifugé de nouveau pendant 5 minutes à 4 500 rpm afin de concentrer les éléments parasitaires au culot. Le surnageant est retiré et le culot mis en suspensions dans 1 ml de solution saline tamponnée.

2.5.2.2 Protocole pour détection des kystes de *Giardia* et Oocystes de *Cryptosporidium* selon la méthode d'immunofluorescence

La suspension ainsi obtenue est soumise à l'analyse des kystes de *Giardia* et oocystes de *Cryptosporidium* grâce à la trousse commerciale à immunofluorescence Merifluor *Cryptosporidium/Giardia*® (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH, USA) selon la méthode décrite par le fabricant. Brièvement, la suspension préparée est secouée vigoureusement et agitée au vortex. Un volume de 15 µl de la suspension est prélevé et transféré à l'aide d'une pipette dans le puits d'une lame préalablement préparée et fixée au méthanol. Un volume de 15 µl de contrôle positif est prélevé et transféré à l'aide d'une pipette dans un le puits d'une lame préalablement préparé et fixée au méthanol. La lame est séchée à l'air libre pendant une heure. Une goutte de liquide de détection contenant des anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium* et anti-*Giardia* marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine est versée dans chacun des puits de la lame. Une goutte de contre colorant est ajoutée dans chacun des puits de la lame. La lame est ensuite incubée dans le noir et à température ambiante pendant 1 heure. Chaque puits de la lame est rincé délicatement à l'aide de la

solution de lavage afin d'éliminer le surplus de réactif et de contre colorant. Chaque lame est examinée au microscope à immunofluorescence équipé d'un système de filtre pour l'isothiocyanate de fluorescéine à faible grossissement (20x) afin de détecter les kystes de *Giardia* et oocystes de *Cryptosporidium*. La présence d'oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* est confirmée par un examen à fort grossissement 40x et 63x. Un échantillon est considéré positif à *Giardia* lorsqu'un kyste pyriforme fluorescent de couleur vert pomme et d'une taille d'environ 10 µm de large pour 15 µm de long est détecté. Un échantillon est considéré positif à *Cryptosporidium* lorsqu'un oocyste ovoïde fluorescent de couleur vert pomme d'environ 5 µm de diamètre est détecté.

2.5.3 Détection des helminthes

Les échantillons ont ensuite été analysés par la méthode de flottation et double centrifugation à l'aide d'une solution sucrée de densité 1,2 telle que décrite par Foreyt (2001) pour la détection d'œufs d'helminthes. Brièvement, un maximum de 2 g de fèces est homogénéisé dans 10 ml d'eau. Ce mélange est ensuite filtré à travers une couche de compresses chirurgicales et versé dans un tube à centrifugation de 15 ml. Ce tube est centrifugé pendant 10 minutes à 1 500 rpm et le surnageant est retiré. Le tube est de nouveau rempli avec une solution sucrée et le contenu est homogénéisé. Quelques gouttes de solution de flottation sont ajoutées au tube ainsi rempli afin de former un ménisque. Une lamelle est posée au dessus du tube directement en contact avec la suspension. Le tube est ensuite centrifugé à 1 500 rpm pendant 10 minutes. La lamelle est collectée puis placée sur une lame porte objet afin de l'examiner au microscope optique. Les œufs et larves parasites sont identifiés grâce aux mesures et caractères morphologiques des parasites tels que décrits chez l'homme (Foreyt, 2001), chez les animaux domestiques et rongeurs péri domestiques (Bowman et Georgi, 2009) et les lémuriers (Chabaud A.G., 1959; Chabaud et al., 1961; Chabaud A.G., 1965; Blancou, 1976; Clough, 2009; Irwin et Raharison, 2009).

2.6 Analyse des données

2.6.1 Estimation des prévalences

Les prévalences observées d'excrétion parasitaire ont été estimées. La prévalence pour un genre de parasite est définie par la proportion d'individus chez qui ce parasite a été observée par rapport au nombre d'individus échantillonnés. Les prévalences et les intervalles de confiance à 95 % ont été estimées en utilisant la procédure PROC SURVEYFREQ du logiciel Statistique SAS 9.3® (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Pour l'estimation des intervalles de confiance, la variance a été ajustée pour le devis d'étude par grappe en raison de la non-indépendance attendue entre les données issues des humains ou des animaux d'un même ménage. En effet, les agents infectieux sont généralement agrégés dans le temps et l'espace ainsi, les individus (humains ou animaux) groupés au sein d'un agrégat (famille, enclos ou groupe) ont plus de chance de présenter le même statut par rapport à l'agent infectieux

Les prévalences ont également été estimées pour chaque site de collecte (village et PNR), pour chaque espèce, catégorie d'âge et sexe des individus. En cas d'absence de détection des parasites d'intérêt chez les lémuriniens, la prévalence maximale des protozoaires a été calculée en utilisant le logiciel WIN EPISCOPE 2.0 et considérant une population totale de lémuriniens de 45 000 individus (Wright et al., 2012) pour un intervalle de confiance à 95 %.

2.6.2 Évaluations des facteurs de risque

Les variables associées à la présence d'infections par les différents protozoaires ont été évaluées à l'aide d'un modèle de régression logistique. Ainsi, un modèle linéaire généralisé (GLM) estimé par des équations d'estimation généralisées (GEE) a été construit en utilisant la procédure PROC GENMOD du logiciel SAS 9.3® (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Le GEE a permis de modéliser la présence ou l'absence de *Giardia* ou *Cryptosporidium* dans les échantillons fécaux (variable expliquée Y) suivant une distribution binomiale et reliée aux variables explicatives (X) via une fonction logit. Ce modèle permet d'ajuster pour la présence d'agrégats au sein des ménages d'appartenance et groupes d'individus en utilisant la fonction « repeated » qui permet d'ajuster la variance. Autrement dit, l'effet des différentes variables explicatives telles que le village d'appartenance de l'individu, l'espèce, la catégorie d'âge

(subadulte ou adulte), le sexe de l'individu, la co-infection par un protozoaire (*Giardia* ou *Cryptosporidium*) ou un helminthe a été étudié pour prédire la présence de *Giardia* ou *Cryptosporidium* dans un échantillon fécal. Les variables explicatives sont présentées et décrites dans le tableau III.

Tableau III : Variables explicatives des modèles de régression logistique pour l'infection à *Giardia* et *Cryptosporidium*.

Variable	Valeurs possibles
Espèce	zébu, chien, porc, humain, rongeurs
Localisation	village 1, village 2, village 3
Catégorie d'âge	subadulte, adulte
Sexe	mâle, femelle
Co-infection par Ascaridida	oui, non
Co-infection par Strongylida	oui, non
Co-infection par Enoplida	oui, non
Co-infection par Cyclophyllidea	oui, non
Co-infection par <i>Giardia</i>	oui, non
Co-infection par <i>Cryptosporidium</i>	oui, non

Un modèle de régression logistique incluant toutes les variables explicatives a été construit, les variables explicatives non significatives ont ensuite été éliminées du modèle par un processus itératif soustractif avec comme valeur seuil $p > 0,05$ comme critère d'exclusion.

Pour chaque variable significative, les rapports de cotes (RC) ont été calculés en exponentialisant l'estimé du paramètre de régression. La catégorie chez qui l'on anticipait une plus faible prévalence fut choisie comme catégorie de référence.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Échantillonnage

Au sein des villages, des échantillons fécaux ont été obtenus de 183 humains issus de 30 ménages. A ceux-ci s'ajoutent 105 échantillons d'animaux domestiques dont 76 zébus, 22 porcs, 5 chiens et 2 chats. De plus, 89 échantillons issus de rongeurs péri domestiques ont été récoltés dans les ménages. Additionnellement, 38 échantillons de lémuriens issus de 4 espèces et 14 échantillons de rats ont été obtenus à l'intérieur du PNR. Ainsi, un total de 424 échantillons ont été analysés selon les méthodes décrites précédemment pour la recherche de *Cryptosporidium*, *Giardia* et d'helminthes. Le tableau IV montre la répartition des échantillons collectés en fonction de l'espèce, la catégorie d'âge, la localisation et le sexe de l'individu.

3.2 Résultats des analyses coprologiques

Tous les échantillons collectés étaient de consistance normale pour l'espèce et aucun parasite n'a été observé macroscopiquement.

3.2.1 *Cryptosporidium* et *Giardia*

Des structures parasitaires ovoïdes à pyriformes arborant une coloration caractéristique vert pomme ont été retrouvées dans les échantillons fécaux issus, d'humains, bovins, porcins, chiens, et rongeurs de l'écosystème du PNR. Ces structures mesurant entre 15 et 18 μm de long pour 10 μm de large sont des kystes parasitaires de *Giardia*, vraisemblablement *G. lamblia* ou *G. muris* (Figure 7). Des kystes parasitaires de *Giardia* ont été retrouvés dans 98 (23,1 % (Intervalle de confiance à 95 % 15,5 – 30,4)) échantillons d'humains, d'animaux domestiques et de rongeurs. Aucun lémurien ne s'est révélé positif à *Giardia*. Basé sur ce résultat, la prévalence maximale théorique de *Giardia* chez les lémuriens calculée grâce à WIN EPISCOPE® est de 7,6 %.

Des structures parasitaires ovoïdes mesurant entre 4,0 et 5,3 μm de diamètre et colorant vert pomme lors des tests à l'immunofluorescence spécifiques à *Giardia/Cryptosporidium* ont été retrouvés dans les échantillons issus d'humains, d'animaux domestiques et d'animaux sauvages à Ranomafana. Ces structures correspondent à des oocystes de *Cryptosporidium*, vraisemblablement à *C. parvum*, *C. hominis* ou *C. muris*

(Figure 8). *Cryptosporidium* a été retrouvé dans 80 (20,7 %, IC 95 % :15,7 – 25,7) échantillons d'humains, animaux domestiques et rongeurs. De plus, des oocystes de *Cryptosporidium* mesurant 5 µm de diamètre ont été retrouvés chez deux grand hapalémurs et deux microcèbes roux échantillonnés. Ainsi, la prévalence observée de ce protozoaire chez les lémuriens échantillonnés dans le PNR est de 10,5 % (IC 95 % 0,5 – 21 %). Le tableau V présente les prévalences de *Cryptosporidium* et *Giardia* chez les sujets d'étude en fonction de l'espèce, le sexe, la classe d'âge des individus échantillonnés ainsi que leur localisation. La co-infection par *Giardia* et *Cryptosporidium* (Figure 9) a été détectée chez 50 (11,8 %) individus.

Tableau IV : Individus échantillonnés en fonction de l'espèce, la catégorie d'âge, la localisation et le sexe.

Espèce	Catégorie d'âge		Localisation				Sexe	
	Subadulte	Adulte	Village 1	Village 2	Village 3	PNR ¹	Femelle	Mâle
Humain	84	99	47	61	75	0	81	102
Zébu	13	63	14	35	27	0	32	44
Porc	3	19	4	1	17	0	6	16
Chien	2	3	4	1	0	0	1	4
Chat	0	2	0	0	2	0	1	1
Rongeurs	16	82	29	20	35	14	51	47
Microcèbe roux	0	4	0	0	0	4	2	2
Grand hapalémur	2	2	0	0	0	4	2	2
Propithèque	2	10	0	0	0	12	7	5
Lémur à ventre roux	0	18	0	0	0	18	9	9
Total	122	302	98	118	156	52	192	232

¹ PNR : Parc national de Ranomafana

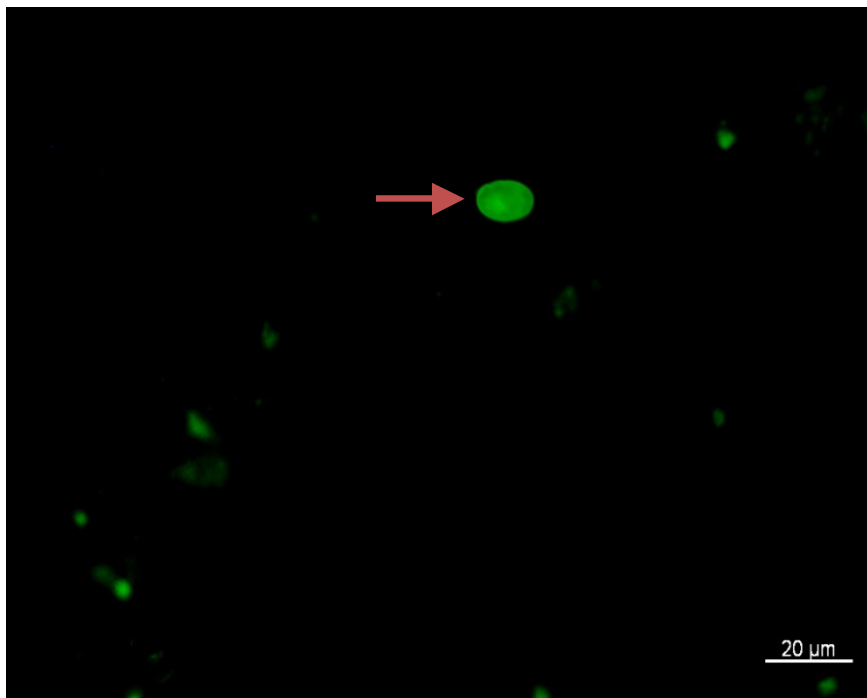


Figure 7 : Kyste de *Giardia* (flèche) à l'examen de fèces par immunofluorescence directe chez un humain (Source : F. Rasambainarivo).

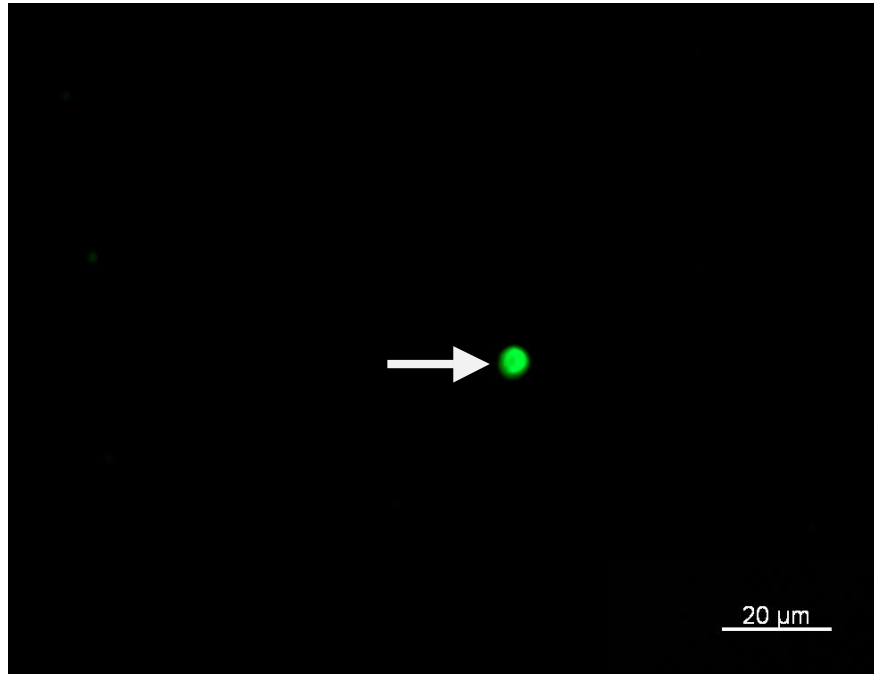


Figure 8 : Oocyste de *Cryptosporidium* (flèche) à l'examen de fèces par immunofluorescence directe chez un microcèbe roux. (Source : F. Rasambainarivo)

