

Université de Montréal

DÉTECTION ET CARACTÉRISATION D'ISOLATS DE
CRYPTOSPORIDIUM spp. ET DE *GIARDIA* spp. PROVENANT DE
DIFFÉRENTS TYPES D'ÉLEVAGES ET DE LA FAUNE D'UN BASSIN
VERSANT AGRICOLE

par

MYLÈNE GÉNÉREUX

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

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

Août, 2006

©Mylène Généreux, 2006



SF
607
U54
2007
V. 002

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

DÉTECTION ET CARACTÉRISATION D'ISOLATS DE
CRYPTOSPORIDIUM spp. ET DE *GIARDIA* spp. PROVENANT DE
DIFFÉRENTS TYPES D'ÉLEVAGES ET DE LA FAUNE D'UN BASSIN
VERSANT AGRICOLE

présenté par

MYLÈNE GÉNÉREUX

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Alain Villeneuve, président-rapporteur

Sylvain Quessy, directeur de recherche

Caroline Côté, codirectrice de recherche

Julie Paré, membre du jury

Résumé

Cryptosporidium et *Giardia* sont des protozoaires intestinaux transmis par l'eau ou par la voie fécale-orale qui infectent plusieurs espèces animales, incluant l'humain. Leur potentiel zoonotique, leur capacité de survie dans les fèces et l'eau ainsi que leur faible dose infectieuse en font des parasites problématiques en santé animale et humaine. La contamination de l'environnement peut être possible suite à une mauvaise gestion des effluents d'élevages. Cette étude avait pour but d'identifier quelles espèces animales pourraient être à l'origine d'une contamination environnementale, en particulier de l'eau, au sein d'un bassin versant du Québec. D'abord, la détection des parasites s'est effectuée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), tandis que la caractérisation génétique a été rendue possible par *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) et séquençage de fragments d'ADN provenant des gènes COWP de *Cryptosporidium* et β -giardin de *Giardia*. Ainsi, les génotypes propres aux parasites retrouvés chez différentes espèces animales du bassin versant ont pu être comparés à ceux des parasites isolés dans l'eau. Les résultats obtenus indiquent qu'un seul génotype de *Cryptosporidium* est présent dans le bassin versant. En ce qui concerne *Giardia*, plusieurs génotypes ont été retrouvés chez plusieurs des espèces animales étudiées, de même que dans l'eau. Puisque certains génotypes sont identiques pour différentes espèces animales, l'identification de l'espèce animale agissant comme source de contamination environnementale devient difficile à établir. Ces résultats nous permettent de suggérer l'hypothèse que l'eau pourrait servir de vecteur aux parasites, ce qui expliquerait pourquoi deux espèces animales qui sont habituellement les hôtes de parasites différents excrètent tous deux le même génotype. Bien que la variabilité génétique des parasites du bassin versant n'ait pas permis de cibler une espèce animale associée à la contamination environnementale, la méthode de caractérisation utilisée dans cette étude semble toutefois adéquate pour y parvenir.

Mots-clé : *Cryptosporidium*, *Giardia*, caractérisation moléculaire, génotypes, IC-PCR, RFLP, séquençage, bassin versant.

Summary

Cryptosporidium and *Giardia* are both intestinal protozoa which transmission occurs after ingestion of contaminated water or via fecal-oral route. Both parasites infect many animal species, including human, but the zoonotic potential of some species is still unclear. Transmission of both parasites is also possible because of their great persistence in water and feces, and because their respective infectious doses are quite low. Environmental contamination could be possible if animal dejections used as land fertilizers are not managed carefully. Nowadays, molecular techniques are required to correctly characterized *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. The aim of the current study was to identify which animal species are responsible for the environmental contamination in a watershed in Québec. First, the detection and characterization of the parasites in water and in different animal species of the watershed was done by PCR-RFLP and DNA sequencing. Genotypes isolated from animals were compared to those recovered from water samples. Results have shown that one *Cryptosporidium* genotype and many *Giardia* genotypes have been isolated from water and most animal species. It was not possible to identify one source of water contamination because some specific genotypes have been found in various animal species. These results suggest that water could have been involved as carrier of the parasites. According to this hypothesis, specific animal species would excrete parasites which are not infecting them usually. However, even if the genetic typing of the parasites in the current watershed has not led to the identification of the source of the environmental contamination, the method used in this study seems to be appropriate for such an objective.

Keywords: *Cryptosporidium*, *Giardia*, molecular characterization, genotypes, IMS-PCR, RFLP, sequencing, watershed.

Table des matières

<i>IDENTIFICATION DU JURY</i>	<i>ii</i>
<i>RÉSUMÉ</i>	<i>iii</i>
<i>SUMMARY</i>	<i>iv</i>
<i>LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES</i>	<i>viii</i>
<i>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS</i>	<i>ix</i>
<i>REMERCIEMENTS</i>	<i>x</i>
<i>Chapitre 1. INTRODUCTION</i>	<i>1</i>
<i>Chapitre 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE</i>	<i>5</i>
2.1 Description détaillée des protozoaires	6
2.1.1 Historique et taxonomie.....	6
2.1.1.1 <i>Cryptosporidium</i>	6
2.1.1.2 <i>Giardia</i>	7
2.1.2 Développement et transmission.....	10
2.1.2.1 <i>Cryptosporidium</i>	10
2.1.2.2 <i>Giardia</i>	12
2.1.3 Effets sur la santé.....	13
2.2 Épidémiologie	16
2.2.1 Groupes et milieux à risque	16
2.2.2 Distribution géographique	17
2.2.3 Prévalence.....	18
2.2.3.1 Surveillance au Canada.....	18
2.2.3.2 Prévalence mondiale – Humains.....	18
2.2.3.2.1 <i>Giardia</i>	18
2.2.3.2.2 <i>Cryptosporidium</i>	19
2.2.3.3 Prévalence mondiale – Animaux	20

2.3	Eau et environnement.....	22
2.3.1	Prévalence dans l'eau.....	23
2.3.2	Résistance et inactivation.....	24
2.3.3	Modes de contamination.....	26
2.4	Sources de contamination	28
2.4.1	Animaux d'élevage.....	28
2.4.2	Animaux de compagnie	28
2.4.3	Faune.....	30
2.4.4	Humains.....	31
2.5	Méthodes de détection et d'identification.....	32
2.5.1	Techniques de concentration	33
2.5.1.1	<i>Filtration</i>	34
2.5.1.2	<i>Flottation et centrifugation</i>	34
2.5.1.3	<i>Immunocapture</i>	35
2.5.2	Méthodes de détection	36
2.5.2.1	<i>Microscopie directe</i>	37
2.5.2.2	<i>Immunofluorescence</i>	37
2.5.2.3	<i>ELISA (enzyme-linked immunoassay)</i>	39
2.5.2.4	<i>PCR</i>	39
2.5.3	Méthodes d'identification à l'espèce	42
2.5.3.1	<i>RFLP</i>	42
2.5.3.2	<i>Séquençage</i>	43
2.5.4	Caractérisation génétique.....	43
2.5.4.1	<i>Giardia</i>	43
2.5.4.2	<i>Cryptosporidium</i>	45

Chapitre 3. Detection and molecular characterization of <i>Cryptosporidium</i> spp. and <i>Giardia</i> spp. isolates from various animals in two watersheds	50
--	-----------

Chapitre 4. DISCUSSION GÉNÉRALE	74
Chapitre 5. CONCLUSIONS.....	83
BIBLIOGRAPHIE.....	86

Liste des tableaux et des figures

Tableau I. Espèces de <i>Cryptosporidium</i>	7
Tableau II. Génotypes de <i>Giardia lamblia</i>	9
Figure 1a. Cycle de vie de <i>Cryptosporidium parvum</i> chez l'humain	11
Figure 1b. Cycle de vie de <i>Giardia lamblia</i> chez l'humain	13
Table I. <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> detected positive by IFA and PCR in animal fresh feces	66
Table II. <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> detected positive in manures	67
Table III. Isolates of <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> detected in surface water.....	68
Table IV. <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> in surface and drinking water.....	68
Table V. Parasites detected by PCR in drinking water according to the well type and sampling dates.....	69
Figure 1. RFLP profiles of <i>Cryptosporidium</i> COWP gene after <i>Rsa</i> I digestion and SSUrRNA gene after <i>Ssp</i> I and <i>Vsp</i> I digestion.....	70
Figure 2. 327 bp DNA sequence of <i>Cryptosporidium</i> isolates.....	71
Figure 3. Genotype diversity among <i>Giardia</i> isolates after multiple alignment of a 106 bp region of the β -giardin gene.....	72

Liste des sigles et des abréviations

ASPC :	Agence de Santé Publique du Canada
MSSS :	Ministère de la Santé et des Services Sociaux du Québec
MADO :	Maladie à Déclaration Obligatoire
USEPA :	United States Environmental Protection Agency
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
ELISA :	Enzyme-linked immunoassay (méthode immuno-enzymatique)
NAD(P) :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
% :	Pourcentage
pb :	Paire de bases
Da :	Dalton
k :	kilo-
μ :	micro-
L :	litre
m :	milli-
g :	gramme
X g :	facteur gravitationnel
s :	seconde
min :	minute
FITC :	colorant fluorescein isothiocyanate
DAPI :	colorant 4',6'-diamidino-2-phenylindole
GC :	guanine et cytosine

Remerciements

La réalisation d'un projet de maîtrise ne peut pas s'effectuer sans l'aide de plusieurs personnes qui, souvent malgré elles, doivent y mettre une part d'elles-mêmes. Voici donc les gens qui ont permis la bonne réalisation de ce projet et par le fait même, qui ont fait partie de ma vie durant ces deux ans. Il est temps à présent de les remercier comme il convient :

- Mon directeur, Dr Sylvain Quessy, pour m'avoir permis de travailler sur un projet aussi stimulant sans me connaître et pour m'avoir laissé l'indépendance dont j'avais besoin. Son écoute, son sens de l'humour et sa façon de gérer mes états de panique ont été très appréciés... Son côté humain en fait un directeur avec qui il est très plaisant de travailler.

- Ma codirectrice, Dre Caroline Côté, pour tout... Pour m'avoir (subtilement) dirigée vers la maîtrise, pour m'avoir fait confiance, pour son écoute exceptionnelle et sa disponibilité. Elle a joué un grand rôle dans ce qui fait de moi ce que je suis.

- Kathie Roseberry, pour toutes les fois où nous avons si longtemps réfléchi pour trouver comment faire pour que ça marche!!! Je ne crois sincèrement pas que le projet se serait si bien déroulé sans elle. Son organisation et sa rigueur m'ont souvent sauvée de bien des tracas qui auraient pu me poursuivre tout au long du projet.

- Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont bien voulu accepter d'ajouter leur expertise à ce travail.

- Merci aux étudiants du Dr Quessy et du Dre Ann Letellier, ainsi qu'à tous les étudiants d'été et stagiaires qui m'ont prêté main forte pour les échantillonnages et les analyses. En particulier, je tiens à remercier Louise Lessard qui a aidé dans des moments un peu plus « contaminés »...

- Finalement, merci à ma famille, à Evelyn particulièrement, pour son aide de secrétaire... et à Nicolas pour sa présence et son aide permanente.

Vous avez tous fait partie d'un moment important de ma vie. Votre présence n'en a que facilité le passage et l'aboutissement. Merci!!

Chapitre 1.
INTRODUCTION

Cryptosporidium et *Giardia* sont deux protozoaires unicellulaires qui causent des maladies intestinales souvent graves, soit la cryptosporidiose et la giardiose, respectivement. Répandus à travers le monde, ces parasites sont retrouvés chez une large gamme d'hôtes, autant animaux qu'humains, quoique les personnes immunodéprimées de même que les jeunes animaux soient les individus les plus susceptibles d'être sérieusement affectés. Malgré que certaines espèces de *Cryptosporidium* et de *Giardia* soient associées à des hôtes spécifiques, leur transmission zoonotique a pu être établie dans certains cas. Il semble pourtant que la transmission inter-espèces ne fasse toujours pas l'objet d'un consensus. Entre autres, c'est la raison pour laquelle l'étude de leur distribution dans l'environnement devient nécessaire. En effet, les parasites se retrouvant dans les cours d'eau représentent potentiellement une source de contamination pour les gens et les animaux qui s'abreuvent d'eau, si celle-ci n'est pas traitée efficacement.

Par ailleurs, les productions animales peuvent servir de réservoir important des deux parasites, puisque ceux-ci sont excrétés dans les matières fécales. De cette façon, les volumes souvent importants de fumiers épandus dans les champs agricoles peuvent mener à une contamination des cours d'eau si les pratiques de conservation du milieu laissent à désirer (Massanet-Nicolau, 2003). Cette possibilité devient particulièrement significative lorsque l'érosion hydrique en région agricole est accentuée par des pluies importantes. Des quantités considérables de particules de sol et de fumier peuvent alors se retrouver dans les cours d'eau et les contaminer (Chevalier *et al.*, 2004).

Bien que plusieurs espèces-hôtes aient été identifiées pour chacun des protozoaires, les méthodes de détection et de caractérisation traditionnellement utilisées permettent difficilement de décrire quelles sont celles qui sont retrouvées dans l'environnement. De cette façon, il devient très compliqué de déterminer quelle(s) espèce(s) est (sont) responsable(s) de la contamination des cours d'eau. Le but de cette étude est donc de vérifier, par des techniques de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) et de séquençage d'ADN, quels isolats de *Cryptosporidium* et de *Giardia* sont retrouvés dans les fermes d'un bassin versant spécifique du Québec, de même que ceux qui peuvent être retrouvés dans les cours d'eau et l'eau de consommation de ce même bassin versant, soit le bassin de la Rivière-aux-Brochets. En élaborant une banque d'empreintes génétiques des isolats de *Cryptosporidium* et de *Giardia* prélevés dans les élevages et au niveau de différentes espèces animales de la faune environnante, il sera possible de les comparer aux isolats prélevés dans l'eau, pour ainsi potentiellement distinguer la ou les espèce(s) animale(s) agissant comme source de contamination de l'environnement. Aucune étude au Québec n'avait encore été réalisée sur la caractérisation de *Cryptosporidium* et de *Giardia*, que ce soit chez des animaux d'élevage ou de la faune, ou dans l'environnement.

Malgré le fait que *Cryptosporidium* et *Giardia* soient des micro-organismes morphologiquement et taxonomiquement différents, plusieurs parallèles peuvent être établis entre les deux. C'est pour cette raison que souvent, ils seront traités simultanément et ce, afin d'alléger le texte en évitant les répétitions inutiles. Par contre, quelques sections discuteront des protozoaires séparément, afin de mettre l'accent sur certains détails qui distinguent *Cryptosporidium* et *Giardia*. Par ailleurs, le bassin versant de la Rivière-aux-Brochets contient deux petites régions qui sont plus particulièrement visées dans ce projet, soit le ruisseau Wallbridge et le ruisseau aux Castors. Le chapitre trois de ce mémoire traitera des deux petits bassins versants au lieu de prendre en considération la région la plus vaste.

Enfin, il est à noter que certains articles rapportant des faits issus de plusieurs études différentes ont été utilisés comme références. Étant donnée l'importance de l'information incluse dans ces ouvrages ou articles de revue, ils sont régulièrement cités tout au long de ce mémoire, surtout en ce qui a trait aux renseignements généraux qui concernent les parasites. Voici la liste de ces sources, dont les références complètes se retrouvent dans la section bibliographie de ce mémoire :

- Chevalier *et al.*, 2004
- Fayer, 2004
- Fayer *et al.*, 2001
- Groupe scientifique sur l'eau, 2003
- Santé Canada, 2004
- Smith, 1992
- Villeneuve, 2003
- Zarlenga et Trout, 2004

En se référant à ces articles de revue, le lecteur peut sans peine retrouver les études qui ont servi de source à l'information rapportée.

Chapitre 2.
RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Description détaillée des protozoaires

2.1.1 Historique et taxonomie

2.1.1.1 *Cryptosporidium*

Décrits depuis le début du 20^e siècle, les micro-organismes du genre *Cryptosporidium* sont des protozoaires du phylum des Apicomplexa (classe des Sporozoasida, sous-classe des Coccodiasina, ordre des Eucoccidiorida, sous-ordre des Eimeriorina, famille des Cryptosporidiidae) (Santé Canada, 2004). Bien qu'ils aient longtemps été associés aux coccidies, les nouvelles techniques moléculaires ont permis de suggérer que les parasites du genre *Cryptosporidium* doivent plutôt être liés aux grégaires (Fayer, 2004). En effet, les nouvelles technologies ont entre autres pu prouver que *Cryptosporidium* ne possédait pas les organelles ressemblant aux mitochondries habituellement isolées chez les coccidies (Fayer, 2004).

C'est en 1907 que Ernest Edward Tyzzer a isolé pour la première fois *Cryptosporidium muris* des souris présentes dans son laboratoire (Fayer, 2004; Gajadhar et Allen, 2004; Fayer *et al.*, 2000). Puis, c'est en 1912 que Tyzzer a mis en évidence une seconde espèce, *C. parvum*, qui peut infecter environ 150 espèces de mammifères, dont l'humain (Fayer, 2004). Par la suite, *C. meleagridis*, provenant de dindes, a été décrit en 1955, alors que c'est en 1971 que *Cryptosporidium* a pour la première fois été associé à des diarrhées chez des bovins. Depuis, au moins quinze espèces ont été décrites chez plusieurs espèces animales. Le tableau I présente les quinze espèces reconnues selon les hôtes chez qui ils sont généralement isolés (Fayer, 2004). Bien que les espèces ont au départ été différenciées par la morphologie des ookystes, ce sont diverses techniques de biologie moléculaire qui sont dorénavant utilisées à cette fin, d'où le nombre toujours croissant des espèces décrites. Effectivement, selon plusieurs auteurs, les espèces de *Cryptosporidium* varient sensiblement les unes des autres (Santé Canada, 2004; Wade *et al.*, 2000).