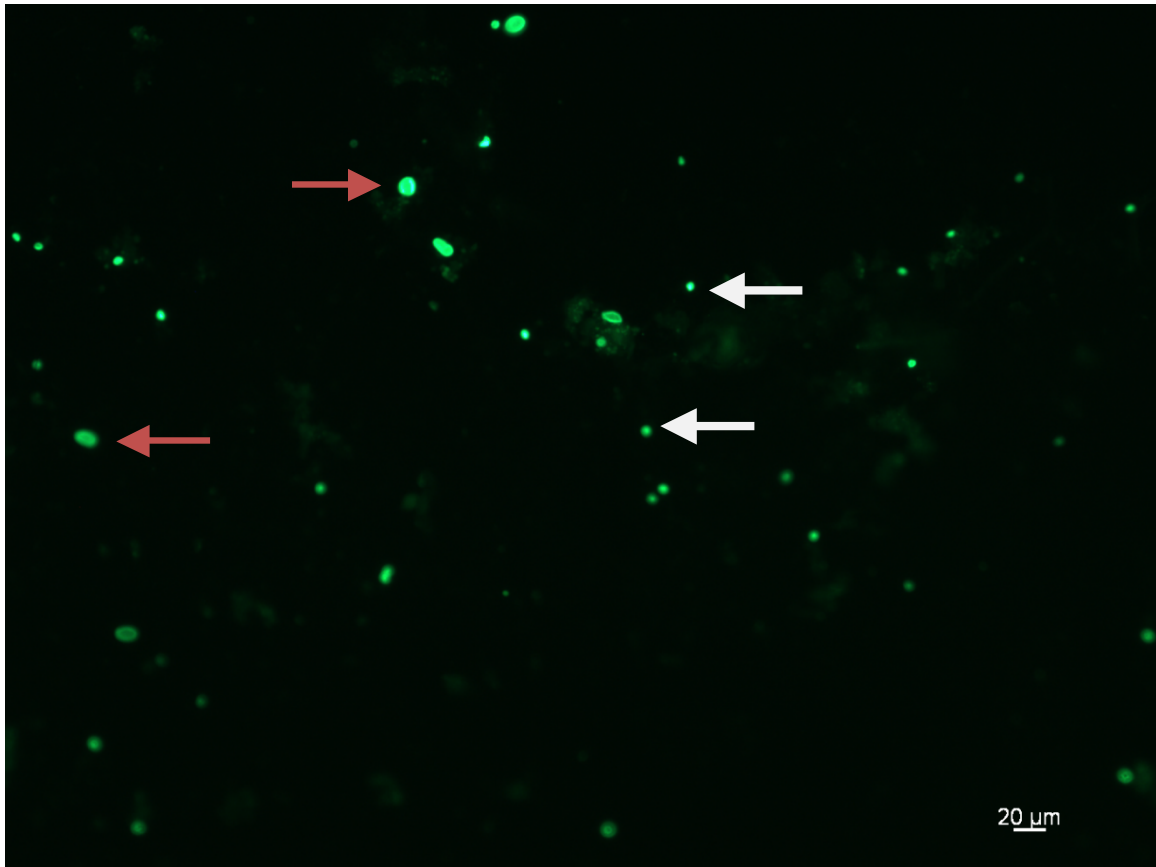


Figure 9 : Kystes de *Giardia* (flèches rouges) et oocystes de *Cryptosporidium* (flèches blanches) dans un échantillon fécal examiné par immunofluorescence directe chez un humain. (Source : F. Rasambainarivo)

Tableau V : Prévalences observées (%) de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les humains, animaux domestiques, rongeurs et lémuriens de l'écosystème de Ranomafana (juillet 2011).

Variables	n	Prévalence % (IC 95 %) ¹	
		<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>
Espèce			
Humain	183	23,0 (15,5 - 30,4)	13,7 (8,3 - 19,1)
Zébu	76	19,7 (10,4 - 29,1)	26,3 (11,9 - 40,7)
Porc	22	50,0 (26,6 - 73,4)	22,7 (0 - 45,8)
Chien	5	60,0 (15,0 - 95,0)	40,0 (5,0 - 85,0)
Chat	2	0	0
Rongeurs	98	27,6 (16,1 - 39,0)	28,6 (15,1 - 42,0)
Villages	84	29,8 (19,8 - 39,7)	31,0 (20,9 - 41,0)
PNR ³	14	14,3 (0 - 35,3)	14,3 (0 - 35,3)
Propithèque d'Édouard	12	0	0
Grand hapalémur	4	0	50 (6,8 - 93,2)
Lémur à ventre roux	18	0	0
Microcèbe roux	4	0	50 (0 - 100)
Catégorie d'âge			
Subadulte	122	41,8 (32,8 - 50,8)	35,3 (25,4 - 45,2)
Adulte	302	15,6 (11,2 - 19,9)	13,6 (7,8 - 19,4)
Sexe			
Mâle	232	25,4 (19,4 - 31,5)	22,8 (16,1 - 29,6)
Femelle	192	20,3 (13,7 - 27,0)	16,2 (9,6 - 22,7)
Localisation²			
Village 1	98	27,6 (16,5 - 38,6)	25,5 (18,3 - 32,7)
Village 2	118	24,6 (14,6 - 34,6)	22,9 (7,4 - 38,4)
Village 3	156	25,6 (18,4 - 32,9)	16,7 (5,2 - 28,1)
PNR ³	52	3,9 (0 - 11,3)	11,5 (0,5 - 22,6)
Total	424	23,1 (18,7 - 27,5)	19,8 (14,1 - 25,5)

¹ Intervalles de confiance à 95 %.

² Villages (animaux domestiques, humains, rongeurs); PNR : Parc National de Ranomafana (lémuriens, rongeurs).

³ PNR : Parc national de Ranomafana

3.2.2 Helminthes

Le tableau VI présente les caractéristiques morphologiques des helminthes retrouvés dans les échantillons collectés.

Le tableau VII présente les prévalences des différents ordres d'helminthes retrouvés chez les sujets d'études en fonction de l'espèce, le sexe, la classe d'âge des individus échantillonnés ainsi que leur localisation.

3.2.2.1 Ordre Ascaridida

Chez 49,2 % (IC : 39,7 – 58,7 %) des humains et 27,3 % (IC : 12,9 % - 31,9 %) de porcs, des œufs de forme sphériques d'environ 45 µm de diamètre présentant une épaisse couche externe d'aspect granulaire ont été détectés dans les échantillons fécaux après flottation. Ces œufs appartiennent aux espèces *Ascaris lumbricoides* et *A. suum*. Des œufs infertiles de ces espèces mesurant environ 88 µm de long pour 45 µm de large ont également été retrouvés dans les échantillons fécaux. Chez 2,6 % des bovins, des œufs ovoïdes de 69 à 90 µm de long pour 60 à 75 µm de large présentant un épaisse couche externe ont été détectés. Ces œufs appartiennent à *Toxocara vitullorum*. De même, tous les chats (n = 3) et les chiens (n = 5) arboraient des œufs de parasites pourvus d'une couche externe et mesurant entre 72 et 85 µm ou entre 65 et 80 µm de diamètre correspondant respectivement à *Toxocara* et *Toxascaris*. Des œufs de parasites, de 30-40 µm de long pour 20-30 µm de large, ovoïdes et présentant une coque épaisse et granulaires ont été détectés chez deux des quatre microcèbes. Ces parasites font vraisemblablement partie de l'ordre des Ascaridida mais n'ont pas pu être identifiés plus précisément.

La Figure 10 présente les parasites de l'ordre des Ascaridida détectés chez différentes espèces hôtes du PNR.

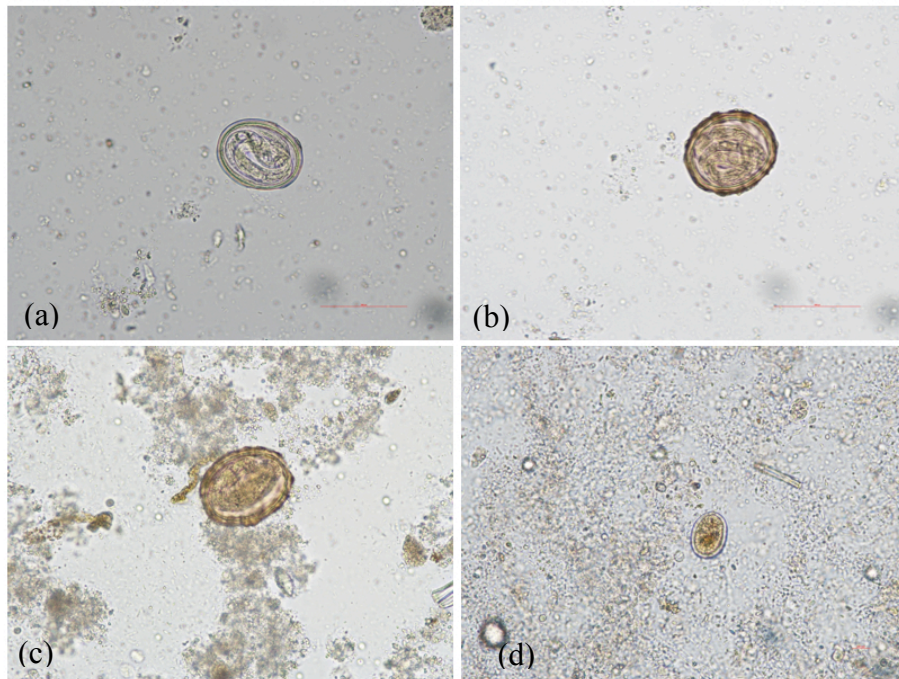


Figure 10 : Œufs de parasites de l'ordre Ascaridida détectés : (a) *Toxocara*, (b) *Toxascaris*, (c) *Ascaris* (d) non identifié issu de lémuriens. (Grossissement x 10) (Source : F. Rasambainarivo)

3.2.2.2 Ordre Strongylida

Chez l'homme, des œufs de parasites de forme elliptiques et mesurant entre 60 - 75 μm de long pour 35 - 40 μm de large et pourvus d'une coque lisse et fine ont été détectés dans les fèces. Ces œufs appartenant aux parasites du genre *Ancylostoma* ou *Necator* ont été détectés chez 6,6 % des échantillons. Chez les bovins, des œufs de parasites ovoïdes de 80 - 100 μm de long pour 40 - 50 μm de large ont été détectés dans 22,4 % des fèces examinés. Ces œufs appartiennent probablement aux parasites du genre *Trichostrongylus*. Chez les porcs, deux genres de parasites de l'ordre des Strongylida ont été détectés dans les fèces. Les premiers, appartiennent au genre *Hyostromylus* et sont des œufs de forme ovoïdes, présentant une coque fine et mesurant 69 - 85 μm de long pour 39 - 45 μm de large et ont été détectés chez 45 % des individus. Les autres, appartiennent au genre *Metastrongylus* et sont des œufs de forme ovoïde et mesurant 50 - 60 μm de long pour 33 - 40 μm de large et ont été détectés chez 32 % des individus. Tous les chiens arboraient des œufs de parasites pourvus d'une coque externe

fine et mesurant entre 60 - 75 μm de long pour 35 - 40 μm de large correspondant à des parasites du genre *Ancylostoma*. Des œufs de parasite du genre *Nippostrongylus* ont été détectés dans les fèces des rongeurs. Ces œufs sont de forme ovoïde mesurent entre 60 μm de long et 30 μm de large. Des œufs ovoïdes mesurant 70 μm de long pour 40 μm de larges ont été détectés dans les fèces issus de grands hapalémur et de lémurs à ventre roux. Ces œufs appartiennent aux parasites du genre *Pararhabdonema*. La Figure 11 présente les parasites de l'ordre Strongylida retrouvés chez différents hôtes de l'écosystème du PNR.

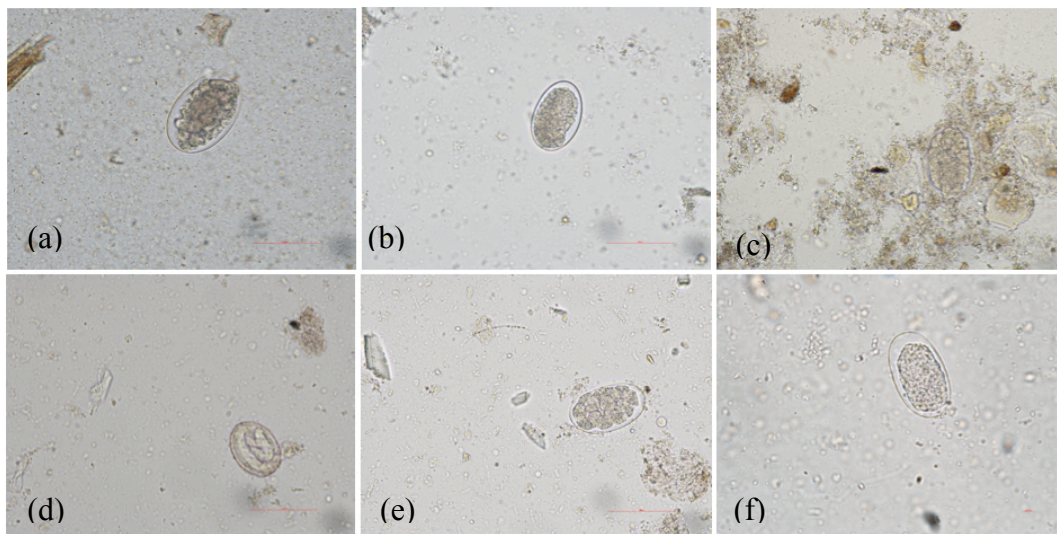


Figure 11 : Œufs de parasites de l'ordre Strongylida détectés : (a) *Trichostrongylus*, (b) *Ancylostoma*, (c) *Ancylostoma* [chien], (d) *Metastrongylus*, (e) *Hyostrongylus*, (f) *Pararhabdonema*. (Grossissement x 10) (Source : F. Rasambainarivo).

3.2.2.3 Ordre Enoplida

Des œufs du genre *Trichuris* ont été retrouvés chez 40 % des chiens, 36,1 % des humains, 18 % des porcs et un bovin. Les œufs de *Trichuris* sp. sont pourvus d'une coque épaisse, ovoïdes et possèdent les protubérances bipolaires caractéristiques du genre. Chez les humains, les œufs mesurent entre 50 - 55 μm de long pour 25 - 30 μm de large, contre 50 - 60 μm x 33 - 40 μm chez les porcs, et 40 μm x 75 μm chez les chiens. Chez le bovin, les œufs de *Trichuris* sp. retrouvés mesuraient 70 - 80 μm de long pour 30 - 40 μm de large.

3.2.2.4 Ordre Oxyurida

Des œufs de nématodes de l'ordre Oxyurida ont été détectés chez les lémuriens uniquement. Deux genres de parasites ont pu être identifiés *Lemuricola* et *Callistoura* chez les lémurs à ventre roux. Les œufs de *Lemuricola* retrouvés dans les fèces de lémuriens sont ovoïdes et présentent une coque fine et asymétrique avec un côté aplati. Ils mesurent entre 86 μm et 97 μm de long pour une largeur variant de 44 à 55 μm . Les œufs de *Callistoura* sont également ovoïdes et asymétriques et mesurent entre 55 et 61 μm de long pour une largeur variant de 27 à 32 μm . Ils possèdent une coque épaisse striée et arborent un opercule à une des extrémités. La Figure 12 présente les œufs de parasites appartenant à l'ordre Oxyurida retrouvés chez les lémuriens.

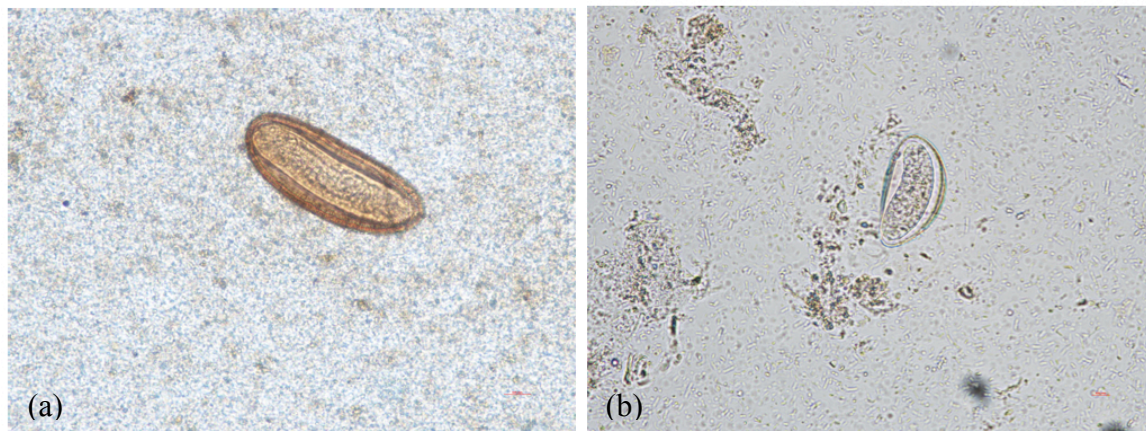


Figure 12 : Œufs de parasites de l'ordre Oxyurida détectés (a) *Callistoura*, (b) *Lemuricola*. (Grossissement x40) (Source : F. Rasambainarivo)

3.2.2.5 Ordre Cyclophyllidea

Des cestodes de l'ordre des Cyclophyllidea ont été retrouvés chez les humains, les chiens et les rongeurs. Chez les humains, les bovins et les chiens, des œufs circulaires de Taenidés de 30 à 35 μm de diamètre contenant six crochets ont été détectés. Ces œufs appartiennent probablement au genre *Taenia*. Chez les rongeurs des œufs d'*Hymenolepis* ont été détectés. Ces œufs ont une forme circulaire d'environ 70 μm de diamètre présentant une membrane externe striée et une membrane externe plus fine et un espace inter membranaire légèrement granulaire. L'oncosphère possède 6 crochets.

La Figure 13 présente un œuf de cestode du genre *Hymenolepis* retrouvé chez les rongeurs.



Figure 13 : Œuf d'*Hymenolepis nana* détecté dans un échantillon fécal issu de rongeurs du PNR. (Grossissement x 60) (Source : F. Rasambainarivo).

3.2.2.6 Ordre Strigeidida

Des œufs de parasite appartenant à l'ordre des Strigeidida ont été détectés chez des humains. Ces œufs sont ovoïdes avec une coque fine et mesurent 140 μm de long pour 60 μm de large. Ils présentent une épine latérale de 3 μm de long. Ces œufs appartiennent vraisemblablement à l'espèce *Schistosoma mansoni*. La figure 13 représente un œuf de *Schistosoma mansoni* retrouvé dans les fèces d'un humain de l'écosystème du PNR.

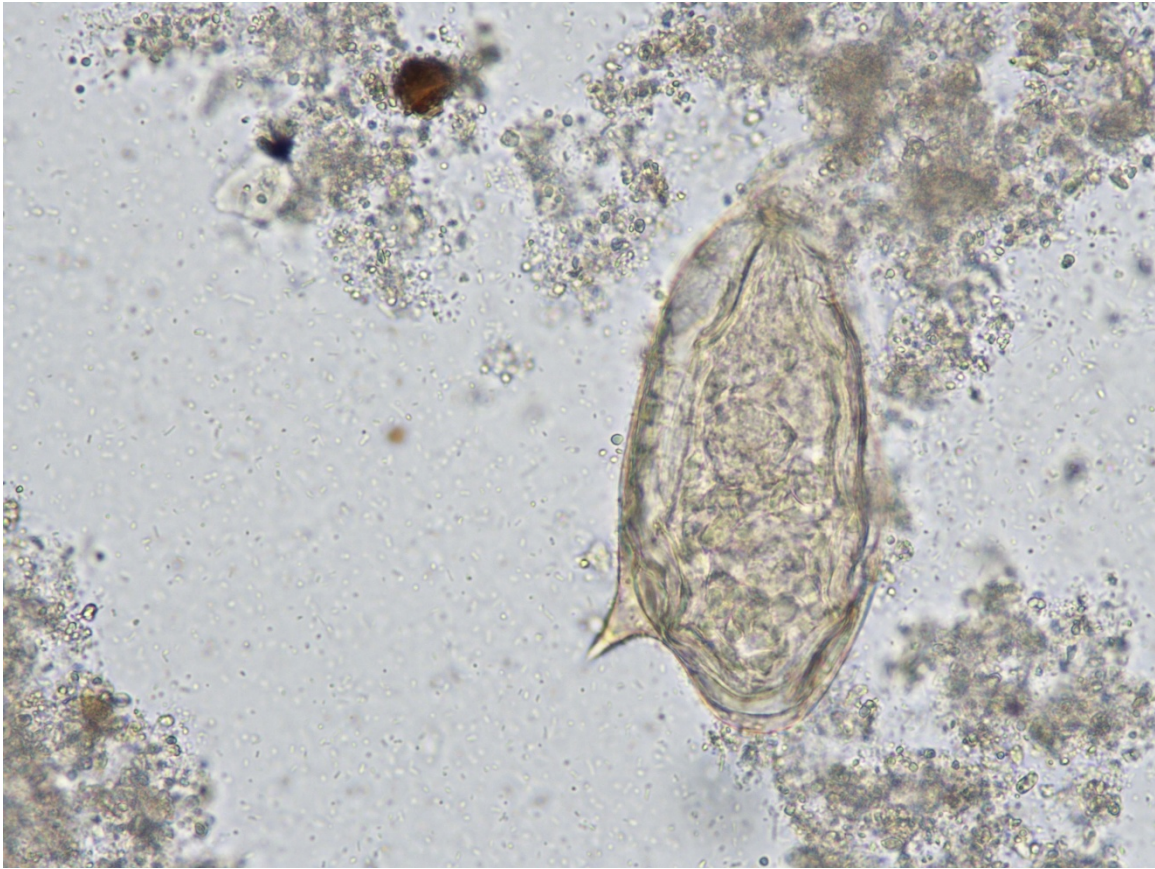


Figure 14 : Œuf de *Schistosoma mansoni* détecté dans un échantillon fécal d'humain de l'écosystème du PNR. (Grossissement x60) (Source F. Rasambainarivo).

Tableau VI : Identification et caractères morphologiques des helminthes retrouvés chez les humains, animaux domestiques et lémuriens de l'écosystème du PNR.

Ordre	Genre	Espèce hôte	Longueur (µm)	Largeur (µm)	Forme	Autres caractères morphologiques	Figure
Ascaridida	<i>Ascaris</i>	humain, porc	45 - 80	40 - 60	sphérique à ovoïde	coque épaisse et granulaire	Fig 10-c
	<i>Toxocara</i>	chien	72 - 85	72 - 85	sphérique à ovale	coque épaisse et granulaire	Fig 10-b
	<i>Toxascaris</i>	chien, chat	65	80	ovale	coque épaisse et lisse	Fig 10-a
	Inconnu	microcèbe roux			ovale	coque épaisse et granulaire	Fig 10-d
	<i>Toxocara</i>	zébu	69 - 90	60 - 75	ovale	coque épaisse et granulaire	-
Strongylida	<i>Ancylostoma</i>	humain, chien	60 - 75	35 - 40	elliptique	coque fine et lisse	Fig 11-b
	<i>Trichostrongylus</i>	zébu	80 - 100	40 - 50	elliptique	coque fine et lisse	Fig 11-a
	<i>Hyostrongylus</i>	porc	69 - 85	39 - 45	elliptique	coque fine et lisse	Fig 11-e
	<i>Metastrongylus</i>	porc	50 - 60	33 - 40	ovale	coque épaisse claire, œuf embryonné	Fig 11-d
	<i>Nippostrongylus</i>	rongeurs			ovoïde	coque épaisse et lisse	-
	<i>Pararhabdonema</i>	propithèque d'Edouard et microcèbe roux	70 - 80	38 - 48	elliptique	coque fine et lisse	Fig 11-f

Ordre	Genre	Espèce hôte	Longueur (µm)	Largeur (µm)	Forme	Autres caractères morphologiques	Figure
Enoplida	<i>Trichuris</i>	humain	50 – 55	25 - 30	elliptique	coque épaisse et lisse, opercules bipolaires	-
	<i>Trichuris</i>	porc	50 - 60	20 - 30	elliptique	coque épaisse et lisse, opercules bipolaires	-
	<i>Trichuris</i>	zébu	70 - 80	30 - 40	elliptique	coque épaisse et lisse, opercules bipolaires	-
	<i>Trichuris</i>	chien	40	75	ovale	coque épaisse et lisse, opercules bipolaires	-
Oxyurida	<i>Lemuricola</i>	Lémur a ventre roux	57 - 103	23 - 45	ovoïde	coque fine, asymétrique parfois embryonné	Fig 12-b
	<i>Callistoura</i>	Lémur a ventre roux	90 - 100	40 - 45	ovoïde	coque épaisse, asymétrique, operculum	Fig 12-a
Cyclophyllidea	<i>Taenia</i>	humain, zébu	30	30	circulaire		
	<i>Hymenelopsis</i>	rongeurs	70	70	circulaire		Fig 13
Strigeidida	<i>Schistosoma</i>	humain	140	60	ovoïde	coque fine, épine latérale	Fig 14

Tableau VII : Prévalences estimées et intervalles de confiance à 95 % (IC95 %) des ordres d'helminthes détectés chez les humains, animaux domestiques, rongeurs et lémuriens de l'écosystème de Ranomafana (juillet 2011).

Variable	n	Ascaridida	Strongylida	Enoplida	Cyclophyllidea	Oxyurida
		Prévalence (IC95 %)¹	Prévalence (IC95 %)¹	Prévalence (IC95 %)¹	Prévalence (IC95 %)¹	Prévalence (IC95 %)¹
Espèce						
Humain	183	49,2 (39,7 - 58,7)	6,6 (3,4 - 9,7)	36,1 (24,2 - 48,0)	3,3 (0,5 - 6,1)	0
Zébu	76	2,6 (0 - 6,4)	22,4 (12,9 - 31,9)	1,32 (0 - 4,1)	0	0
Porc	22	27,3 (2,9 - 51,6)	54,6 (35,8 - 73,2)	18,2 (0 - 43,1)	0	0
Chien	5	100 (47,8 - 100)	100 (47,8 - 100)	40 (0 - 100)	0	0
Chat	2	100 (15,8 - 100)	0	0	0	0
Rongeurs	98	0	33,7 (23,2 - 44,1)	11,2 (5,4 - 17,1)	30,6 (17,0 - 44,2)	0
PNR³	14	0	28,6 (1,5 - 55,6)	7,14 (0 - 22,6)	28,6 (1,5 - 55,6)	0
Villages	84	0	34,5 (24,1 - 44,9)	11,9 (4,8 - 19,0)	35,7 (25,3 - 46,2)	0
Propithèque d'Édouard	12	0	0	0	0	0
Grand hapalémur	4	0	100 (39,8 - 100)	0	0	0
Lémur à ventre roux	18	0	11,1 (0 - 39,7)	0	0	27,8 (0 - 72,1)
Microcèbe roux	4	50,0 (0 - 100,0)	25,0 (0 - 100)	0	0	0
Catégorie d'âge						
Subadulte	122	40,2 (28,5 - 51,8)	18,0 (11,1 - 25,0)	37,7 (25,3 - 50,1)	9,0 (3,4 - 14,6)	0
Adulte	302	19,2 (14,4 - 24,1)	21,2 (16,6 - 25,8)	12,3 (7,8 - 16,8)	8,3 (3,9 - 12,6)	1,7 (0 - 4,4)

Variable	n	Ascaridida	Strongylida	Enoplida	Cyclophyllidea	Oxyurida
		Prévalence (IC95 %)¹	Prévalence (IC95 %)¹	Prévalence (IC95 %)¹	Prévalence (IC95 %)¹	Prévalence (IC95 %)¹
Sexe						
Male	232	27,6 (21,1 - 34,1)	22,4 (17,3 - 27,6)	20,3 (12,6 - 27,9)	7,8 (3,0 - 12,5)	1,3 (0 - 3,9)
Femelle	192	22,4 (16,2 - 28,6)	17,7 (12,8 - 22,6)	18,8 (11,9 - 25,8)	9,4 (4,7 - 14,1)	1,0 (0 - 2,6)
Localisation²						
Village 1	98	36,7 (19,9 - 53,5)	23,5 (16,1 - 30,8)	24,5 (11,0 - 38,00)	10,2 (4,1 - 16,3)	0
Village 2	118	30,5 (21,5 - 39,5)	22,0 (15,1 - 28,9)	36,4 (24,0 - 48,9)	8,5 (1,8 - 15,1)	0
Village 3	156	21,2 (13,6 - 28,7)	16,7 (10,5 - 22,8)	10,3 (3,9 - 16,6)	10,3 (0 - 21,3)	0
PNR³	52	3,9 (0 - 9,9)	21,2 (2,5 - 39,9)	0	0	9,6 (0 - 25,5)
Total	424	25,2 (19,9 - 30,6)	20,3 (16,6 - 24,0)	19,6 (13,3 - 25,9)	8,5 (4,4 - 12,6)	1,2 (0 - 3,2)

¹ Intervalles de confiance à 95 %.

² Villages (animaux domestiques, humains, rongeurs); PNR : Parc National de Ranomafana (lémuriens, rongeurs).

³ PNR Parc national de Ranomafana

3.3 Associations entre les différentes variables examinées et la présence de protozoaires

La non détection de *Giardia*, la faible prévalence de *Cryptosporidium* et la faible taille d'échantillon issue de chaque espèce de lémuriens nous ont empêché d'inclure les lémuriens du PNR dans les analyses de régressions. De même, les chats n'ont également pas pu être inclus dans les analyses de régressions du fait de la faible taille d'échantillon issue de cette espèce et la non détection des parasites chez celle-ci.

Les associations entre les différentes variables récoltées et la présence de *Giardia* et *Cryptosporidium* au sein des villages ont été évaluées par un modèle de régression logistique multiple. Les résultats du modèle complet de régressions logistique sont présentés dans le tableau VIII. Aucune association n'a été détectée entre la présence d'infections à *Cryptosporidium* ou *Giardia* et les variables suivantes : le village d'appartenance, le sexe de l'individu et la co-infection par un helminthe.

Les résultats du modèle final de régressions logistique sont présentés dans le tableau IX. Des associations significatives ($p < 0,05$) ont été détectées entre la présence de *Giardia* et de *Cryptosporidium* et les variables suivantes : l'espèce de l'hôte, la catégorie d'âge, et la présence d'une co-infection par l'autre genre de protozoaire d'intérêt (soit *Cryptosporidium* ou *Giardia*). Ainsi, être jeune s'est révélé être un facteur de risque significatif pour l'infection à *Cryptosporidium* (RC = 3,8) et *Giardia* (RC = 3,1). Les porcs ont plus de chance d'être positifs à *Giardia* qu'un bovin (RC = 0,2), un humain (RC = 0,2) ou qu'un rongeur (RC = 0,3). Être positif à *Giardia* est un facteur de risque pour *Cryptosporidium* (RC = 6,3). Pour la détection de *Cryptosporidium*, les individus subadultes ont plus de chance d'être infectés que les adultes (RC = 3,8). Un humain à moins de risque d'être positif comparativement à un rongeur (RC = 4,8) ou un bovin (RC = 5,5). Un individu positif à *Giardia* présente plus de chance d'être positif pour *Cryptosporidium* (RC = 6,3) (Tableau IX).

Tableau VIII : Modèle complet des régressions logistiques des variables associées à la détection de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les humains, animaux domestiques et rongeurs dans les villages de l'écosystème de Ranomafana (juillet 2011).