Tableau I. Espèces de *Cryptosporidium*

Nom des espèces	Hôtes
<i>C. andersoni</i>	Bovins (<i>Bos taurus</i>)
<i>C. baileyi</i>	Poulet (<i>Gallus gallus</i>)
<i>C. canis</i>	Chien (<i>Canis familiaris</i>)
<i>C. felis</i>	Chat (<i>Felis catis</i>)
<i>C. galli</i>	Oiseaux (Spermestidae, Fringillidae)
<i>C. hominis</i>	Humains (<i>Homo sapiens</i>)
<i>C. meleagridis</i>	Dindon (<i>Meleagris gallopavo</i>)
<i>C. molnari</i>	Poissons (<i>Sparus aurata</i> , <i>Dicentrarchus labrax</i>)
<i>C. muris</i>	Souris (<i>Mus musculus</i>)
<i>C. natorum</i>	Poissons (<i>Naso literatus</i>)
<i>C. parvum</i>	Souris (<i>Mus musculus</i>)
<i>C. saurophilum</i>	Lézards
<i>C. serpentis</i>	Serpents
<i>C. varanii</i>	Varan
<i>C. wrairi</i>	Cochon d'Inde (<i>Cavia porcellus</i>)

Adapté de Fayer, 2004

2.1.1.2 *Giardia*

Décrits pour la première fois en 1681 par van Leeuwenhoek, les parasites du genre *Giardia* (phylum des Protozoa, sous-phylum des Sarcomastigophora, super classe des Mastigophora, classe des Zoomastigophora, ordre des Diplomonadida, famille des Hexamitidae) sont des petits protozoaires flagellés retrouvés dans l'intestin grêle des animaux et des humains (Santé Canada, 2004; Adam, 1991). D'ailleurs, *Giardia* ne semble pas avoir la même spécificité d'hôte que *Cryptosporidium*.

Ainsi, une quarantaine d'espèces de *Giardia* avaient été nommées au début du 20^e siècle (Adam, 1991), en se basant sur l'origine de l'hôte. Ce n'est qu'en 1952 que Filice a proposé la classification encore utilisée aujourd'hui (Adam, 1991). En effet, les travaux de Filice ont plutôt porté sur les caractéristiques morphologiques, notamment sur les variations structurales des corps médians de *Giardia*. De cette façon, un consensus, avec trois espèces, a pu être établi (Adam, 1991). On reconnaît donc *G. lamblia* (syn. *duodenalis* ou *intestinalis*) chez les mammifères, *G. muris* chez les oiseaux et les rongeurs, et *G. agilis* chez les amphibiens (Villeneuve, 2003; Adam, 1991).

Malgré tout, des débats ont toujours lieu au sein de la communauté scientifique puisque chaque année, de nouvelles espèces sont découvertes. Par exemple, *G. psittaci* a été décrite chez la perruche, *G. ardeae* chez le héron et *G. microti* chez le rat musqué (Villeneuve, 2003). Quoique morphologiquement différentes des trois espèces décrites au départ, certains auteurs font valoir la présence de certaines caractéristiques similaires entre *G. ardeae*, *G. psittaci* et *G. lamblia*, d'où une nouvelle classification.

De nos jours, avec la venue des techniques de caractérisation moléculaires, l'hétérogénéité génétique de *Giardia* semble confirmée, ce qui pourrait augmenter significativement le nombre d'espèces, surtout en ce qui a trait à *G. lamblia* (Villeneuve, 2003). Les outils issus de techniques moléculaires ont permis de classifier *G. lamblia* en différents génotypes ou assemblages. De cette façon, on a pu découvrir que malgré le fait que deux *Giardia* soient morphologiquement identiques, la séquence des régions codantes diffère d'un isolat à l'autre, d'où leur distinction au sein de la classification. Le tableau II résume les différents génotypes et assemblages qui ont été retrouvés chez divers hôtes (Adam, 2001).

Bien qu'il soit suggéré dans cette section que différentes espèces de parasites puissent être associées à certaines espèces animales, plusieurs études proposent au contraire la transmission inter-espèces de même qu'un potentiel zoonotique pour plusieurs d'entre elles (Santé Canada, 2004; Morgan, 2000; Pedraza-Diaz *et al.*, 2000). Taylor et Webster (1998) suggèrent que c'est à cause de leur large éventail d'hôtes, donc de leur faible spécificité, que le potentiel zoonotique lié à *Cryptosporidium* et *Giardia* est important. Par exemple, des *Cryptosporidium parvum* d'origine animale, *C. meleagridis* et *C. felis* (Kassa *et al.*, 2004), *Cryptosporidium* type canin et *C. felis* (Pedraza-Diaz *et al.*, 2000), *C. muris* et *C. baileyi* (McGlade *et al.*, 2003b), de même que *G. canis* (Traub *et al.*, 2004) et *G. lamblia* d'origine féline (McGlade *et al.*, 2003b) ont tous été détectés chez des humains. La transmission inter-espèce de *G. lamblia* et *C. parvum* n'est plus exclusive à ces isolats (Groupe scientifique sur l'eau, 2003ab; Taylor et Webster, 1998). La section suivante permettra tout de même de mieux comprendre les différentes routes que peuvent prendre les parasites pour infecter des individus, de même qu'à décrire leur cycle de développement.

Tableau II. Génotypes de *Giardia lamblia*

Génotypes	Assemblages	Hôtes
Génotype A-1	A (groupe 1)	Humain, castor, chat, chien, mouton, bovin, cheval, porc, alpaga, chinchilla, lémur
Génotype A-2	A (groupe 2)	Humain, castor
Génotype B	B (groupe 3 et 4)	Humain, castor, cochon d'Inde, chien, singe
	C et D	Chien
	E	Bovin, mouton, porc, chèvre, alpaga
	F	Chat
	G	Rat

(Adapté de Adam, 2001)

2.1.2 Développement et transmission

2.1.2.1 *Cryptosporidium*

Toutes les espèces de *Cryptosporidium* sont des parasites intracellulaires, mais extracytoplasmiques, logeant dans une vacuole parasitaire (Fayer, 2004; Villeneuve, 2003). De forme plutôt sphérique et d'un diamètre variant de 2 à 6 μm , les ookystes sont les seules structures qui peuvent survivre hors de l'hôte (Fayer, 2004; Groupe scientifique sur l'eau, 2003a; Villeneuve, 2003). Ce sont d'ailleurs ces éléments qui ont le pouvoir de contaminer d'autres individus.

Ainsi, le cycle de vie de *Cryptosporidium* comprend six étapes (Groupe scientifique sur l'eau, 2003a) (voir Figure 1a). L'hôte commence par ingérer des ookystes qui subissent rapidement un dékystement. Quatre sporozoïtes sont alors libérés et parasitent les cellules épithéliales gastro-intestinales. À maturité, les sporozoïtes deviennent des trophozoïtes, puis des mérozoïtes qui infectent d'autres cellules épithéliales. Cette étape, la mérogonie, correspond à la reproduction asexuée. Par la suite, lors de la reproduction sexuée, les mérozoïtes donnent naissance à des gamètes qui se développent finalement en ookystes. Environ 20 % des ookystes conservent une paroi mince et servent à maintenir l'infection chez l'hôte. La majorité des ookystes développent cependant une double paroi épaisse et sont évacués avec les matières fécales (Fayer, 2004; Santé Canada, 2004; Barwick *et al.*, 2003; Groupe scientifique sur l'eau, 2003a).

D'ailleurs, ce sont les ookystes qui contaminent l'environnement, puisque ce sont les seules structures du cycle de vie qui soient stables et suffisamment résistantes à des milieux défavorables pour survivre hors du système digestif de l'hôte. D'autres individus peuvent donc s'infecter à leur tour suite à l'ingestion de matériel contaminé, que ce soit par contacts directs ou indirects entre humains ou par l'entremise d'animaux, ou encore par l'eau, les aliments et l'air (Santé Canada, 2004; Fayer *et al.*, 2000). Il est toutefois reconnu que les contacts directs de personne à personne, par la voie fécale-orale, sont la route de transmission de prédilection pour *Cryptosporidium* en milieu

fermés, tels que les hôpitaux et garderies (Guy *et al.*, 2003; Fayer *et al.*, 2000; Ruest *et al.*, 1998). Par ailleurs, c'est par l'ingestion d'eau contaminée que les gens contractent le plus souvent la maladie (Chevalier *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003; Fayer *et al.*, 2000; Taylor et Webster, 1998). L'ingestion d'aliments contaminés, quoique non-négligeable, est moins documentée, puisque la détection est plutôt complexe (Robertson *et al.*, 2005; Gajadhar et Allen, 2004; Guy *et al.*, 2003). La contamination aérienne, par des aérosols, doit également être envisagée (Fayer *et al.*, 2000).