Variables		Positif pour <i>Giardia</i>		Positif pour <i>Cryptosporidium</i>	
		RC	Valeur P	RC	Valeur P
Espèce	Humains	0,2	<0,01	Réf	Réf
	Bovins	0,2	0,01	4,5	<0,01
	Porcins	Réf	Réf	1,8	0,44
	Chiens	0,6	0,54	2,1	0,52
	Rongeurs	0,3	0,05	3,6	0,01
Localisation	Village 1	Réf	Réf	Réf	Réf
	Village 2	0,9	0,81	1,4	0,44
	Village 3	0,7	0,25	1,8	0,18
Catégorie d'âge	Adulte	Réf	Réf	Réf	Réf
	Subdulte	3,2	<0,01	3,8	< 0,01
Sexe	Femelle	Réf	Réf	Réf	Réf
	Male	1,1	0,71	0,9	0,77
Co-infection	Ascaridida -	Réf	Réf	Réf	Réf
	Ascaridida +	1,7	0,25	0,8	0,63
	Strongylida -	Réf	Réf	Réf	Réf
	Strongylida +	1,8	0,11	1,8	0,14
	<i>Cryptosporidium</i> -	Réf	Réf		
	<i>Cryptosporidium</i> +	6,5	< 0,01		
	<i>Giardia</i> -			Réf	Réf
<i>Giardia</i> +			6,3	< 0,001	

RC : Rapports de cotes

Réf : Variable de référence

Tableau IX : Modèle final de régressions logistiques des variables associées à la détection de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les humains, animaux domestiques et rongeurs dans les villages de l'écosystème de Ranomafana.

Variables		Positif pour <i>Giardia</i>		Positif pour <i>Cryptosporidium</i>	
		RC	Valeur P	RC	Valeur P
Espèce	Humains	0,2	0,001	Réf	Réf
	Bovins	0,2	0,002	5,5	0,002
	Porcins	Réf	Réf	2,4	0,21
	Chiens	0,8	0,83	3,8	0,26
	Rongeurs	0,3	0,015	4,8	0,002
Catégorie d'âge	Adulte	Réf	Réf	Réf	Réf
	Subdulte	3,1	0,001	3,8	< 0,001
Co-infection	<i>Cryptosporidium</i> -	Réf	Réf		
	<i>Cryptosporidium</i> +	6,3	< 0,001		
	<i>Giardia</i> -			Réf	Réf
	<i>Giardia</i> +			6,3	< 0,001

Chapitre 4 : Discussion

Giardia et *Cryptosporidium* sont des parasites protozoaires potentiellement zoonotiques et causant de nombreux cas de diarrhées chez les humains, les animaux domestiques et les animaux sauvages (Monis et Thompson, 2003). Par cette étude nous souhaitons documenter la présence, évaluer la prévalence et identifier certains facteurs de risques potentiels associés à l'infection par *Cryptosporidium* et *Giardia*. Ces parasites pourraient poser un risque pour les populations de lémuriens présents dans l'écosystème de Ranomafana à Madagascar. Au cours de ce projet, nous avons collecté et analysé 424 échantillons fécaux issus d'humains, d'animaux domestiques et de rongeurs sauvages habitant les villages voisins du PNR ainsi que de lémuriens et rongeurs vivant au sein de l'aire protégée. Des parasites gastro-intestinaux, dont les protozoaires *Giardia* et *Cryptosporidium*, ont été recherchés.

4.1 Parasites chez les humains, animaux domestiques et rongeurs dans les villages

Notre étude montre de fortes prévalences de *Giardia* (23,1 %) et *Cryptosporidium* (19,8 %) dans les régions rurales bordant le PNR à Madagascar. Ceci confirme les résultats obtenus lors d'études portant sur les maladies diarrhéiques à Madagascar et soulignant la forte prévalence de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les humains issus de différents milieux de l'île (Areeshi et al., 2008; Randremanana et al., 2012). En comparaison avec d'autres études, les résultats obtenus sont similaires à ceux trouvés dans d'autres communautés rurales dans les pays en voie de développement (Raccurt et al., 2006; Ayalew et al., 2008; Salyer et al., 2012) et pourraient s'expliquer par le faible niveau d'hygiène, l'accès limité aux centres de soins dans ces communautés et la proximité avec les animaux domestiques (Stantic-Pavlinic et al., 2003; Hunter et Thompson, 2005).

Giardia et *Cryptosporidium* sont deux protozoaires parasites qui se transmettent par un cycle fécal oral soit directement suite au contact direct avec un réservoir soit indirectement via la nourriture ou l'eau contaminée (Caccio et al., 2005). En effet, *Giardia* et *Cryptosporidium* survivent bien à l'extérieur et particulièrement dans le fumier ou le milieu aquatique (Fayer, 2004). De nombreuses épidémies causées par ces agents infectieux maladies ont été attribuées à

l'eau contaminée (Fayer et al., 2000; Fayer, 2004). Les communautés rurales de la région d'étude utilisent principalement l'eau souterraine ou les eaux de surface telles que rivières et lacs puisés à l'aide de pompes communautaires pour la boisson, la cuisine et l'hygiène personnelle (Rasambainarivo, observation personnelle). L'utilisation des eaux de surface a été liée à un risque plus élevé de maladies diarrhéiques causées par *Cryptosporidium* et *Giardia* (Salyer et al., 2012).

La forte prévalence des protozoaires chez l'homme pourrait également s'expliquer par les pratiques agricoles et l'élevage. En effet, l'utilisation des engrais naturels et la contamination des sources d'eau par les défécations d'animaux domestiques constituent des facteurs de risque important pour la transmission des parasites (Smith, 1990; Smith et al., 1995). D'autres études ont montré que la possession d'animaux domestiques sont associés positivement aux risques d'infection par des protozoaires parasites (Molbak et al., 1997; Roy et al., 2004).

4.2 Variables associées à la présence de protozoaires

4.2.1 Différences entre les espèces

Cette étude montre une forte prévalence des parasites chez les humains et les différentes espèces animales mais met également en évidence une différence de prévalence entre les espèces. Ainsi, *Giardia* est plus commun chez les porcs que chez les humains, les bovins ou les rongeurs. Pour *Cryptosporidium* par contre, les bovins et les rongeurs sont plus à risque d'être infecté que les humains. Ces différences pourraient s'expliquer par des différences dans le mode d'élevage ou de vie des animaux, des différences dans la susceptibilité aux parasites ou serait le résultat de différences lors de l'échantillonnage.

Les humains, bien que vivant en milieu rural, ont accès à un minimum d'infrastructures sanitaires et appliquent des mesures d'hygiène de base telles l'utilisation de latrines, le lavage des mains ou parfois le traitement des eaux par ébullition. Ces pratiques permettent de diminuer la transmission des parasites et pourrait expliquer la plus faible contamination des humains par rapport à certaines espèces animales. Les animaux, par contre, sont soit sauvages (rongeurs), soit élevés en liberté (zébus, chiens, chats) ou encore dans de petits enclos à l'intérieur ou à l'extérieur des habitations humaines (zébus et porcs). Il a été montré que les modes d'élevage et le substrat des enclos sont associés à l'infection par *Cryptosporidium* et *Giardia*. Ainsi un sol poreux et humide tel que le ciment ou les planches de bois utilisés dans la confection d'enclos d'élevage porcins dans la région d'étude, favorisent l'infection à *Giardia* (Xiao et Herd, 1994;

Maddox-Hyttel et al., 2006). Aussi, les champs agricoles, fréquemment utilisés comme pâturages pour les bovins et parfois fertilisés grâce à l'utilisation de fumier sont plus susceptibles d'arborer des oocystes de *Cryptosporidium*, mais pas *Giardia* (Barwick et al., 2003). Ceci pourrait expliquer en partie la plus forte prévalence de *Cryptosporidium* chez les bovins et de *Giardia* chez les porcs.

Notre étude montre que *Cryptosporidium* est retrouvé fréquemment chez les bovins et les rongeurs qui pourraient ainsi constituer des sources potentielles de ces parasites du fait de la forte population et de l'habitat occupé par ces animaux. Au Parc National de Bwindi en Ouganda, les bovins partagent une partie de leur territoire avec les gorilles et ont été impliqués dans la transmission de protozoaires tels *Cryptosporidium* à ces populations de primates (Nizeyi et al., 1999). Ceci pourrait également être le cas à Madagascar. En effet, les zébus sont les mammifères domestiques élevés les plus répandus à Madagascar du fait de leur importance sociale et culturelle (Réau, 2002). Ils sont généralement élevés de manière extensive ou semi extensive, où ils sont gardés le soir dans des enclos à l'extérieur et laissés au pâturage pendant la journée (Figure 15). De plus, à Ranomafana, les villageois résidant dans les villages situés dans la zone tampon, c'est-à-dire à moins de 5 km des bordures du parc national, laissent parfois leurs zébus et autres animaux domestiques pénétrer dans la forêt pour s'alimenter ou pour leur fournir une protection contre le vol (Peters, 1999). Les zébus, porteurs de ces protozoaires potentiellement pathogéniques aux lémuriniens peuvent donc disséminer ces agents pathogènes au sein du parc national et infecter ainsi les animaux endémiques.

D'autre part, les rongeurs tels que les rats sont des espèces introduites invasives ayant colonisé la plupart des habitats de Madagascar tels que les champs, les zones habitées et les forêts secondaires. Au PNR, la forêt secondaire est issue de la coupe sélective qui eut lieu jusqu'au début des années 80. Dans ces différents habitats, les rongeurs sont commensaux voire même nuisibles pour les humains, les animaux domestiques et les animaux sauvages (Lehtonen et al., 2001b). Ainsi, les rongeurs sont considérés comme des réservoirs et vecteurs potentiels d'agents pathogènes tels la peste et les trypanosomes. Ils peuvent également transmettre différentes espèces de cryptosporidies aux humains, animaux domestiques et animaux sauvages en contaminant eau et nourriture avec leurs fèces (Morgan et al., 1999; Backhans et Fellstrom, 2012; Backhans et al., 2012; McFarlane et al., 2012).



Figure 15 : Zébus dans les pâturages en lisière du Parc National de Ranomafana (Source : F. Rasambainarivo).

4.2.2 Variations selon catégories d'âge

Cryptosporidium et *Giardia* ont été retrouvés principalement chez les individus subadultes. Ce résultat est en accord avec les autres études ayant évalué l'infection par les protozoaires parasites chez l'humain, les animaux domestiques ou les rongeurs (O'Handley et al., 2000; Nguyen et al., 2012), et pourrait s'expliquer par des différences de contamination, de susceptibilités aux parasites ou encore d'immunité acquise face à ces parasites. Chez les humains, le plus faible niveau d'hygiène adopté généralement par les jeunes constitue un facteur de risque important à l'infection par des parasites dont *Cryptosporidium* ou *Giardia* (Kightlinger et al., 1995). De plus, il a été montré que *Cryptosporidium* est plus prévalent chez les jeunes individus que chez les adultes du fait de l'immunité acquise qui se développe après maturation du système immunitaire. En effet, la résistance à la cryptosporidiose semble être plus reliée à l'âge qu'à une exposition antérieure à l'agent pathogène (Harp et al., 1990).

4.2.3 Co-infection par *Cryptosporidium* et *Giardia*

Notre étude montre également qu'un individu infecté par *Cryptosporidium* a plus de chance d'être positif à *Giardia*. Ceci est en accord avec certaines études effectuées précédemment montrant une association entre les deux parasites chez les humains, les animaux domestiques et les rongeurs (Wolfson et al., 1984; Xiao et Herd, 1994; Bajer et al., 2002). Cette association entre les deux parasites pourrait être liée à la similarité des voies d'infection et la contamination simultanée des sources d'eaux par de différents genres de parasites (Rose et al., 1991). L'infection par d'autres protozoaires potentiellement zoonotiques tels *Blastocystis* et *Enterocytozoon* ont également été associée à l'infection par *Cryptosporidium* et *Giardia* chez les bovins (Fayer et al., 2012).

4.3 *Cryptosporidium* chez les lémuriens

Cette étude a permis de démontrer la présence pour la première fois de *Cryptosporidium* chez deux espèces de lémuriens issus des forêts humides de Madagascar soit le grand hapalémur (*Prolemur simus*) et le microcèbe roux (*Microcebus rufus*). Au cours de la présente étude, nous avons estimé la prévalence de lémuriens infectés par *Cryptosporidium* à 10,5 %. Cette prévalence est similaire à celle trouvée chez d'autres espèces de primates sauvages sur le continent africain tels les chimpanzés du Parc Ugalla en Tanzanie (Gonzalez-Moreno et al., 2013), ou au parc de Gombe (10 % (Lonsdorf et al., 2009) ou les gorilles du parc de Bwindi (11 %, (Nizeyi et al., 1999), mais largement inférieure à celle trouvée chez les babouins ayant un contact rapproché avec les humains (29,3 %) (Legesse et Erko, 2004).

De nombreuses études portant sur la santé et recherchant les parasites de lémuriens dont *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les forêts humides de Madagascar (Junge et al., 2008; Junge et al., 2011) et à Ranomafana en particulier (Wright, 2009) ont été effectuées. Malgré cela, aucune n'a permis de mettre en évidence la présence de ces protozoaires potentiellement zoonotiques. Ceci pourrait s'expliquer par une différence dans la méthodologie adoptée ou par l'émergence plus récente de ces parasites dans les populations de lémuriens en contact fréquent avec les populations humaines ou animales domestiques. Le *Prosimian Biomedical Survey Project* (PBSP) évaluant la santé des lémuriens dans les aires protégées de Madagascar recherche *Giardia* et *Cryptosporidium* en utilisant une méthode d'ELISA (Junge et Louis, 2005b, a, 2007). Cette méthode est moins sensible comparativement à la technique de microscopie à

immunofluorescence utilisée lors de la présente étude (Garcia et Shimizu, 1997). Néanmoins, considérant le nombre d'échantillons examinés pour le PBSP (n = 656, Junge communication personnelle), il semble peu probable que la différence de sensibilité explique à elle seule la disparité entre ces études.

Les lémuriens du PNR pourraient être infectés par des protozoaires qui leur sont spécifiques ou encore par des protozoaires d'origine anthroponotique suite au contact direct avec les humains, les animaux domestiques ou les rongeurs porteurs de cryptosporidies, ou indirectement par la consommation de nourriture ou de terre contaminée. L'introduction d'agents pathogènes d'origine humaine ou animale chez des populations naïves et en danger est d'un intérêt particulier, car elle pourrait contribuer à l'extinction de ces populations isolées en réduisant leur taille. Ceci pourrait entraîner de la consanguinité et réduire leur résistance face aux facteurs stochastiques tels le réchauffement climatique (McCallum, 2012).

La mise en évidence de *Cryptosporidium* chez les lémuriens du PNR correspondrait ainsi à la première étape de l'émergence de maladie infectieuse chez les populations sauvages qui est défini par la transmission de l'agent pathogène d'une espèce réservoir (dans ce cas humains, animaux domestiques ou rongeurs) à une espèce naïve (lémuriens) (Caron et al., 2012). En effet, ces lémuriens sont régulièrement visités par les touristes ce qui pourrait favoriser la contamination de leur habitat par des agents pathogènes tel que suggéré chez les orang-outan (Muehlenbein et al., 2010). Aussi, les lémuriens du PNR font l'objet de nombreux projets de recherche nécessitant parfois la capture des animaux, mettant ces animaux en contact direct avec les humains potentiellement porteurs d'agents pathogènes (Atsalis, 2000; Blanco, 2008; King et al., 2011). Les espèces de rongeurs introduits à Madagascar et porteurs de *Cryptosporidium* pourraient également constituer une source de parasites pour les espèces de primates endémiques. Ces rongeurs montrent une forte prévalence de protozoaires parasites et particulièrement de *Cryptosporidium* (28,6 %). Ils partagent également l'habitat des lémuriens, en particulier des microcèbes roux en lisière des forêts (Lehtonen et al., 2001a). Ces animaux, considérés comme étant nuisibles peuvent ainsi favoriser la transmission d'agents pathogènes aux animaux sauvages.