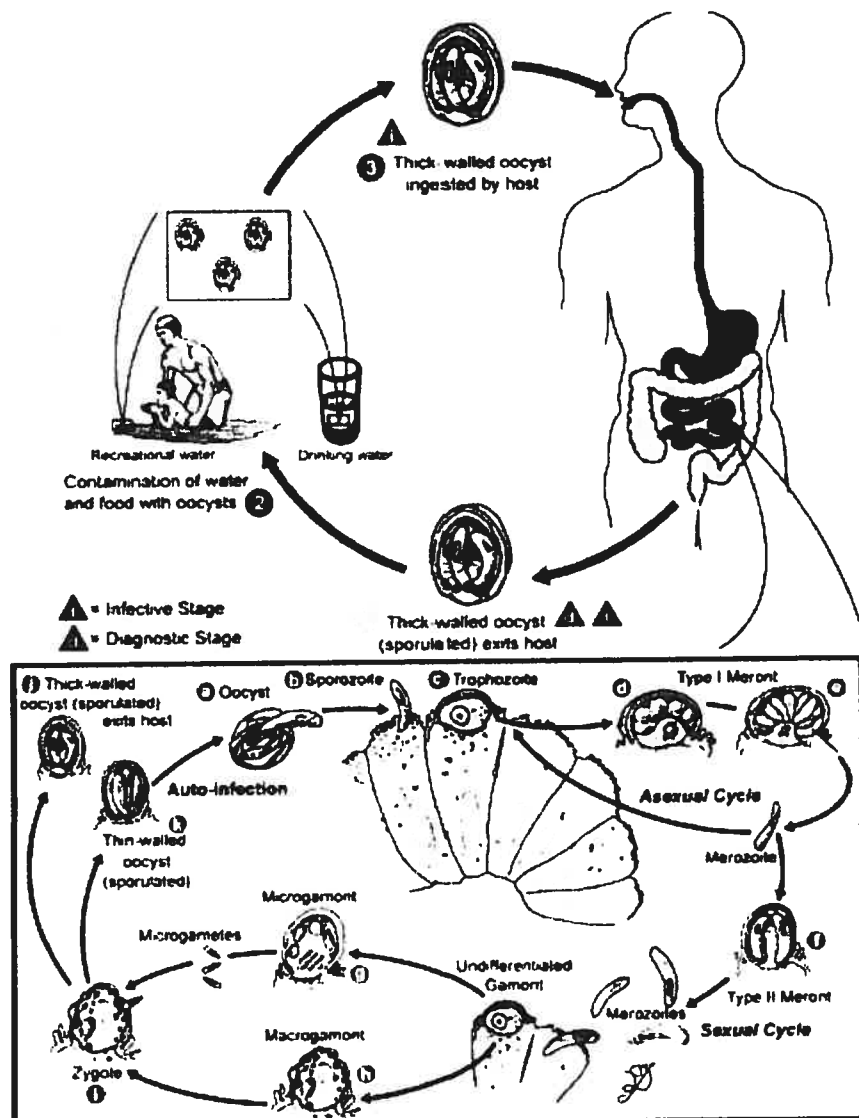


Figure 1a. Cycle de vie de *Cryptosporidium parvum* chez l'humain (basé sur le Center for Disease Control, www.dpd.cdc.gov)

2.1.2.2 *Giardia*

Tout comme *Cryptosporidium*, le cycle de vie de *Giardia* comporte plusieurs étapes, où deux types morphologiques peuvent être retrouvés (Figure 2a). D'abord, le trophozoïte, non infectieux, qui possède quatre paires de flagelles, colonise les villosités intestinales de l'hôte. Le trophozoïte a une forme de poire coupée en deux, mesure de 9 à 21 μm de long et 5 à 15 μm de large et possède deux noyaux. Il possède également une paire de corps médians et un large disque ventral par lequel il se nourrit (Santé Canada, 2004). Le kyste est la forme infectieuse pouvant survivre dans diverses conditions environnementales (Groupe scientifique sur l'eau, 2003b). De taille plus petite que le trophozoïte, de 8 à 12 μm de long sur 7 à 10 μm de large, il prend une forme elliptique et contient deux à quatre noyaux. La nature de la paroi du kyste suscite une certaine controverse dans la littérature, puisque certains auteurs proposent une paroi épaisse composée d'une couche filamenteuse externe couvrant deux couches membraneuses internes (Adam, 2001). D'autres considèrent plutôt que la paroi du kyste serait formée de chitine (Villeneuve, 2003). Tous s'entendent toutefois sur la stabilité du kyste hors de son hôte, de même que sa capacité d'infecter d'autres individus.

Suite à l'ingestion de kystes via de l'eau ou des aliments contaminés ou lors de contacts avec un individu contaminé, il y a dékystement dans le duodénum (Groupe scientifique sur l'eau, 2003b; Adam, 2001). C'est le contact avec le milieu acide de l'estomac qui induirait le dékystement (Adam, 2001). Deux trophozoïtes sont alors libérés et ceux-ci se fixent à la paroi intestinale (Groupe scientifique sur l'eau, 2003b). Par division binaire, le trophozoïte peut se reproduire d'une manière asexuée, donnant par le fait même naissance à deux autres trophozoïtes. Sous l'effet des sels biliaires, le trophozoïte se change peu à peu en kyste, à mesure qu'il est emporté vers le côlon. Le cycle est ainsi complété, puisque les kystes peuvent être excrétés dans les matières fécales et induire un nouveau cycle chez un autre hôte (Barwick *et al.*, 2003).

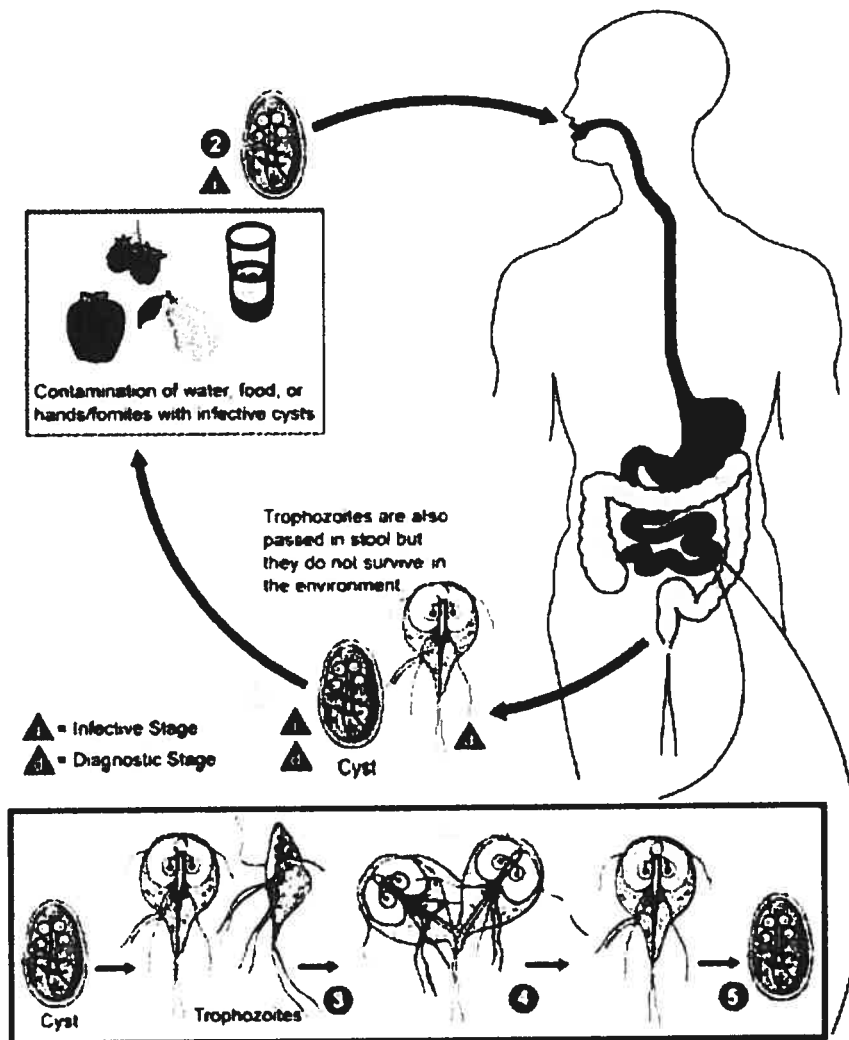


Figure 1b. Cycle de vie de *Giardia lamblia* chez l'humain (basé sur le Center for Disease Control, www.dpd.cdc.gov)

2.1.3 Effets sur la santé

Étant des parasites gastro-intestinaux, *Cryptosporidium* et *Giardia* causent tous deux des gastro-entérites semblables par plusieurs éléments. Les maladies induites, soit la cryptosporidiose dans le cas d'une infection à *Cryptosporidium* et la giardiose dans le cas de *Giardia*, peuvent être contractées par l'entremise de plusieurs types de substances contaminées, quoique Guy *et al.* (2003) reconnaissent que 90 % des gastro-entérites à *Cryptosporidium* ou à *Giardia* sont liées à l'ingestion d'eau contaminée, alors que seulement 10 % sont liées aux aliments. Par ailleurs, *Giardia* est le parasite intestinal le

plus souvent diagnostiqué dans le monde (Guy *et al.*, 2003), de même qu'en Amérique du Nord (Chevalier *et al.*, 2004), et est plus souvent associé à des épidémies que *Cryptosporidium* (Guy *et al.*, 2003). Cette idée est partagée par l'équipe de Verweij *et al.* (2004), puisque leurs travaux font mention du fait que *G. lamblia* est la principale cause de diarrhée non-virale dans les pays industrialisés. Par contre, les épidémies de cryptosporidiose ont, par le passé, affecté un plus grand nombre de personnes que les épidémies de giardiose (Guy *et al.*, 2003).