De plus, certaines espèces de lémuriens tels le grand hapalémur pratiquent la géophagie (Figure 16) (Baden et al., 2005). La géophagie, un comportement fréquemment rencontré chez les animaux et les humains est définie par une consommation régulière et délibérée de terre

(Limpitlaw, 2010; Young et al., 2011; Golden et al., 2012). La raison de ce comportement chez les lémuriens est encore inconnue, mais il a été suggéré qu'il serait pratiqué en vue de neutraliser une diète trop acide, participer à la détoxification des aliments, compléter la diète en minéraux ou lors de comportements d'automédication (Young et al., 2011; Pebsworth et al., 2012b). D'autre part, ce comportement a été lié à la transmission de différents parasites chez humains et les primates (Kutalek et al., 2010; Pebsworth et al., 2012a). Dans notre cas, les grand hapalémurs infectés pourraient avoir acquis le parasite en consommant de la terre contaminée par des défécations d'animaux domestiques, d'humains ou d'autres animaux sauvages.



Figure 16 : Grand hapalémur (*Prolemur simus*) pratiquant la géophagie dans le Parc National de Ranomafana (Photo : P. C. Wright, utilisée avec l'autorisation de P. Wright).

Tous les lémuriens qui se sont révélés positifs à *Cryptosporidium* par immunofluorescence, sont issus de la partie appelée Talatakely, habitat plus dégradé et plus fréquemment visité par les touristes que Valohoaka (Wright et al., 2012). Ceci pourrait supporter l'hypothèse de la pollution pathogénique et de la transmission anthroponotique de *Cryptosporidium* chez les lémuriens. En effet, différentes études ont montré que la prévalence de nombreuses maladies était souvent positivement liée à la dégradation des habitats et aux modifications anthropiques (Chapman et al., 2006; Brearley et al., 2012a; Brearley et al., 2012b). Cependant, la faible taille d'échantillons obtenus grâce à un échantillonnage de convenance chez les lémuriens et le devis de notre étude

ne nous permet pas de conclure sur la différence d'occurrence de ce parasite chez les différentes espèces de lémuriens et les différents habitats.

Dans ce cas, les lémuriens subiraient une pression pathogénique exercée par les humains, animaux domestiques et rongeurs sauvages de l'écosystème de Ranomafana. Afin de diminuer cette pression et les risques d'infection des lémuriens par des parasites issus des humains, animaux domestiques et rongeurs péri domestiques, il serait important d'adopter des mesures prophylactiques. Ces mesures viseraient à limiter le contact des lémuriens avec les humains et animaux domestiques ainsi que les rongeurs, par exemple, en interdisant le pâturage des bovins au sein de l'aire protégée ou en réduisant la population de rongeurs introduits dans le parc (Suzán et al., 2008). D'autres mesures, visant à réduire la contamination des cours d'eau pourraient également être mises en place afin de limiter l'infection des lémuriens par *Cryptosporidium*. De manière similaire, des mesures de protection des cours d'eau ont été proposées pour limiter l'infection des humains aux États unis (Ong et al., 1996) et des gorilles en Tanzanie (Nizeyi et al., 2002a).

Autrement, les cryptosporidies retrouvées chez les lémuriens pourraient faire partie d'une espèce ou un génotype de *Cryptosporidium* qui n'a pas été décrit jusqu'à présent. Ainsi, les oocystes de *Cryptosporidium* retrouvés chez les singes colobes bai à tête rousse du parc national de Kibale en Ouganda sont issus d'un génotype différent de ceux des humains, animaux domestiques et autres primates de la région, suggérant ainsi la présence d'un cycle sylvatique de *Cryptosporidium* (Salyer et al., 2012). Des études génétiques précisant l'origine des parasites infectant les lémuriens seraient nécessaires afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse et de conclure sur les potentialités zoonotiques ou anthroponotiques des protozoaires détectés (Appelbee et al., 2005; Fall et al., 2009).

Au cours de cette étude, nous avons échantillonné 38 lémuriens, dont 4 subadultes et 34 adultes. Parmi ceux-ci 3 adultes et 1 subadulte (Grand hapalémur) se sont révélés positifs à *Cryptosporidium*. Chez différentes espèces animales dont les lémuriens en captivité (Charles-Smith et al., 2010), la jeune âge constitue une variable associée de manière significative au statut parasitaire. Ainsi, il est possible que la prévalence estimée de *Cryptosporidium* chez les lémuriens de Ranomafana soit sous-estimée du fait de cette distribution hétérogène selon la classe d'âge dans notre échantillonnage.

4.4 Autres parasites potentiellement zoonotiques et/ou anthroponotiques détectés

Cette étude a également permis de mettre en évidence différents genres d'helminthes potentiellement zoonotiques qui pourraient constituer un risque pour les population de lémuriens sauvages.

4.4.1 *Hymenelopsis*

Des parasites du genre *Hymenelopsis*, appartenant à l'ordre Cyclophyllidea ont été détectés chez 30,6 % de rats dans l'écosystème de Ranomafana. *Hymenelopsis* est un cestode avec comme hôte principal différentes espèces de rongeurs et particulièrement les rats (Craig et Ito, 2007). *Hymenelopsis nana* est le seul cestode qui peut se transmettre, soit directement par un cycle fécal oral, soit via un arthropode jouant le rôle d'hôte intermédiaire. Ils sont également zoonotiques et ont été impliqués dans différents cas de nausées, douleurs abdominales et diarrhées chez les humains (Chero et al., 2007; Craig et Ito, 2007). De plus, *Hymenelopsis* a été rapporté chez de nombreuses espèces de primates sauvages et en captivité dont des lémuriens (Raharivololona, 2010; Li et al., 2012). Notre étude montre que les lémuriens du PNR sont potentiellement exposés à ces parasites qui pourraient les infecter suite au contact accru avec les hôtes définitifs que sont les rats ou en consommant des arthropodes, hôtes intermédiaires du parasite. Au cours de cette étude, aucun lémurien ne s'est révélé positif à *Hymenelopsis* par la méthode de flottation. La non détection de ces parasites chez les lémuriens pourraient refléter l'absence de ce parasite dans la faune parasitaire des lémuriens de Ranomafana ou encore le manque de sensibilité de notre étude du à la petite taille d'échantillon obtenues ou la méthodologie adoptée. En effet, la méthode de flottation au sucrose par double centrifugation n'offre qu'une sensibilité limitée pour la détection de cestodes (Gillespie, 2006). D'autres études portant spécifiquement sur la présence et l'écologie de ce parasite dans le PNR seraient nécessaires afin d'évaluer les risques qu'il pourrait poser sur les populations de lémuriens sauvages.

4.4.2 *Schistosoma mansoni*

Des œufs du trématode hématophage *Schistosoma mansoni* (ordre des Strigeidida) (Figure 13) ont été retrouvés chez des 2 % des humains vivant au sein des villages avoisinant le PNR.

Schistosoma mansoni, agent causal de la schistosomiase ou bilharziose qui est une maladie tropicale affectant plus de 200 millions de personnes dans le monde (Gryseels et al., 2006). Le cycle évolutif de *Schistosoma* est indirect et met en jeu un hôte intermédiaire, l'escargot *Biomphalaria* sp. Transmis principalement entre les humains, *S. mansoni* peut également infecter les animaux domestiques et les animaux sauvages dont de nombreuses espèces de primates qui peuvent servir de réservoir pour ce parasite (Erko et al., 2001; Legesse et Erko, 2004). Au cours de cette étude *S. mansoni* n'a pu être détecté chez les animaux domestiques, ni chez les lémuriens sauvages. Cependant les méthodes d'analyses parasitologiques utilisées lors de cette étude sont peu sensibles et pourraient largement sous estimer la prévalence de *Schistosoma* chez les humains et les risques de transmission de ce parasite aux populations sauvages. Aussi, la faible taille d'échantillons issus de lémuriens ne permet pas de conclure sur l'absence de Schistosomes chez les lémuriens sauvages du PNR. D'autres études seraient nécessaires afin d'évaluer les risques que ce parasite zoonotique pourrait poser sur les populations de lémuriens sauvages.

4.5 Limites de l'étude

Nous avons effectué une étude transversale investiguant la présence de *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les humains et différentes espèces animales domestiques et sauvage vivant au sein de l'écosystème de Ranomafana. Cette étude repose sur la détection et l'identification des parasites dans les échantillons fécaux provenant d'un nombre important d'humains, d'animaux domestiques et sauvages. Elle a permis d'estimer les prévalences et d'identifier des variables associées à la présence de ces parasites chez ces populations humaines et animales rurales de Madagascar.

La recherche de parasites s'est faite par la méthode d'immunofluorescence directe après concentration des éléments parasitaires par double centrifugation. Cette méthode microscopique, bien que sensible et spécifique, ne permet pas de déterminer avec précision l'espèce de parasites mis en cause et leur origine. Cette étude ne permet donc pas de conclure sur la présence réelle d'un phénomène de « pollution pathogénique » impliquant les populations humaines et animales interagissant en lisière du parc.

La prévalence de l'infection à *Cryptosporidium* et *Giardia* chez les lémuriens du PNR que nous rapportons ici ne reflète probablement pas la réalité du fait du mode d'échantillonnage effectué chez les lémuriens (de convenance). De plus, en raison de la faible taille d'échantillons

obtenus chez les lémuriens et leur distribution spatiale hétérogène, il nous a été impossible d'étudier les facteurs de risque propres aux lémuriens tels les espèces, les classes d'âge et leur habitat sur la prévalence des parasites.

Conclusions et orientations d'études

Cette étude a permis de mettre en évidence la forte prévalence des parasites protozoaires potentiellement zoonotiques que sont *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les humains, les animaux domestiques et les rongeurs vivant dans les villages avoisinant le PNR. Elle a également permis d'identifier des facteurs de risques liés à l'infection par ces protozoaires. Ainsi, différentes espèces animales tels que les bovins et les rongeurs pour *Cryptosporidium* ou les porcs pour *Giardia* et particulièrement les jeunes sont plus susceptibles d'arborer ces parasites et les excréter dans l'environnement via leurs fèces. De même, des helminthes (*Hymenolepis* et *Schistosoma*), autres parasites zoonotiques, ont été détectés chez les humains et animaux susceptibles d'interagir avec les lémuriens en lisière du parc. Les lémuriens du PNR sont donc exposés à divers parasites issus des populations humaines, des animaux domestiques ou des rongeurs sauvages qui pourraient potentiellement les infecter et avoir des conséquences néfastes sur la survie de ces primates en danger d'extinction.

Cette étude a également permis de mettre en évidence pour la première fois l'infection par *Cryptosporidium* de deux espèces de lémuriens sauvages issues du PNR. Ces primates endémiques pourraient s'être infectés suite au contact direct avec des réservoirs de parasites (tels que les humains ou les rongeurs) ou en consommant des fruits ou de la terre contaminés par des défécations humaines ou animales. Bien que l'impact de ces parasites sur la santé de ces espèces de primates menacés reste incertain, la présence de ces protozoaires dans cet écosystème fragilisé est inquiétante, car ils sont reconnus comme étant des agents pathogènes significatifs chez certaines espèces de lémuriens en captivité. Nous recommandons ainsi que des études plus approfondies soient effectuées afin de préciser les manifestations négatives de ces protozoaires chez les lémuriens. Il serait également nécessaire d'entreprendre des recherches investiguant l'origine des parasites et l'épidémiologie de ce parasite au sein des populations de lémuriens du PNR. Nous recommandons aussi la mise en place de recherches explorant la différence de prévalence de *Cryptosporidium* chez les lémuriens du PNR en fonction des différents habitats. De même, nous recommandons la mise en place d'analyses spatio-temporelles afin d'investiguer les facteurs abiotiques (tels la saisonnalité, l'écoulement des eaux) qui peuvent influencer la transmission de ces parasites au sein de cet écosystème.

En conclusion, nous contribuons par cette étude à l'état des connaissances sur les parasites des humains, animaux domestiques et rongeurs vivant dans les villages avoisinant le PNR. Elle peut permettre d'adapter les mesures préventives et curatives contre les nombreux parasites affectant ces populations tout en orientant des futures recherches sur l'écologie des parasites potentiellement zoonotiques qui infectent les lémuriens et constituent une menace supplémentaire pour les espèces endémiques en danger d'extinction du PNR.

Références

ABE, N., T. TANOUE, E. NOGUCHI, G. OHTA, ET H. SAKAI. 2010. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* isolates from domestic ferrets. *Parasitology Research* 106: 733-736.

ADAM, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 447-475.

ADDISS, D. G., H. M. MATHEWS, J. M. STEWART, S. P. WAHLQUIST, R. M. WILLIAMS, R. J. FINTON, H. C. SPENCER, ET D. D. JURANEK. 1991. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1137-1142.

AMENT, M. E., H. D. OCHS, ET S. D. DAVIS. 1973. Structure and function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes. A study of 39 patients. *Medicine (Baltimore)* 52: 227-248.

ANDERSON, M. L., ET D. G. GRIFFITH. 1985. Intestinal giardiasis associated with ocular inflammation. *Journal of Clinical Gastroenterology* 7: 169-172.

ANDREONE, F., ET L. M. LUISELLI. 2003. Conservation priorities and potential threats influencing the hyper-diverse amphibians of Madagascar. *Italian Journal of Zoology* 70: 53-63.

APPELBEE, A. J., R. C. THOMPSON, ET M. E. OLSON. 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife--current status and future needs. *Trends in Parasitology* 21: 370-376.

AREESHI, M., W. DOVE, D. PAPAVENTSIS, W. GATEI, P. COMBE, P. GROSJEAN, H. LEATHERBARROW, ET C. A. HART. 2008. *Cryptosporidium* species

causing acute diarrhoea in children in Antananarivo, Madagascar. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 102: 309-315.

ARRIGO-NELSON, S. J., ET P. C. WRIGHT. 2004. Survey results from Ranomafana National Park: New evidence for the effects of habitat preference and disturbance on the distribution of *Hapalemur*. *Folia Primatologica* 75: 331-334.

ASQUITH, N. M., ET M. MEJIA-CHANG. 2005. Mammals, edge effects, and the loss of tropical forest diversity. *Ecology* 86: 379-390.

ASTÙA, D., R. T. MOURA, C. E. V. GRELLE, ET M. T. FONSECA. 2006. Influence of baits, trap type and position for small mammal capture in a Brazilian lowland Atlantic Forest. *Boletim do Museu Biologia Mello Leitao* 19: 31-44.

ATSALIS, S. 2000. Spatial distribution and population composition of the brown mouse lemur (*Microcebus rufus*) in Ranomafana National Park, Madagascar, and its implications for social organization. *American Journal of Primatology* 51: 61-78.

AYALEW, D., E. BOELEEE, T. ENDESHAW, ET B. PETROS. 2008. *Cryptosporidium* and *Giardia* infection and drinking water sources among children in Lege Dini, Ethiopia. *Tropical Medicine & International Health* 13: 472-475.

BACKHANS, A., ET C. FELLSTROM. 2012. Rodents on pig and chicken farms - a potential threat to human and animal health. *Infection Ecology & Epidemiology* 2: 17093.

BACKHANS, A., M. JACOBSON, I. HANSSON, M. LEBBAD, S. T. LAMBERTZ, E. GAMMELGARD, M. SAAGER, O. AKANDE, ET C. FELLSTROM. 2012. Occurrence of pathogens in wild rodents caught on Swedish pig and chicken farms. *Epidemiology & Infection* 1: 1-7.

BADEN, A. L., S. J. ARRIGO-NELSON, ET P. C. WRIGHT. 2005. Mmmm... dirt: implications for geophagy by the Milne-Edwards' sifaka (*Propithecus edwardsi*) at Ranomafana National Park, Madagascar. *American Journal of Physical Anthropology*: 68.

BAJER, A., M. BEDNARSKA, A. PAWELCZYK, J. M. BEHNKE, F. S. GILBERT, ET E. SINSKI. 2002. Prevalence and abundance of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* spp. in wild rural rodents from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 125: 21-34.

BARRON, E. J. 1987. Cretaceous plate tectonic reconstructions. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 59: 3-29.

BARWICK, R. S., H. O. MOHAMMED, M. E. WHITE, ET R. B. BRYANT. 2003. Factors associated with the likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in soil from dairy farms. *Journal of Dairy Science* 86: 784-791.

BIALEK, R., N. BINDER, K. DIETZ, A. JOACHIM, J. R. KNOBLOCH, ET U. E. ZELCK. 2002. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 43: 283-288.

BINGHAM, A. K., E. L. JARROLL, JR., E. A. MEYER, ET S. RADULESCU. 1979. *Giardia* sp.: physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Experimental Parasitology* 47: 284-291.

BLANCO, M. B. 2008. Reproductive schedules of female *Microcebus rufus* at Ranomafana National Park, Madagascar. *International Journal of Primatology* 29: 323-338.

BLANCOU, J. 1976. Note sur l'infestation des Lémuriens malgaches par *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 29: 127.

BLANSHARD, C., A. M. JACKSON, D. C. SHANSON, N. FRANCIS, ET B. G. GAZZARD. 1992. Cryptosporidiosis in HIV-seropositive patients. *Quarterly Journal of Medicine* 85: 813-823.

BOWMAN, D. D., ET J. R. GEORGI. 2009. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. Elsevier Science Health Science Division.

BREARLEY, G., C. MCALPINE, S. BELL, ET A. BRADLEY. 2012a. Influence of urban edges on stress in an arboreal mammal: a case study of squirrel gliders in southeast Queensland, Australia. *Landscape Ecology* 27: 1407-1419.

BREARLEY, G., J. RHODES, A. BRADLEY, G. BAXTER, L. SEABROOK, D. LUNNEY, Y. LIU, ET C. MCALPINE. 2013. Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 88: 427-442.

BRODSKY, R. E., H. C. SPENCER, JR., ET M. G. SCHULTZ. 1974. Giardiasis in American travelers to the Soviet Union. *Journal of Infectious Diseases* 130: 319-323.

BROOKS, C. P., C. HOLMES, K. KRAMER, B. BARNETT, ET T. H. KEITT. 2009. The role of demography and markets in determining deforestation rates near Ranomafana National Park, Madagascar. *PLoS One* 4: e5783.

CACCIO, S. M., R. BECK, M. LALLE, A. MARINCULIC, ET E. POZIO. 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal of Parasitology* 38: 1523-1531.

CACCIO, S. M., R. C. A. THOMPSON, J. MCLAUCHLIN, ET H. V. SMITH. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology* 21: 430-437.

CARON, A., S. MORAND, F. BEAUDEAU, ET J. CABARET. 2012. Epidemiological interaction at the wildlife/livestock/human interface: can we anticipate emerging infectious diseases in their hotspots? A framework for understanding emerging diseases processes in their hot spots. *In New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*, S. Morand, (ed.). pp. 311-332.

CHABAUD A.G., B. E. R., PETTER A.J. 1965. Les nématodes parasites de lémuriens Malgaches. VI. Description de six espèces nouvelles et conclusion générales. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 40: 181-214.

CHABAUD A.G., P. A. J. 1959. Les nématodes parasites de lémuriens Malgaches. II. Un nouvel Oxyure: *Lemuricola contagiosus*. Mémoires de l'Institut Scientifique de Madagascar Serie A: 127-132.

CHABAUD, A. G., A. J. PETTER, ET Y. GOLVAN. 1961. Nematodes parasitic of Lemuria in Madagascar. III. Collection gathered by M. and Mme. Francis Petter. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 36: 113-126.

CHAPMAN, C. A., ET C. A. PERES. 2001. Primate conservation in the new millennium: The role of scientists. *Evolutionary Anthropology* 10: 16-33.

CHAPMAN, C. A., M. L. SPEIRS, T. R. GILLESPIE, T. HOLLAND, ET K. M. AUSTAD. 2006. Life on the edge: gastrointestinal parasites from the forest edge and interior primate groups. *American Journal of Primatology* 68: 397-409.

CHAPPELL, C. L., P. C. OKHUYSEN, C. R. STERLING, ET H. L. DUPONT. 1996. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *Journal of Infectious Diseases* 173: 232-236.

CHARLES-SMITH, L. E., P. COWEN, ET R. SCHOPLER. 2010. Environmental and physiological factors contributing to outbreaks of *Cryptosporidium* in Coquerel's sifaka (*Propithecus coquereli*) at the Duke Lemur Center: 1999-2007. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 41: 438-444.

CHECKLEY, W., L. D. EPSTEIN, R. H. GILMAN, R. E. BLACK, L. CABRERA, ET C. R. STERLING. 1998. Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. *American Journal of Epidemiology* 148: 497-506.

CHECKLEY, W., R. H. GILMAN, L. D. EPSTEIN, M. SUAREZ, J. F. DIAZ, L. CABRERA, R. E. BLACK, ET C. R. STERLING. 1997. Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in peruvian children. *American Journal of Epidemiology* 145: 156-163.

CHERO, J. C., M. SAITO, J. A. BUSTOS, E. M. BLANCO, G. GONZALVEZ, ET H. H. GARCIA. 2007. *Hymenolepis nana* infection: symptoms and response to nitazoxanide in field conditions. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101: 203-205.

CHRISTOU, L. 2011. The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. *Clinical Microbiology and Infection* 17: 326-330.

CLEAVELAND, S., M. K. LAURENSEN, ET L. H. TAYLOR. 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 356: 991-999.

CLOUGH, D. 2009. Gastro-intestinal parasites of red-fronted lemurs in Kirindy forest, western Madagascar. *Journal of Parasitology* 96: 245-251.

CLYNE, C. A., ET G. M. ELIOPOULOS. 1989. Fever and urticaria in acute giardiasis. *Archives of Internal Medicine* 149: 939-940.

COOP, R. L., ET P. H. HOLMES. 1996. Nutrition and parasite interaction. *International Journal for Parasitology* 26: 951-962.

COOP, R. L., ET I. KYRIAZAKIS. 1999. Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology* 84: 187-204.

COUPE, S., C. SARFATI, S. HAMANE, ET F. DEROUIN. 2005. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1017-1023.

CRAIG, P., ET A. ITO. 2007. Intestinal cestodes. *Current Opinion in Infectious Diseases* 20: 524-532.

CROMPTON, D. W., ET L. SAVIOLI. 1993. Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bulletin of the World Health Organization* 71: 1-7.

CURRENT, W. L. 1986. *Cryptosporidium* - Its biology and potential for environmental transmission. *Crc Critical Reviews in Environmental Control* 17: 21-51.

DA SILVA, A. J., S. CACCIO, C. WILLIAMS, K. Y. WON, E. K. NACE, C. WHITTIER, N. J. PIENIAZEK, ET M. L. EBERHARD. 2003. Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Veterinary Parasitology* 111: 297-307.

DASZAK, P., ET A. A. CUNNINGHAM. 1999. Extinction by infection. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 279.

DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, ET A. D. HYATT. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.

DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, ET A. D. HYATT. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 78: 103-116.

DE ALMEIDA, M. A. B., E. D. SANTOS, J. D. C. CARDOSO, D. F. DA FONSECA, C. A. NOLL, V. R. SILVEIRA, A. Y. MAEDA, R. P. DE SOUZA, C. KANAMURA, ET R. A. BRASIL. 2012. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. *American Journal of Primatology* 74: 68-76.

DOBSON, A., ET J. FOUFOPOULOS. 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 356: 1001-1012.

DOBSON, A. P., ET E. R. CARPER. 1996. Infectious diseases and human population history - Throughout history the establishment of disease has been a side effect of the growth of civilization. *Bioscience* 46: 115-126.

DOING, K. M., J. L. HAMM, J. A. JELLISON, J. A. MARQUIS, ET C. KINGSBURY. 1999. False-positive results obtained with the Alexon ProSpecT *Cryptosporidium* enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1582-1583.

DUBEY, J. P., J. E. MARKOVITS, ET K. A. KILLARY. 2002. *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of *Cynomolgus* Monkeys (*Macaca fascicularis*). *Veterinary Pathology* 39: 363-371.

DUTTON, C. J., R. E. JUNGE, ET E. E. LOUIS. 2008. Biomedical evaluation of free-ranging red ruffed lemurs (*Varecia rubra*) within the Masoala National Park, Madagascar. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39: 76-85.

EKANAYAKE, D. K., A. ARULKANTHAN, N. U. HORADAGODA, G. K. M. SANJEEVANI, R. KIEFT, S. GUNATILAKE, ET W. P. J. DITTUS. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium* and other enteric parasites among wild non-human primates in Polonnaruwa, Sri Lanka. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 322-329.

ERKO, B., T. GEBRE-MICHAEL, F. BALCHA, ET S. G. GUNDERSEN. 2001. Implication of *Papio anubis* in the transmission of intestinal schistosomiasis in three new foci in Kime area, Ethiopia. *Parasitology International* 50: 259-266.

FALL, A., R. C. A. THOMPSON, R. P. HOBBS, ET U. MORGAN-RYAN. 2009. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*.

FARTHING, M. J. 1996. Giardiasis. *Gastroenterology Clinics of North America* 25: 493-515.

FARTHING, M. J., S. K. CHONG, ET J. A. WALKER-SMITH. 1983. Acute allergic phenomena in giardiasis. *Lancet* 2: 1428.

FAYER, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126: 37-56.

FAYER, R., U. MORGAN, ET S. J. UPTON. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal of Parasitology* 30: 1305-1322.

FAYER, R., M. SANTIN, ET D. MACARISIN. 2012. Detection of concurrent infection of dairy cattle with *Blastocystis*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Enterocytozoon* by molecular and microscopic methods. *Parasitology Research* 111: 1349-1355.

FAYER, R., M. SANTIN, J. M. TROUT, ET J. P. DUBEY. 2006. Detection of *Cryptosporidium felis* and *Giardia duodenalis* Assemblage F in a cat colony. *Veterinary Parasitology* 140: 44-53.

FAYER, R., ET B. L. P. UNGAR. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews* 50: 458-483.

FLANAGAN, P. A. 1992. *Giardia*--diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiology & Infection* 109: 1-22.

FLANIGAN, T., C. WHALEN, J. TURNER, R. SOAVE, J. TOERNER, D. HAVLIR, ET D. KOTLER. 1992. *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Annals of Internal Medicine* 116: 840-842.

FOREYT, W. J. 2001. *Veterinary parasitology reference manual*. Iowa State University Press, Ames 235 pp.

FRICK, W. F., J. F. POLLOCK, A. C. HICKS, K. E. LANGWIG, D. S. REYNOLDS, G. G. TURNER, C. M. BUTCHKOSKI, ET T. H. KUNZ. 2010. An emerging disease causes regional population collapse of a common North American bat species. *Science* 329: 679-682.

GARCIA, L. S., T. C. BREWER, ET D. A. BRUCKNER. 1987. Fluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 119-121.

GARCIA, L. S., ET R. Y. SHIMIZU. 1997. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1526-1529.

GARNETT, G. P., ET E. C. HOLMES. 1996. The ecology of emergent infectious disease - Infectious diseases pose an ever-emerging threat to humanity. *Bioscience* 46: 127-135.

GATES, M. C., ET T. J. NOLAN. 2009. Comparison of passive fecal flotation run by veterinary students to zinc-sulfate centrifugation flotation run in a diagnostic parasitology laboratory. *Journal of Parasitology* 95: 1213-1214.

GHANDOUR, A. M., N. Z. ZAHID, A. A. BANAJA, K. B. KAMAL, ET A. I. BOUQ. 1995. Zoonotic intestinal parasites of hamadryas baboons *Papio hamadryas* in the western and northern regions of Saudi Arabia. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 431-439.

GILLESPIE, T. R. 2006. Noninvasive assessment of gastrointestinal parasite infections in free-ranging primates. *International Journal of Primatology* 27: 1129-1143.

GILLESPIE, T. R., ET C. A. CHAPMAN. 2006. Prediction of parasite infection dynamics in primate metapopulations based on attributes of forest fragmentation. *Conservation Biology* 20: 441-448.

GILLESPIE, T. R., ET C. A. CHAPMAN. 2008. Forest fragmentation, the decline of an endangered primate, and changes in host-parasite interactions relative to an unfragmented forest. *American Journal of Primatology* 70: 222-230.

GILLESPIE, T. R., E. C. GREINER, ET C. A. CHAPMAN. 2005. Gastrointestinal parasites of the colobus monkeys of Uganda. *Journal of Parasitology* 91: 569-573.

GILLESPIE, T. R., D. MORGAN, J. C. DEUTSCH, M. S. KUHLENSCHMIDT, J. S. SALZER, K. CAMERON, T. REED, ET C. SANZ. 2009. A legacy of low-impact logging

does not elevate prevalence of potentially pathogenic protozoa in free-ranging gorillas and chimpanzees in the Republic of Congo: logging and parasitism in African apes. *Ecohealth* 6: 557-564.

GILLIN, F. D., D. S. REINER, M. J. GAULT, H. DOUGLAS, S. DAS, A. WUNDERLICH, ET J. F. SAUCH. 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science* 235: 1040-1043.

GILLON, J. 1985. Clinical studies in adults presenting with giardiasis to a gastro-intestinal unit. *Scottish Medical Journal* 30: 89-95.

GILMAN, R. H., K. H. BROWN, G. S. VISVESVARA, G. MONDAL, B. GREENBERG, R. B. SACK, F. BRANDT, ET M. U. KHAN. 1985. Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 79: 469-473.

GOLDBERG, T. L., T. R. GILLESPIE, I. B. RWEGO, E. L. ESTOFF, ET C. A. CHAPMAN. 2008. Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1375-1382.

GOLDBERG, T. L., T. R. GILLESPIE, I. B. RWEGO, E. WHEELER, E. L. ESTOFF, ET C. A. CHAPMAN. 2007. Patterns of gastrointestinal bacterial exchange between chimpanzees and humans involved in research and tourism in western Uganda. *Biological Conservation* 135: 511-517.

GOLDEN, C. D., B. J. RASOLOFONIAINA, R. BENJAMIN, ET S. L. YOUNG. 2012. Pica and amylophagy are common among malagasy men, women and children. *PLoS One* 7: e47129.

GOMEZ, M. S., M. GRACENEA, P. GOSALBEZ, C. FELIU, C. ENSENAT, ET R. HIDALGO. 1992. Detection of oocysts of *Cryptosporidium* in several species of monkeys and in one prosimian species at the Barcelona Zoo. *Parasitology Research* 78: 619-620.

GOMEZ, M. S., J. TORRES, M. GRACENEA, J. FERNANDEZ-MORAN, ET O. GONZALEZ-MORENO. 2000. Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona zoo mammals. *Parasitology Research* 86: 318-323.

GONZALEZ-MORENO, O., R. A. HERNANDEZ-AGUILAR, A. K. PIEL, F. A. STEWART, M. GRACENEA, ET J. MOORE. 2013. Prevalence and climatic associated factors of *Cryptosporidium* sp. infections in savanna chimpanzees from Ugalla, Western Tanzania. *Parasitology Research* 112: 393-399.

GOOBAR, J. P. 1977. Joint symptoms in giardiasis. *Lancet* 1: 1010-1011.

GRACZYK, T. K., J. BOSCO-NIZEYI, A. J. DA SILVA, I. N. MOURA, N. J. PIENIAZEK, M. R. CRANFIELD, ET H. D. LINDQUIST. 2002. A single genotype of *Encephalitozoon intestinalis* infects free-ranging gorillas and people sharing their habitats in Uganda. *Parasitology Research* 88: 926-931.

GRACZYK, T. K., A. J. DASILVA, M. R. CRANFIELD, J. B. NIZEYI, G. R. KALEMA, ET N. J. PIENIAZEK. 2001. *Cryptosporidium parvum* genotype 2 infections in free-ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Parasitol Res* 87: 368-370.