Cryptosporidium et *Giardia* sont reconnus comme étant des causes significatives de l'augmentation du nombre de cas de maladies intestinales chez les animaux et les humains, la cryptosporidiose étant même identifiée comme étant une infection en émergence (Chevalier *et al.*, 2004; Taylor et Webster, 1998). Au Canada, les deux parasites font l'objet d'une surveillance nationale chez les humains, puisqu'ils sont tous deux inscrits sur la liste des maladies à déclaration obligatoire (MADO), depuis 1987 pour la giardiose et depuis 2003 pour la cryptosporidiose (Santé Canada, 2004).

La section précédente a permis de mettre en évidence que c'est par l'ingestion de kystes ou d'ookystes que l'individu contracte les infections. Les doses infectantes permettant d'induire des symptômes cliniques chez l'hôte varient selon les études. Dans le cas de *Cryptosporidium*, une dose variant de 10 à 1024 ookystes ingérés induirait l'infection chez l'humain immunocompétent, quoique des doses de 30 à 132 ookystes soient plus souvent rencontrées dans la littérature (Chevalier *et al.*, 2004; Fayer, 2004; Kassa *et al.*, 2004; Santé Canada, 2004; Cacciò *et al.*, 2003; Groupe scientifique sur l'eau, 2003a; Villeneuve, 2003; Graczyk *et al.*, 2000). Chez les individus immunosupprimés, l'ingestion d'un ookyste pourrait induire l'infection (Graczyk *et al.*, 2000). Un consensus devient difficile à établir, puisque des variables significatives liées à l'individu ou à l'isolat doivent être prises en considération (Villeneuve, 2003).

Il semble que le nombre de micro-organismes pouvant induire l'infection chez les animaux fasse l'objet d'une variabilité plus marquée encore. Chez la souris, on estime qu'une ingestion de 500 à 1000 ookystes est nécessaire à l'induction de

l'infection, tandis que l'agneau peut s'infecter après l'ingestion d'un seul ookyste (Villeneuve, 2003). Toutefois, dans ce dernier cas, il semble qu'une dose plus élevée soit nécessaire pour déclencher une cryptosporidiose clinique (Villeneuve, 2003).

Dans le cas de *Giardia*, la dose minimale infectante est de l'ordre de 10 à 100 kystes (Chevalier *et al.*, 2004; Groupe scientifique sur l'eau, 2003b; Villeneuve, 2003), quoique Santé Canada (2004) et Cacciò *et al.* (2003) proposent que l'ingestion de 1 à 10 kystes puisse provoquer l'éclosion de l'infection. Encore une fois, puisqu'il existe des différences importantes de virulence et de diversité antigénique entre les isolats et que les caractéristiques des individus infectés doivent être prises en considération, un consensus sur la dose infectante requise n'est pas établi (Santé Canada, 2004; Morgan, 2000).

Les signes cliniques associés à la cryptosporidiose sont très semblables à ceux de la giardiose (O'Handley *et al.*, 1999). En effet, les symptômes regroupent diarrhée, déshydratation, nausées, douleurs et crampes abdominales, céphalées, fièvre, anorexie et perte de poids (Groupe scientifique sur l'eau, 2003a; Taylor et Webster, 1998; MacKenzie *et al.*, 1994). Les diarrhées liées à *Cryptosporidium* sont caractérisées par d'abondantes selles aqueuses et jaunâtres, tandis que celles reliées à *Giardia* sont plutôt molles et malodorantes (Groupe scientifique sur l'eau, 2003b). On reconnaît qu'une période d'incubation durant en moyenne sept jours précède l'apparition de signes cliniques. La durée de l'infection dépend évidemment de l'état immunitaire de l'individu et varie de quelques jours à plusieurs mois (Groupe scientifique sur l'eau, 2003b).

La giardiose chez les animaux peut être traitée par différents agents antimicrobiens, quoique l'usage d'aucun d'entre eux n'est homologué à cette fin au Canada (Villeneuve, 2003). Des substances médicamenteuses telles que le métronidazole, le dimétridazole et le fenbendazole sont entre autres utilisées pour lutter contre l'infection (Groupe scientifique sur l'eau, 2003b; Villeneuve, 2003). Le fenbendazole est toutefois reconnu comme étant le médicament le plus utilisé contre la giardiose (O'Handley *et al.*, 1999; Ruest *et al.*, 1998).

Jusqu'à maintenant, aucun traitement antimicrobien ne s'est avéré efficace contre la cryptosporidiose (Santé Canada, 2004). Villeneuve (2003) et Santé Canada (2004) exposent toutefois une liste de substances pour lesquelles on a démontré une certaine réduction des symptômes, sans les éliminer complètement.

2.2 Épidémiologie

Malgré le fait qu'il existe plusieurs voies de transmission qui accentuent l'incidence des maladies, plusieurs autres facteurs sont susceptibles d'influencer le niveau d'infection au sein des élevages et dans la population.

2.2.1 Groupes et milieux à risque

D'un côté, Taylor et Webster (1998) dressent une liste intéressante des paramètres qui peuvent affecter l'incidence des infections chez les animaux. En effet, pour ce qui est des veaux, la surpopulation (densité de population trop élevée pour l'espace), le manque d'hygiène, le stress et le transport peuvent augmenter significativement le risque d'infections cliniques. La contamination se produit entre autres par la coprophagie ou suite aux contacts étroits entre les animaux. Par ailleurs, il semble que l'âge des animaux influence également leur susceptibilité à l'infection. Ainsi, les jeunes individus représentent le groupe d'animaux le plus sensible (Scorza *et al.*, 2003; Villeneuve, 2003; Wade *et al.*, 2000), quoique l'équipe de Olson *et al.* (1997b) ait suggéré une influence de l'âge seulement en ce qui a trait à certaines espèces de parasites. D'autres études ont même relevé un impact significatif du sexe chez l'écureuil mâle (Atwill *et al.*, 2001), de même que de la saison, alors que *Giardia* a principalement été détectée à la fin de l'automne et *Cryptosporidium* au printemps et en été (Heitman *et al.*, 2002). L'étude de Wade *et al.* (2000) n'a toutefois pas obtenu de résultats significatifs concernant un patron d'infection lié à la saison, contrairement à l'étude de Heitman *et al.* (2002).

Chez l'humain, la littérature fait état de plusieurs groupes et situations à risque. Taylor et Webster (1998) ont rapporté des cas d'infection suite à des visites éducatives à la ferme. Il semble également que le fait de posséder un animal de compagnie augmente significativement le risque d'infection (McGlade *et al.*, 2003b; Robertson *et al.*, 2000; Taylor et Webster, 1998). En général, il est reconnu que les personnes immunosupprimées, notamment les gens atteints du virus du SIDA, font partie des groupes les plus à risque (Gajadhar et Allen, 2004; Bednarska *et al.*, 2003; Villeneuve, 2003; Robertson *et al.*, 2000; Mayer et Palmer, 1996). D'autres groupes populationnels ont également été identifiés comme ayant un risque élevé d'acquérir des zoonoses parasitaires (Robertson *et al.*, 2000). Parmi ceux-là, notons les jeunes enfants (Chevalier *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2000), les femmes enceintes (Robertson *et al.*, 2000), les mères et le personnel de garderie (Chevalier *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 2003), les fermiers, les vétérinaires et le personnel travaillant avec des animaux (Robertson *et al.*, 2000), de même que les gens travaillant dans les hôpitaux et centres de jour (Kassa *et al.*, 2004).