GRYSEELS, B., K. POLMAN, J. CLERINX, ET L. KESTENS. 2006. Human schistosomiasis. *The Lancet* 368: 1106-1118.

GUERRANT, R. L., J. M. HUGHES, N. L. LIMA, ET J. CRANE. 1990. Diarrhea in developed and developing-countries - magnitude, special settings, and etiologies. *Reviews of Infectious Diseases* 12: S41-S50.

HAMLEN, H. J., ET J. M. LAWRENCE. 1994. Giardiasis in laboratory-housed squirrel monkeys: a retrospective study. *Laboratory Animal Science* 44: 235-239.

HAMRICK, H. J., ET G. W. MOORE. 1983. Giardiasis causing urticaria in a child. *American Journal of Diseases of Children* 137: 761-763.

HARP, J. A., D. B. WOODMANSEE, ET H. W. MOON. 1990. Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum* - effects of age and previous exposure. *Infection and Immunity* 58: 2237-2240.

HARPER, G. J., M. K. STEININGER, C. J. TUCKER, D. JUHN, ET F. HAWKINS. 2007. Fifty years of deforestation and forest fragmentation in Madagascar. *Environmental Conservation* 34: 325-333.

HEENEY, J. L., A. G. DALGLEISH, ET R. A. WEISS. 2006. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 313: 462-466.

HOPE, K., M. L. GOLDSMITH, ET T. GRACZYK. 2004. Parasitic health of olive baboons in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Veterinary Parasitology* 122: 165-170.

HUBALEK, Z. 2003. Emerging human infectious diseases: anthroponoses, zoonoses, and sapronoses. *Emerging Infectious Diseases* 9: 403-404.

HUDSON, P. J., A. P. DOBSON, ET D. NEWBORN. 1992. Do parasites make prey vulnerable to predation - Red grouse and parasites. *Journal of Animal Ecology* 61: 681-692.

HUETINK, R., J. VAN DER GIESSEN, J. NOORDHUIZEN, ET H. PLOEGER. 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology* 102: 53-67.

HUIJBREGTS, B., P. DE WACHTER, L. S. N. OBIANG, ET M. E. AKOU. 2003. Ebola and the decline of gorilla *Gorilla gorilla* and chimpanzee *Pan troglodytes* populations in Minkebe Forest, north-eastern Gabon. *Oryx* 37: 437-443.

HUNTER, P. R., ET R. C. A. THOMPSON. 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology* 35: 1181-1190.

IRWIN, M. T., R. E. JUNGE, J. L. RAHARISON, ET K. E. SAMONDS. 2010. Variation in physiological health of diademed sifakas across intact and fragmented forest at Tsinjoarivo, Eastern Madagascar. *American Journal of Primatology* 72: 1013-1025.

IRWIN, M. T., ET J.-L. RAHARISON. 2009. A review of the endoparasites of the lemurs of Madagascar. *Malagasy Nature* 2: 66-93.

JOHNSTON, A. R., T. R. GILLESPIE, I. B. RWEGO, T. L. MCLACHLAN, A. D. KENT, ET T. L. GOLDBERG. 2010. Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in western Uganda. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4: e683.

JOHNSTON, S. P., M. M. BALLARD, M. J. BEACH, L. CAUSER, ET P. P. WILKINS. 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 623-626.

JUNGE, R. E., M. A. BARRETT, ET A. D. YODER. 2011. Effects of anthropogenic disturbance on indri (*Indri indri*) health in Madagascar. *American Journal of Primatology* 73: 632-642.

JUNGE, R. E., C. J. DUTTON, F. KNIGHTLY, C. V. WILLIAMS, F. T. RASAMBAINARIVO, ET E. E. LOUIS. 2008. Comparison of biomedical evaluation for white-fronted brown lemurs (*Eulemur fulvus albifrons*) from four sites in Madagascar. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39: 567-575.

JUNGE, R. E., ET E. E. LOUIS. 2005a. Biomedical evaluation of two sympatric lemur species (*Propithecus verreauxi deckeni* and *Eulemur fulvus rufus*) in Tsiombokibo Classified Forest, Madagascar. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36: 581-589.

JUNGE, R. E., ET E. E. LOUIS. 2005b. Preliminary biomedical evaluation of wild ruffed lemurs (*Varecia variegata* and *V. rubra*). *American Journal of Primatology* 66: 85-94.

JUNGE, R. E., ET E. E. LOUIS. 2007. Biomedical evaluation of black lemurs (*Eulemur macaco macaco*) in Lokobe Reserve, Madagascar. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38: 67-76.

KALISHMAN, J., J. PAUL-MURPHY, J. SCHEFFLER, ET J. A. THOMSON. 1996. Survey of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in a captive population of common marmosets. *Laboratory Animal Science* 46: 116-119.

KARANIS, P., C. KOURENTI, ET H. SMITH. 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health* 5: 1-38.

KAUR, T., J. SINGH, M. A. HUFFMAN, K. J. PETRZELKOVA, N. S. TAYLOR, S. L. XU, F. E. DEWHIRST, B. J. PASTER, L. DEBRUYNE, P. VANDAMME, ET J. G. FOX. 2011. *Campylobacter troglodytis* sp. nov., isolated from feces of human-habituated wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2366-2373.

KAUR, T., J. SINGH, S. TONG, C. HUMPHREY, D. CLEVINGER, W. TAN, B. SZEKELY, Y. WANG, Y. LI, E. ALEX MUSE, M. KIYONO, S. HANAMURA, E. INOUE, M. NAKAMURA, M. A. HUFFMAN, B. JIANG, ET T. NISHIDA. 2008. Descriptive epidemiology of fatal respiratory outbreaks and detection of a human-related metapneumovirus in wild chimpanzees (*Pan troglodytes*) at Mahale Mountains National Park, Western Tanzania. *American Journal of Primatology* 70: 755-765.

KIGHTLINGER, L. K., J. R. SEED, ET M. B. KIGHTLINGER. 1995. The epidemiology of *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, and Hookworm in children in the Ranomafana rainforest, Madagascar. *Journal of Parasitology* 81: 159-169.

KING, S. J., T. L. MORELLI, S. ARRIGO-NELSON, F. J. RATELOLAHY, L. R. GODFREY, J. WYATT, S. TECOT, J. JERNVALL, ET P. C. WRIGHT. 2011. Morphometrics and pattern of growth in wild Sifakas (*Propithecus edwardsi*) at Ranomafana National Park, Madagascar. *American Journal of Primatology* 73: 155-172.

KIRKPATRICK, C. E., ET C. E. BENSON. 1987. Presence of *Giardia* spp. and absence of *Salmonella* spp. in New Jersey muskrats (*Ondatra zibethicus*). *Applied Environmental Microbiology* 53: 1790-1792.

KOUDELA, B., ET V. JIRI. 1997. Experimental cryptosporidiosis in kids. *Veterinary Parasitology* 71: 273-281.

KRAUSE, D. W., G. V. R. PRASAD, W. VONKOENIGSWALD, A. SAHNI, ET F. E. GRINE. 1997. Cosmopolitanism among Gondwanan Late Cretaceous mammals. *Nature* 390: 504-507.

KUTALEK, R., G. WEWALKA, C. GUNDACKER, H. AUER, J. WILSON, D. HALUZA, S. HUHULESCU, S. HILLIER, M. SAGER, ET A. PRINZ. 2010. Geophagy and potential health implications: geohelminths, microbes and heavy metals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104: 787-795.

LAFFERTY, K. D., ET L. R. GERBER. 2002. Good medicine for conservation biology: The intersection of epidemiology and conservation theory. *Conservation Biology* 16: 593-604.

LASEK-NESELQUIST, E., D. M. WELCH, R. C. A. THOMPSON, R. F. STEUART, ET M. L. SOGIN. 2009. Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 504-518.

LEDERBERG, J. 1992. The interface of science and medicine. *Mount Sinai Journal of Medicine* 59: 380-383.

LEENDERTZ, F. H., G. PAULI, K. MAETZ-RENSING, W. BOARDMAN, C. NUNN, H. ELLERBROK, S. A. JENSEN, S. JUNGLEN, ET B. CHRISTOPHE. 2006. Pathogens as drivers of population declines: The importance of systematic monitoring in great apes and other threatened mammals. *Biological Conservation* 131: 325-337.

LEGESSE, M., ET B. ERKO. 2004. Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Tropica* 90: 231-236.

LEHMAN, S. M., A. RAJAONSON, ET S. DAY. 2006a. Edge effects and their influence on lemur density and distribution in southeast Madagascar. *American Journal of Physical Anthropology* 129: 232-241.

LEHMAN, S. M., A. RAJAONSON, ET S. DAY. 2006b. Lemur responses to edge effects in the Vohibola III Classified Forest, Madagascar. *American Journal of Primatology* 68: 293-299.

LEHMAN, S. M., J. RATSIMBAZAFY, A. RAJAONSON, ET S. DAY. 2006c. Decline of *Propithecus diadema edwardsi* and *Varecia variegata variegata* (Primates : Lemuridae) in south-east Madagascar. *Oryx* 40: 108-111.

LEHTONEN, J. T., O. MUSTONEN, H. RAMIARINJANAHARY, NIEMEL, AUML, J, ET H. RITA. 2001a. Habitat use by endemic and introduced rodents along a gradient of forest disturbance in Madagascar. *Biodiversity and Conservation* 10: 1185-1202.

LEHTONEN, J. T., O. MUSTONEN, H. RAMIARINJANAHARY, J. NIEMELA, ET H. RITA. 2001b. Habitat use by endemic and introduced rodents along a gradient of forest disturbance in Madagascar. *Biodiversity and Conservation* 10: 1185-1202.

LEVECKE, B., P. DORNY, T. GEURDEN, F. VERCAMMEN, ET J. VERCRUYSSSE. 2007. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Veterinary Parasitology* 148: 236-246.

LEVINE, N. D., J. O. CORLISS, F. E. COX, G. DEROUX, J. GRAIN, B. M. HONIGBERG, G. F. LEEDALE, A. R. LOEBLICH, 3RD, J. LOM, D. LYNN, E. G. MERINFELD, F. C. PAGE, G. POLJANSKY, V. SPRAGUE, J. VAVRA, ET F. G. WALLACE. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27: 37-58.

LI, B., B. ZHAO, G. Y. YANG, Q. WANG, L. L. NIU, J. B. DENG, X. B. GU, ET S. X. WANG. 2012. Mebendazole in the treatment of *Hymenolepis nana* infections in the captive ring-tailed lemur (*Lemur catta*), China. *Parasitology Research* 111: 935-937.

LIMOR, J. R., A. A. LAL, ET L. XIAO. 2002. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 2335-2338.

LIMPITLAW, U. G. 2010. Ingestion of earth materials for health by humans and animals. *International Geology Review* 52: 726-744.

LINDSAY, D. S., L. B. BYRON, C. A. SUNDERMANN, ET F. J. HOERR. 1989. Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. *Avian Diseases* 33: 69-73.

LLOYD, S., ET J. SMITH. 1997. Pattern of *Cryptosporidium parvum* oocyst excretion by experimentally infected dogs. *International Journal for Parasitology* 27: 799-801.

LONSDORF, E., D. A. TRAVIS, R. S. RUDICELL, T. R. GILLESPIE, J. SALZER, C. O'DONNELL, E. LANTZ, Y. NADLER, J. M. RAPHAEL, B. HAHN, ET A. E. PUSEY. 2009. Observational health assessments of the Gombe chimpanzees: correlating clinical signs with diagnosed infections. *American Journal of Primatology* 71: 69-69.

MADDOX-HYTTEL, C., R. B. LANGKJAER, H. L. ENEMARK, ET H. VIGRE. 2006. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs--occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology* 141: 48-59.

MARTIN, R. D. 1972. Review lecture: Adaptive radiation and behaviour of the Malagasy lemurs. *Philosophical transactions of the Royal Society London Biological sciences* 264: 295-352.

MASON, P. R., ET B. A. PATTERSON. 1987. Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37: 277-282.

MCCALLUM, H. 2012. Disease and the dynamics of extinction. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Sciences* 367: 2828-2839.

MCFARLANE, R., A. SLEIGH, ET T. MCMICHAEL. 2012. Synanthropy of wild mammals as a determinant of emerging infectious diseases in the Asian-Australasian region. *Ecohealth* 9: 24-35.

MITTERMEIER, R., J. GANZHORN, W. KONSTANT, K. GLANDER, I. TATTERSALL, C. GROVES, A. RYLANDS, A. HAPKE, J. RATSIMBAZAFY, M. MAYOR, E. E. LOUIS, Y. RUMPLER, C. SCHWITZER, ET R. RASOLOARISON. 2008. Lemur Diversity in Madagascar. *International Journal of Primatology* 29: 1607-1656.

MITTERMEIER, R. A., J. WALLIS, A. B. RYLANDS, J. R. U. GANZHORN, J. F. OATES, E. A. WILLIAMSON, E. PALACIOS, E. W. HEYMANN, M. C. L. M. KIERULFF, L. YONGCHENG, J. SUPRIATNA, C. ROOS, S. WALKER, L. CORTES-ORTIZ, ET C. SCHWITZER. 2009. Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2008-2010. *Primate Conservation* 24: 1-57.

MOLBAK, K., H. JENSEN, L. INGHOLT, ET P. AABY. 1997. Risk factors for diarrheal disease incidence in early childhood: A community cohort study from Guinea-Bissau. *American Journal of Epidemiology* 146: 273-282.

MONATH, T. P. 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infectious Diseases* 1: 11-20.

MONIS, P. T., R. H. ANDREWS, G. MAYRHOFER, ET P. L. EY. 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, Genetics and Evolution* 3: 29-38.

MONIS, P. T., ET R. C. THOMPSON. 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution* 3: 233-244.

MOORE, G. T., W. M. CROSS, D. MCGUIRE, C. S. MOLLOHAN, N. N. GLEASON, G. R. HEALY, ET L. H. NEWTON. 1969. Epidemic giardiasis at a ski resort. *New England Journal of Medicine* 281: 402-407.

MORGAN, U. M., A. P. STURDEE, G. SINGLETON, M. S. GOMEZ, M. GRACENEA, J. TORRES, S. G. HAMILTON, D. P. WOODSIDE, ET R. C. A.

THOMPSON. 1999. The *Cryptosporidium* "mouse" genotype is conserved across geographic areas. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1302-1305.

MUEHLENBEIN, M. P., L. A. MARTINEZ, A. A. LEMKE, L. AMBU, S. NATHAN, S. ALSISTO, ET R. SAKONG. 2010. Unhealthy travelers present challenges to sustainable primate ecotourism. *Travel Medicine and Infectious Disease* 8: 169-175.

MUENCH, T. R., ET M. R. WHITE. 1997. Cryptosporidiosis in a tropical freshwater catfish (*Plecostomus* Spp.). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9: 87-90.

MURCIA, C. 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 58-62.

MURIUKI, S. M. K., I. O. FARAH, R. M. KAGWIRIA, D. C. CHAI, G. NJAMUNGE, M. SULEMAN, ET J. O. OLOBO. 1997. The presence of *Cryptosporidium* oocysts in stools of clinically diarrhoeic and normal nonhuman primates in Kenya. *Veterinary Parasitology* 72: 141-147.

MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, C. G. MITTERMEIER, G. A. B. DA FONSECA, ET J. KENT. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

NGUYEN, S. T., H. HONMA, T. GEURDEN, M. IKARASHI, Y. FUKUDA, V. V. HUYNH, D. T. NGUYEN, ET Y. NAKAI. 2012. Prevalence and risk factors associated with *Cryptosporidium* oocysts shedding in pigs in Central Vietnam. *Research in Veterinary Science* 93: 848-852.