2.2.2 Distribution géographique

Puisque les épisodes de cryptosporidiose et de giardiose sont la plupart du temps associés à un traitement de l'eau inadéquat ou encore aux endroits où l'hygiène est déficiente, les parasites sont présents sur tous les continents, que ce soit dans les milieux favorisés ou dans les pays en développement. Au Canada, il ne semble pas y avoir de localisations géographiques plus propices aux parasites, la prévalence étant uniforme partout au pays (Olson *et al.*, 1997a). Pourtant, il semblerait que certains isolats présenteraient des différences génétiques liées à l'emplacement géographique (Rocha *et al.*, 2003). En effet, plusieurs études ont porté sur le sujet (Rocha *et al.*, 2003; Spano *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 1997a) et suggèrent que certains groupes et assemblages sont davantage prévalents dans certaines régions (Hopkins *et al.*, 1997).

2.2.3 Prévalence

2.2.3.1 Surveillance au Canada

Grâce au programme de surveillance du Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses de l'Agence de Santé Publique du Canada (ASPC), on peut établir un portrait général de la situation quant au nombre de cas de giardiose et de cryptosporidiose qui sont déclarés annuellement chez des humains au Canada. De cette façon, des données sont accessibles depuis 1998 en ce qui concerne *Giardia*, et depuis 2000 pour *Cryptosporidium*. En effet, même si la cryptosporidiose n'est devenue formellement une maladie à déclaration obligatoire (MADO) qu'en 2003, le recueil de données a débuté en 2000. Toutefois, il faut souligner qu'une faible proportion des cas réels est déclarée.

Ainsi, pour faire le portrait des maladies au Canada, le rapport mensuel de septembre 2005 de l'ASPC décrit 150 cas de cryptosporidiose et 2362 cas de giardiose déclarés de janvier à septembre 2005 et ce, avec des cas présents dans chacune des provinces et dans tous les territoires canadiens.

Au Québec, le nombre de cas déclarés annuellement de giardiose n'a pas cessé d'augmenter depuis 1988. Durant cette période, les hommes ont été légèrement plus affectés que les femmes. En 2002, 955 cas ont été déclarés, avec un taux d'incidence beaucoup plus élevé chez les enfants âgés de 1 à 4 ans, peu importe le sexe (MSSS, 2005).

2.2.3.2 Prévalence mondiale – Humains

2.2.3.2.1 *Giardia*

Les travaux de Chevalier *et al.* (2004) dressent un portrait intéressant de la situation en ce qui concerne les prévalences observées en Amérique du Nord. Ainsi,

dans les pays industrialisés, on estime que la prévalence de *Giardia* dans les selles humaines varie de 2 à 7 % (Chevalier *et al.*, 2004), alors qu'elle peut atteindre 20 à 30 % dans les pays en développement (Rocha *et al.*, 2003). On estime à 200 millions le nombre de personnes atteintes de giardiose symptomatique en Asie, en Afrique et en Amérique latine, avec une incidence de 500 000 nouveaux cas chaque année (Traub *et al.*, 2004; Sulaiman *et al.*, 2003).

Aux États-Unis, l'incidence de la giardiose peut être généralement élevée, atteignant des taux de 24 cas par 100 000 habitants au Wisconsin et 45,6 cas par 100 000 habitants au Vermont (Chevalier *et al.*, 2004). L'équipe de Hlavsa *et al.* (2005) appuie ces données en suggérant également une incidence plus élevée de giardiose dans les États du nord du pays.

Au Canada, Chevalier *et al.* (2004) ont rapporté une incidence moyenne de giardiose de 25 cas par 100 000 habitants en Ontario, pour la période s'étendant de 1990 à 1998, avec une nette prédominance chez les enfants de moins de 5 ans (taux de 75 cas par 100 000 habitants). Au Québec, l'incidence de la giardiose s'est accrue depuis le début des années 90, atteignant un taux de 14 cas par 100 000 habitants en 1999. Encore une fois, un taux supérieur chez les jeunes de 1 à 4 ans (taux de 65 cas par 100 000 habitants) a pu être noté.

2.2.3.2.2 *Cryptosporidium*

Tout comme dans le cas de la giardiose, la cryptosporidiose est présente dans les pays en voie de développement avec une incidence plus importante que dans les pays industrialisés. En effet, Fayer (2004) souligne la situation en rapportant des incidences allant jusqu'à 21 % en Afrique, 31.5 % en Amérique latine, 13 % en Asie, comparé à des incidences de 14.1 % et 4.3 % en Europe et en Amérique du Nord, respectivement. D'ailleurs, il y aurait de 250 à 500 millions cas d'infection à *C. parvum* à chaque année en Asie, en Afrique et en Amérique latine selon les évaluations de Smith et Rose (1998). Aux États-Unis, on reconnaît qu'environ 2 % de la population est porteuse de

Cryptosporidium (Fayer *et al.*, 2000). Des 15 millions de personnes qui consultent un médecin chaque année suite à un épisode de diarrhée, on estime que 300 000 d'entre elles seraient infectées par *Cryptosporidium* (Fayer *et al.*, 2000).

En Amérique du Nord et en Europe, on estime que 2.2 % des cas de diarrhée chez les personnes immunocompétentes et 14 % des cas chez les individus immunodéprimés seraient reliés à la cryptosporidiose (Chevalier *et al.*, 2004). Au Québec, peu de données permettent d'évaluer l'ampleur de l'infection, la cryptosporidiose étant sous surveillance depuis 2000 seulement (Chevalier *et al.*, 2004). Par contre, les données ontariennes peuvent servir de point de repère, puisqu'on rapporte un taux de 2 cas par 100 000 habitants, avec un niveau supérieur chez les enfants de 0-4 ans (12 cas pour 100 000 personnes) (Majowicz *et al.*, 2001).

2.2.3.3 Prévalence mondiale – Animaux

Plusieurs travaux ont porté sur la prévalence de *Cryptosporidium* et/ou de *Giardia* au sein des élevages (McAllister *et al.*, 2005; Chevalier *et al.*, 2004; Ruest *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 1997b), des animaux domestiques (Capelli *et al.*, 2003; McGlade *et al.*, 2003b; Robertson *et al.*, 2000) ou encore de la faune (Dunlap et Thies, 2002; Heitman *et al.*, 2002; Graczyk *et al.*, 1998). Bien que leurs auteurs aient tenté de quantifier le nombre de parasites chez les animaux, les études sont rarement comparables, étant donnée la grande variation en ce qui a trait aux régions étudiées, aux protocoles suivis, de même qu'aux techniques d'analyse utilisées. La revue de Villeneuve (2003) dresse un excellent portrait de ce que la littérature peut donner comme résultats de prévalences chez les animaux dans plusieurs pays et ce, que ce soit pour *Cryptosporidium* ou pour *Giardia*. Dans cette section, seules les données concernant le Canada seront présentées.

D'une manière générale, il est reconnu que ce sont les bovins qui agissent comme principal réservoir de *Cryptosporidium* et de *Giardia*, avec une nette propension

à infecter les jeunes individus (Chevalier *et al.*, 2004). Au Canada, plusieurs études ont été menées afin de déterminer la prévalence des deux parasites chez les bovins (McAllister *et al.*, 2005; O'Handley *et al.*, 2000; Ruest *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 1997b).

Les résultats de l'étude de Olson *et al.* (1997b), effectuée à l'échelle canadienne, dans 9 provinces, sur 15 fermes différentes, donnent une bonne estimation de la situation qui règne dans la plupart des espèces animales d'élevage. L'étude présente des prévalences chez les bovins (n=104) de 20 % pour *Cryptosporidium* et de 29 % pour *Giardia*. Chez le mouton (n=89), des prévalences de 23 % et de 38 % ont été observées pour *Cryptosporidium* et *Giardia*, respectivement. Chez le porc (n=236), pour qui l'infection est presque toujours asymptomatique (Chevalier *et al.*, 2004), des prévalences de 11 % pour *Cryptosporidium* et de 9 % pour *Giardia* ont été observées. Enfin, chez le cheval (n=35), des prévalences de 17 % pour *Cryptosporidium* et de 20 % pour *Giardia* ont été observées. Ces résultats ont été obtenus par immunofluorescence.

Comparées à cette étude, d'autres, qui ont été réalisées à plus petite échelle, révèlent des prévalences plus importantes dans plusieurs cas. En effet, les études de Olson *et al.* (1997a), McAllister *et al.* (2005) et O'Handley *et al.* (2000) ont porté sur l'état des troupeaux en Colombie-Britannique. Toutes ces études ont utilisé l'immunofluorescence comme technique de détection. D'un côté, on a relevé des prévalences de 59 % pour *Cryptosporidium* et 73 % pour *Giardia* chez 386 veaux laitiers du sud de la province (Olson *et al.*, 1997b). D'un autre côté, l'échantillonnage chez 669 bovins de boucherie a permis de relever des prévalences de 29 % pour *Cryptosporidium* et 8.7 % pour *Giardia* dans la même province (McAllister *et al.*, 2005).