NIZEYI, J. B., M. R. CRANFIELD, ET T. K. GRACZYK. 2002a. Cattle near the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda, as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* for local community and free-ranging gorillas. *Parasitological Research* 88: 380-385.

NIZEYI, J. B., R. B. INNOCENT, J. ERUME, G. R. KALEMA, M. R. CRANFIELD, ET T. K. GRACZYK. 2001. Campylobacteriosis, salmonellosis, and

shigellosis in free-ranging human-habituated mountain gorillas of Uganda. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 239-244.

NIZEYI, J. B., R. MWEBE, A. NANTEZA, M. R. CRANFIELD, G. R. KALEMA, ET T. K. GRACZYK. 1999. *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. infections in mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Journal of Parasitology* 85: 1084-1088.

NIZEYI, J. B., D. SEBUNYA, A. J. DASILVA, M. R. CRANFIELD, N. J. PIENIAZEK, ET T. K. GRACZYK. 2002b. Cryptosporidiosis in people sharing habitats with free-ranging mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*), Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 442-444.

O'DONOGHUE, P. J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal of Parasitology* 25: 139-195.

O'HANDLEY, R. M., M. E. OLSON, D. FRASER, P. ADAMS, ET R. C. THOMPSON. 2000. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Veterinary Parasitology* 90: 193-200.

OKHUYSEN, P. C., C. L. CHAPPELL, J. H. CRABB, C. R. STERLING, ET H. L. DUPONT. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1275-1281.

OLSON, M. E., C. L. THORLAKSON, L. DESELLIERS, D. W. MORCK, ET T. A. MCALLISTER. 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Veterinary Parasitology* 68: 375-381.

ONG, C., W. MOOREHEAD, A. ROSS, ET J. ISAAC-RENTON. 1996. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2798-2805.

ORLANDI, P. A., ET K. A. LAMPEL. 2000. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2271-2277.

PARRISH, C. R., E. C. HOLMES, D. M. MORENS, E. C. PARK, D. S. BURKE, C. H. CALISHER, C. A. LAUGHLIN, L. J. SAIF, ET P. DASZAK. 2008. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 457-470.

PASTORINI, J., U. THALMANN, ET R. D. MARTIN. 2003. A molecular approach to comparative phylogeography of extant Malagasy lemurs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 5879-5884.

PEBSWORTH, P. A., C. E. ARCHER, C. C. APPLETON, ET M. A. HUFFMAN. 2012a. Parasite Transmission Risk From Geophagic and Foraging Behavior in Chacma Baboons. *American Journal of Primatology* 74: 940-947.

PEBSWORTH, P. A., M. BARDI, ET M. A. HUFFMAN. 2012b. Geophagy in chacma baboons: patterns of soil consumption by age class, sex, and reproductive state. *American Journal of Primatology* 74: 48-57.

PEDERSEN, A. B., ET T. J. DAVIES. 2009. Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. *Ecohealth* 6: 496-508.

PEREZ, V. R., L. R. GODFREY, M. NOWAK-KEMP, D. A. BURNEY, J. RATSIMBAZAFY, ET N. VASEY. 2005. Evidence of early butchery of giant lemurs in Madagascar. *Journal of Human Evolution* 49: 722-742.

PETERS, J. 1999. Understanding Conflicts between People and Parks at Ranomafana, Madagascar. *Agriculture and Human Values* 16: 65-74.

PORTER, J. D. H., C. GAFFNEY, D. HEYMANN, ET W. PARKIN. 1990. Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *American Journal of Public Health* 80: 1259-1260.

POWZYK, J. A., ET C. B. MOWRY. 2003. Dietary and feeding differences between sympatric *Propithecus diadema diadema* and *Indri indri*. *International Journal of Primatology* 24: 1143-1162.

RACCURT, C. P., P. BRASSEUR, R. I. VERDIER, X. LI, E. EYMA, C. P. STOCKMAN, P. AGNAMEY, K. GUYOT, A. TOTET, B. LIAUTAUD, G. NEVEZ, E. DELCAS, ET J. W. PAPE. 2006. Human cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* spp. in Haiti. *Tropical Medicine & International Health* 11: 929-934.

RAHARIVOLOLONA, B. M. 2010. Seasonal variations in gastrointestinal parasites excreted by the gray mouse lemur *Microcebus murinus* in Madagascar. *Endangered species research* 11: 113.

RALSTON, B. J., T. A. MCALLISTER, ET M. E. OLSON. 2003. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Veterinary Parasitology* 114: 113-122.

RANDREMANANA, R., F. RANDRIANIRINA, M. GOUSSEFF, N. DUBOIS, R. RAZAFINDRATSIMANDRESY, E. R. HARINIANA, B. GARIN, A. RANDRIAMANANTENA, H. C. RAKOTONIRINA, L. RAMPARANY, C. E. RAMAROKOTO, F. RAKOTOMANANA, M. RATSITORAHINA, S. RAJATONIRINA, A. TALARMIN, ET V. RICHARD. 2012. Case-control study of the etiology of infant diarrheal disease in 14 districts in madagascar. *PLoS One* 7: e44533.

RASAMBAINARIVO, F. T., ET R. E. JUNGE. 2010. A 12-month survey of gastrointestinal helminth infections of lemurs kept in two zoos in Madagascar. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 41: 638-642.

RÉAU, B. 2002. Burning for zebu: The complexity of deforestation issues in western Madagascar. *Norsk Geografisk Tidsskrift - Norwegian Journal of Geography* 56: 219-229.

ROELKE-PARKER, M. E., L. MUNSON, C. PACKER, R. KOCK, S. CLEAVELAND, M. CARPENTER, S. J. O'BRIEN, A. POSPISCHIL, R. HOFMANN-LEHMANN, H. LUTZ, G. L. MWAMENGELE, M. N. MGASA, G. A. MACHANGE, B. A.

SUMMERS, ET M. J. APPEL. 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379: 441-445.

ROSE, J. B., C. P. GERBA, ET W. JAKUBOWSKI. 1991. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Environmental Science & Technology* 25: 1393-1400.

ROY, S. L., S. M. DELONG, S. A. STENZEL, B. SHIFERAW, J. M. ROBERTS, ET A. KHALAKDINA. 2004. Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2944-2951.

SALYER, S. J., T. R. GILLESPIE, I. B. RWEGO, C. A. CHAPMAN, ET T. L. GOLDBERG. 2012. Epidemiology and molecular relationships of *Cryptosporidium* spp. in people, primates, and livestock from western Uganda. *Plos Neglected Tropical Diseases* 6: e1597.

SALZER, J. S., I. B. RWEGO, T. L. GOLDBERG, M. S. KUHLENSCHMIDT, ET T. R. GILLESPIE. 2007. *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. infections in primates in fragmented and undisturbed forest in western Uganda. *Journal of Parasitology* 93: 439-440.

SCHATZ, G. E. 2002. Taxonomy and herbaria in service of plant conservation: Lessons from Madagascar's endemic families. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 89: 145-152.

SHAW, R. A., ET M. B. STEVENS. 1987. The reactive arthritis of giardiasis. A case report. *Journal of the American Medical Association* 258: 2734-2735.

SHIELDS, J. M., E. R. GLEIM, ET M. J. BEACH. 2008. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia intestinalis* in swimming pools, Atlanta, Georgia. *Emerging Infectious Diseases* 14: 948-950.

SMITH, H. V. 1990. Environmental aspects of *Cryptosporidium* species - a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 83: 629-631.

SMITH, H. V., L. J. ROBERTSON, ET J. E. ONGERTH. 1995. Cryptosporidiosis and giardiasis: The impact of waterborne transmission. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* 44: 258-274.

SMITH, K. F., D. F. SAX, ET K. D. LAFFERTY. 2006. Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biology* 20: 1349-1357.

SPENCER, J. A., K. S. JOINER, C. D. HILTON, J. P. DUBEY, M. TOIVIO-KINNUCAN, J. K. MINC, ET B. L. BLAGBURN. 2004. Disseminated toxoplasmosis in a captive Ring-tailed lemur (*Lemur catta*). *Journal of Parasitology* 90: 904-906.

SRETER, T., ET I. VARGA. 2000. Cryptosporidiosis in birds - A review. *Veterinary Parasitology* 87: 261-279.

STANTIC-PAVLINIC, M., L. H. XIAO, S. GLABERMAN, A. A. LAL, T. ORAZEN, A. RATAJ-VERGLES, J. LOGAR, ET I. BERCE. 2003. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wiener Klinische Wochenschrift* 115: 125-127.

SUZÁN, G., A. ARMIÉN, J. N. MILLS, E. MARCÉ, G. CEBALLOS, M. ÁVILA, J. SALAZAR-BRAVO, L. RUEDAS, B. ARMIÉN, ET T. L. YATES. 2008. Epidemiological considerations of rodent community composition in fragmented landscapes in Panama. *Journal of Mammalogy* 89: 684-690.

TABACHNICK, W. J., R. A. BRAM, J. E. GEORGE, ET R. E. REICHARD. 2002. Threat of foreign arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Journal of Medical Entomology* 39: 405-416.

TAKIZAWA, M. D. M. H., D. L. M. FALAVIGNA, ET M. L. GOMES. 2009. Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Parana, Southern Brazil. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo* 51: 31-35.

TAMINELLI, V., J. ECKERT, T. SYDLER, B. GOTTSSTEIN, L. CORBOZ, ET M. HOFMANN. 1989. Experimental infection of calves and sheep with bovine *Giardia* isolates. *Schweiz Archiv für Tierheilkund* 131: 551-564.

TAN, C. L. 1999. Group composition, home range size, and diet of three sympatric bamboo lemur species (genus *Hapalemur*) in Ranomafana National Park, Madagascar. *International Journal of Primatology* 20: 547-566.

TAYLOR, L. H., S. M. LATHAM, ET M. E. WOOLHOUSE. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Sciences* 356: 983-989.

TEODOROVIC, S., J. M. BRAVERMAN, ET H. G. ELMENDORF. 2007. Unusually low levels of genetic variation among *Giardia lamblia* isolates. *Eukaryotic Cell* 6: 1421-1430.

THOMPSON, R. C. A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology* 126: 15-35.

THOMPSON, R. C. A., C. S. PALMER, ET R. O'HANDLEY. 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Veterinary Journal* 177: 18-25.

THOMPSON, R. C. A., A. SMITH, A. J. LYMBERY, S. AVERIS, K. D. MORRIS, ET A. F. WAYNE. 2010. *Giardia* in western Australian wildlife. *Veterinary Parasitology* 170: 207-211.

TROUT, J. M., M. SANTIN, E. GREINER, ET R. FAYER. 2004. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Veterinary Parasitology* 124: 179-186.

TZIPORI, S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiological Reviews* 47: 84-96.

TZIPORI, S., ET J. K. GRIFFITHS. 1998. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Advances in Parasitology* 40: 5-36.

TZIPORI, S., M. SMITH, C. HALPIN, K. W. ANGUS, D. SHERWOOD, ET I. CAMPBELL. 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Veterinary Record* 112: 116-120.

TZIPORI, S., ET H. WARD. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection* 4: 1047-1058.

UPTON, S., C. MCALLISTER, P. FREED, ET S. BARNARD. 1989. *Cryptosporidium* spp. in wild and captive reptiles. *Journal of Wildlife Diseases* 25: 20-30.

UPTON, S. J., ET W. L. CURRENT. 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting Mammals. *Journal of Parasitology* 71: 625-629.

VAN HEUVERSWYN, F., ET M. PEETERS. 2007. The origins of HIV and implications for the global epidemic. *Current Infectious Disease Reports* 9: 338-346.

VAN ZIJLL LANGHOUT, M., P. REED, ET M. FOX. 2010. Validation of multiple diagnostic techniques to detect *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in free-ranging Western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) and observations on the prevalence of these protozoan infections in two populations in Gabon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 41: 210-217.

VIEITES, D. R., K. C. WOLLENBERG, F. ANDREONE, J. KOHLER, F. GLAW, ET M. VENCES. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8267-8272.

WALLIS, J., ET D. R. LEE. 1999. Primate conservation: The prevention of disease transmission. *International Journal of Primatology* 20: 803-826.

WALSH, P. D., K. A. ABERNETHY, M. BERMEJO, R. BEYERS, P. DE WACHTER, M. E. AKOU, B. HUIJBREGTS, D. I. MAMBOUNGA, A. K. TOHAM, A. M. KILBOURN, S. A. LAHM, S. LATOUR, F. MAISELS, C. MBINA, Y. MIHINDOU, S. N. OBIANG, E. N. EFFA, M. P. STARKEY, P. TELFER, M. THIBAUT, C. E. TUTIN, L. J. WHITE, ET D. S. WILKIE. 2003. Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. *Nature* 422: 611-614.

WEBER, R., R. T. BRYAN, H. S. BISHOP, S. P. WAHLQUIST, J. J. SULLIVAN, ET D. D. JURANEK. 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 1323-1327.

WEBER, R., R. T. BRYAN, ET D. D. JURANEK. 1992. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2869-2873.

WOLFE, N. D., W. M. SWITZER, J. K. CARR, V. B. BHULLAR, V. SHANMUGAM, U. TAMOUFE, A. T. PROSSER, J. N. TORIMIRO, A. WRIGHT, E. MPOUDI-NGOLE, F. E. MCCUTCHAN, D. L. BIRX, T. M. FOLKS, D. S. BURKE, ET W. HENEINE. 2004. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *The Lancet* 363: 932-937.

WOLFSON, J. S., C. C. HOPKINS, D. J. WEBER, J. M. RICHTER, M. A. WALDRON, ET D. M. MCCARTHY. 1984. An association between *Cryptosporidium* and *Giardia* in stool. *New England Journal of Medicine* 310: 788.

WRIGHT, P., E. ERHART, S. TECOT, A. BADEN, S. ARRIGO-NELSON, J. HERRERA, T. MORELLI, M. BLANCO, A. DEPPE, S. ATSALIS, S. JOHNSON, F. RATELOLAHY, C. TAN, ET S. ZOHDY. 2012. Long-term lemur research at Centre Valbio, Ranomafana National Park, Madagascar. *In* Long-Term Field Studies of Primates, P. M. Kappeler, ET D. P. Watts, (eds.). Springer Berlin Heidelberg. pp. 67-100.

WRIGHT, P. C. 1997. The future of biodiversity in Madagascar: A view from Ranomafana National Park. *In* Natural Change and Human Impact in Madagascar, P. B. D. a. G. S. M., (ed.). Smithsonian University Press, Washington D.C. pp. 381-405.

WRIGHT, P. C. 2008. The crisis of the critically endangered greater bamboo lemur (*Prolemur simus*). *Primate Conservation* 23: 5.

WRIGHT, P. C., ARRIGO-NELSON, S.J., HOGG, K.L., BANNON, B., MORELLI, T.-L., WYATT, J., HARIVÉLO, A.L., AND RATELOLAHY, F. . 2009. Habitat disturbance and seasonal fluctuations of lemur parasites in the rain forest of Ranomafana National Park, Madagascar. *In* Primate Parasite Ecology: The Dynamics and Study of Host-Parasite Relationships, C. C. M. Huffman, (ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 311-330.

XIAO, L., R. FAYER, U. RYAN, ET S. J. UPTON. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 72-97.

XIAO, L., ET R. P. HERD. 1994. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Veterinary Parasitology* 55: 257-262.

YODER, A. D., R. M. RASOLOARISON, S. M. GOODMAN, J. A. IRWIN, S. ATSALIS, M. J. RAVOSA, ET J. U. GANZHORN. 2000. Remarkable species diversity in Malagasy mouse lemurs (primates, *Microcebus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11325-11330.

YOUNG, S. L., P. W. SHERMAN, J. B. LUCKS, ET G. H. PELTO. 2011. Why on Earth?: Evaluating hypotheses about the physiological functions of human geophagy. *Quarterly Review of Biology* 86: 97-120.

ZIMMERMAN, S. K., ET C. A. NEEDHAM. 1995. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 1942-1943.