Au Québec, les travaux de Chevalier *et al.* (2004) dénotent une prévalence de 10 % pour *Cryptosporidium* chez les bovins adultes. Cette prévalence peut atteindre 100 % si on considère seulement les veaux. Pour ce qui est de *Giardia*, on considère qu'entre 20 et 75 % du bétail serait infecté. Enfin, l'étude de Ruest *et al.* (1998), effectuée dans 505 fermes laitières québécoises, rapporte que 88.7 % des troupeaux étaient infectés par

Cryptosporidium et 45.7 % par *Giardia*. Cette recherche a permis de dresser le portrait, région par région, des taux d'infection dans les fermes laitières.

Les données recueillies sur la prévalence de *Cryptosporidium* ou de *Giardia* chez les animaux suggèrent qu'une bonne quantité de micro-organismes pathogènes peut se retrouver dans l'environnement. La prochaine section tentera de cerner la question des deux parasites quant à la problématique qu'ils soulèvent lorsqu'ils se dispersent dans l'environnement.

2.3 Eau et environnement

Bien que plusieurs épidémies et éclosions de gastro-entérites liées à *Cryptosporidium* et/ou à *Giardia* aient pu être répertoriées au fil des ans, peu d'études traitant exclusivement de ces parasites ont été menées au Canada. Puisque les deux protozoaires peuvent être transmis par l'eau, les cas de cryptosporidiose ou de giardiose peuvent être associés à l'eau de consommation, aux puits, aux lacs et rivières, de même qu'aux piscines privées ou publiques (Guy *et al.*, 2003). L'eau de surface, tout comme l'eau souterraine, présente des risques de contamination microbienne, incluant par le fait même les parasites comme *Cryptosporidium* et *Giardia* (Schuster *et al.*, 2005).

Au Canada et aux États-Unis, plusieurs éclosions chez l'homme ont été associées à *Cryptosporidium* et *Giardia* (Hlavsa *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 1997b). D'ailleurs, *Giardia* s'est révélé être l'agent causal d'infections d'origine hydrique le plus souvent diagnostiqué au Canada (Schuster *et al.*, 2005) et aux États-Unis (Ongerth *et al.*, 1995). La plus importante éclosion de cryptosporidiose s'est produite aux États-Unis, à Milwaukee (Wisconsin), où 403 000 personnes ont été touchées par la maladie (Corso *et al.*, 2003; Naumova *et al.*, 2003; MacKenzie *et al.*, 1994). Bien que plusieurs paramètres sont reconnus comme ayant influencé cet épisode, c'est un problème au niveau du traitement de l'eau à l'usine qui est généralement identifié comme cause principale (MacKenzie *et al.*, 1994). Même si les ookystes de

Cryptosporidium et les kystes de *Giardia* se retrouvent souvent en faible quantité dans l'environnement à cause, notamment, de leur dilution dans l'eau, ils ont tout de même souvent été retrouvés dans l'eau du Canada et des États-Unis (Guy *et al.*, 2003; Ong *et al.*, 1996; Smith, 1992). D'ailleurs, Wallis *et al.* (1996) proposent qu'il est très probable que la vraie incidence de cryptosporidiose et de giardiose liée à l'eau soit hautement sous-estimée au Canada.

2.3.1 Prévalence dans l'eau

Au Canada, Guy *et al.* (2003) ont rapporté une contamination de l'eau de surface à des taux variant de 20 à 64 %, alors que des valeurs variant de 60 à 96 % sont rapportées aux États-Unis. Au Royaume-Uni, on estime que 50 % de l'eau de surface est contaminée à *Cryptosporidium*, comparé à 26 % pour l'eau traitée (Smith et Rose, 1998). En Colombie-Britannique, deux bassins versants jumeaux ont été étudiés quant à la qualité microbienne de leur eau respective (Ong *et al.*, 1996). On a démontré, dans les deux bassins, une prévalence importante des deux parasites, avec une influence saisonnière en ce qui concerne *Giardia*. En effet, la quantification des kystes prélevés dans l'eau était plus appréciable en hiver, ce qui correspondrait aux périodes de vèlage. Cette situation est d'ailleurs expliquée par Villeneuve (2003), puisque c'est dans les 120 premiers jours de leur vie que les veaux excrètent le plus grand nombre de kystes.

Au Québec, une étude menée sur la portion de 300 km du bassin hydrographique du fleuve Saint-Laurent, reliant Montréal à Québec, a également suggéré une présence considérable des parasites (Payment *et al.*, 2000). En effet, l'eau brute des 45 stations de traitement d'eau potable étudiées a été trouvée positive par immunofluorescence à *Cryptosporidium* et à *Giardia*, à des concentrations variées. Le risque d'infection pour la population consommant l'eau de cette région variait de moins de 1 % à 75 %. De plus, les auteurs ont noté une influence saisonnière dans le cas de *Cryptosporidium*, avec un nombre d'ookystes plus élevé en automne et en hiver, de même que lors de pluies abondantes.

Finalement, l'étude de Wallis *et al.* (1996), effectuée dans 72 municipalités canadiennes, dresse un portrait de la situation qui prévaut au pays. De cette façon, de tous les échantillons d'eau prélevés, 21 % de l'eau brute et 18.2 % de l'eau traitée contenaient des kystes de *Giardia*, tandis que des ookystes de *Cryptosporidium* ont été détectés dans 4.5 % de l'eau brute et 3.5 % de l'eau traitée. Cependant, les concentrations rapportées étaient plutôt faibles, de l'ordre de 2 kystes par 100 litres et 0.5 ookyste par 100 litres, ce qui ne serait pas suffisant pour induire l'infection (Villeneuve, 2003). Les tests de viabilité effectués sur les isolats découverts au cours de cette étude ont montré que moins de 25 % des kystes et des ookystes étaient viables. Les chercheurs notent toutefois que le modèle utilisé, la gerbille (*Meriones unguiculatus*), peut provoquer une quantité importante de résultats faux négatifs.

Dans ces études, la présence de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans les cours d'eau, de même que dans les systèmes d'eau potable canadiens, a pu être constatée. Malgré le fait que les concentrations trouvées dans l'environnement sont souvent faibles, de nombreux facteurs inhérents à la nature même des parasites font en sorte que les risques d'infection ne soient pas nuls.

2.3.2 Résistance et inactivation

Lorsqu'ils sont excrétés de l'hôte, les kystes et les ookystes sont sous leurs formes stables, formes les plus résistantes. Ils peuvent ainsi survivre à plusieurs milieux qui, a priori, pourraient être jugés défavorables. Retrouvés dans le sol, les (oo)kystes peuvent survivre si les conditions leur sont convenables. Ainsi, la survie des parasites est liée aux conditions physico-chimiques (Chevalier *et al.*, 2004), au degré d'humidité (Robertson *et al.*, 2000), à la porosité, au pH (Fayer, 2004; Barwick *et al.*, 2003) et à la texture du sol (Zarlenga et Trout, 2004). La survie des micro-organismes pathogènes dans le sol est l'étape qui précède la contamination de l'eau, puisque les micro-organismes peuvent suivre des mouvements horizontaux ou verticaux pour se retrouver au niveau des cours d'eau ou du sous-sol (Chevalier *et al.*, 2004). Retrouvés dans l'eau,

les (oo)kystes peuvent survivre plus longtemps que dans le sol. Toutefois, la température, le pH et le taux d'oxygène doivent être adéquats (deRegnier *et al.*, 1989). Ainsi, il est reconnu que plus la température est basse, mais au dessus de 0°C, plus la survie de *Giardia* (deRegnier *et al.*, 1989) et de *Cryptosporidium* (Fayer, 2004) dans l'eau est prolongée. L'étude de deRegnier *et al.* (1989) a permis de constater que les kystes de *Giardia* demeurent viables après 84 jours dans l'eau de rivière l'hiver, et meurent après 24 jours dans les mêmes conditions à l'automne.

De leur côté, les ookystes de *Cryptosporidium* peuvent survivre plusieurs mois dans les cours d'eau si la température demeure au dessus de 0°C. En effet, dans des échantillons d'eau déminéralisée maintenus de 0 à 20°C, les ookystes demeurent infectieux après six mois. Lorsque l'eau atteint 35°C, l'ingestion d'eau est sans gravité après une semaine, puisque les ookystes ne sont plus infectieux suite à ce délai (Fayer, 2004).

D'une manière plus générale, lorsqu'on veut éliminer les parasites de l'eau pour qu'elle devienne propre à la consommation, il faut savoir que *Cryptosporidium* et *Giardia* sont très tolérants au chlore (Betancourt et Rose, 2004; Chevalier *et al.*, 2004; Fayer, 2004). Ainsi, les ookystes de *Cryptosporidium* sont inactivés par 80 mg par litre de chlore pendant deux heures, tandis qu'à une concentration de 2 mg par litre de chlore, les kystes de *Giardia* survivent jusqu'à 120 minutes (Chevalier *et al.*, 2004). Aux concentrations généralement utilisées dans les systèmes de traitement de l'eau potable, les parasites demeurent souvent viables et restent infectieux (Fayer, 2004; Rimhanen-Finne *et al.*, 2002).

D'autres procédés sont également reconnus comme ayant un pouvoir d'inactivation sur les parasites, notamment les cycles gels-dégels et les températures élevées (Fayer, 2004; Gajadhar et Allen, 2004; Robertson *et al.*, 1992), les rayons UV (Payment et Gehr, 2004; Mofidi *et al.*, 2002), l'ozonation (Payment et Gehr, 2004; Mayer et Palmer, 1996) et la dessiccation (Robertson *et al.*, 1992). Toutefois, des raisons telles que le coût, l'efficacité variable, ainsi que la production de sous-produits

indésirables font en sorte que l'utilisation de ces procédés reste peu répandue (Payment et Gehr, 2004).

Une étude de Payment et Gehr (2004) a permis de constater que les kystes de *Giardia* sont toujours présents dans l'eau potable et ce, après leur passage dans le système de traitement. De plus, les auteurs suggèrent que leur présence est en assez grande concentration pour pouvoir induire une infection. Par ailleurs, la réglementation québécoise prévoit que les stations de purification d'eau devront pouvoir éliminer 99,9 % des kystes de *Giardia* et 99,0 % des ookystes de *Cryptosporidium*. Avec les installations existantes, il semble que l'eau potable, en ce qui a trait à la région de Montréal du moins, ne satisfasse pas ces exigences (Payment et Gehr, 2004).

2.3.3 Modes de contamination

Plusieurs activités anthropiques peuvent être à l'origine de la contamination microbienne de l'eau. Puisque les animaux d'élevage, notamment les bovins, peuvent être une source importante de parasites, des pratiques d'élevage adéquates deviennent primordiales dans la préservation des cours d'eau et des nappes d'eau souterraine. Plusieurs équipes ont étudié certains paramètres qui pourraient influencer d'une part, la contamination au sein de l'élevage et, d'autre part, la dissémination des micro-organismes pathogènes dans l'environnement. Ainsi, l'étude de Xiao *et al.* (1994) suggère que les élevages qui présentent le moins de contamination à *Cryptosporidium* et à *Giardia* sont ceux où le niveau d'hygiène est élevé, de même que ceux utilisant des planchers sur lattes. Pourtant, l'étude de Ruest *et al.* (1998) rapporte quant à elle que le type de plancher, ainsi que le nombre moyen de veaux, n'étaient pas liés à la présence de diarrhée au sein de l'élevage.

Malgré tout, c'est la pollution diffuse qui fait de l'agriculture une source potentielle de contaminants dans l'environnement (Dorner *et al.*, 2004). Au Québec, la croissance importante du secteur agricole depuis les dernières décennies a résulté en une

augmentation de la densité des élevages dans certaines régions, d'où l'augmentation potentielle de la contamination microbienne de l'eau suite aux épandages des déjections animales dans les champs (Chevalier *et al.*, 2004). En effet, lorsque ces dernières sont appliquées d'une manière inappropriée, les micro-organismes pathogènes présents peuvent diffuser dans le sol et rejoindre la nappe phréatique, ou être entraînés par ruissellement, lors d'épisodes de pluie abondante (Chevalier *et al.*, 2004). Ceci sous-entend toutefois que les micro-organismes pathogènes survivent dans les fumiers jusqu'au moment où ceux-ci sont épandus dans les champs.

Effectivement, les populations de micro-organismes prennent un certain temps avant de diminuer significativement, de l'ordre de quelques semaines. Les fumiers étant un milieu défavorable aux parasites entériques à cause de leurs conditions physico-chimiques, du manque de nutriments et de la compétition avec les autres micro-organismes, un entreposage à long terme permettrait une désinfection efficace avant leur épandage (Chevalier *et al.*, 2004). Lorsque des fumiers contaminés sont appliqués sur les sols, le potentiel de contamination de l'eau de surface et souterraine devient considérable. D'ailleurs, si on considère le fait que les animaux affectés peuvent excréter jusqu'à 26 millions d'ookystes ou 4.2 millions de kystes par gramme de matières fécales (Villeneuve, 2003), il est possible les fumiers soient contaminés dans les structures d'entreposage, augmentant le risque de contaminer l'environnement lors de leur épandage. Les risques de transmission aux animaux et aux humains deviennent alors appréciables, entre autres pour les individus qui consomment de l'eau non traitée.

Finalement, puisque la contamination de l'eau par *Cryptosporidium* et *Giardia* est d'origine fécale, et que les épandages de fumiers dans les champs sont importants dans plusieurs régions, on estime que les élevages sont une source élevée de micro-organismes potentiellement pathogènes dans l'environnement (Chevalier *et al.*, 2004). Pourtant, d'autres sources doivent être prises en considération.

2.4 Sources de contamination

Même si les contacts de personne à personne sont une route de transmission importante des infections entériques, les contacts avec les animaux ne sont pas à négliger (van Keulen *et al.*, 2002). Dans ce cas-ci, les animaux domestiques, d'élevage et de la faune s'avèrent donc être des sources susceptibles de contaminer les humains et l'environnement, notamment l'eau (van Keulen *et al.*, 2002).

2.4.1 Animaux d'élevage

Les élevages, particulièrement les bovins, ont été identifiés comme étant une des sources potentielles de la transmission des infections par *Cryptosporidium* et *Giardia* (Thompson, 2004). Comme elles peuvent causer des pertes économiques pour les producteurs, les infections entériques à *Cryptosporidium* et à *Giardia*, qui peuvent se prolonger, doivent être prévenues et bien contrôlées afin d'éviter leur transmission à d'autres individus (Thompson, 2000). D'ailleurs, le risque pour l'humain est bien réel, puisque la morphologie et l'antigénicité des isolats de *Giardia* retrouvés chez les ruminants sont identiques à ceux ayant été isolés chez des humains (Thompson, 2000). Les animaux d'élevage agissent donc comme source de contamination d'abord pour les gens qui entrent en contact avec eux dans les bâtiments ou sur les pâturages (Ruest *et al.*, 1998). Ensuite, le risque se situe au niveau de la consommation d'eau, car suite aux épandages de matières fécales contaminées dans les champs, les eaux de surface et souterraines peuvent servir de vecteur aux parasites (Chevalier *et al.*, 2004).

2.4.2 Animaux de compagnie

Bien que les animaux de compagnie apportent à leurs propriétaires des plaisirs significatifs, le potentiel de transmission d'agents infectieux de ces animaux vers les humains est souvent négligé (Robertson *et al.*, 2000). La prévalence de *Cryptosporidium* et de *Giardia* chez les animaux domestiques a augmenté depuis les dernières décennies

et les individus immunosupprimés devraient particulièrement être au fait des risques de maladies lorsqu'ils acquièrent des animaux de compagnie (Robertson *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont été menées quant à la présence et aux risques de transmission de *Cryptosporidium* et *Giardia* reliés aux animaux de compagnie, notamment les chats (McGlade *et al.*, 2003b; Scorza *et al.*, 2003; Sargent *et al.*, 1998) et les chiens (Miller *et al.*, 2003; Fayer *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2000; Monis *et al.*, 1998). D'abord, en ce qui a trait à *Giardia*, il faut savoir que, malgré que ce soit un parasite fréquemment isolé chez ces animaux, il est rarement associé à des signes cliniques (Thompson, 2004). En effet, une étude réalisée dans une animalerie d'Atlanta a permis de démontrer que 34 % des chiots étaient infectés à *Giardia*, sans qu'aucun d'entre eux ne présentent des symptômes de l'infection (Robertson *et al.*, 2000). D'ailleurs, cette étude a également permis de rapporter que le risque de contracter la giardiose augmentait quand un grand nombre d'individus ont des contacts physiques directs, idée qui a été réitérée par McGlade *et al.* (2003b).

Quant à *Cryptosporidium*, c'est chez les chiots de moins de 6 mois que ce parasite a été le plus souvent isolé (Morgan *et al.*, 2000). Les ookystes excrétés par les chiens ressemblent énormément aux *C. parvum* qui peuvent infecter les autres mammifères, d'où leur potentiel zoonotique (Morgan *et al.*, 2000). Tout comme dans le cas de *Giardia*, ce sont les animaux qui vivent en groupe qui peuvent être le plus susceptibles d'être parasités (Santé Canada, 2004; McGlade *et al.*, 2003b).

Somme toute, les animaux de compagnie peuvent servir de source de contamination pour les humains à cause des contacts directs que ces derniers ont fréquemment avec leurs animaux (McGlade *et al.*, 2003b; Robertson *et al.*, 2000). Très peu d'études ont porté sur le potentiel des animaux domestiques à contaminer l'environnement. Toutefois, des conditions d'hygiène adéquates permettent de prévenir efficacement la transmission des agents infectieux aux humains (Santé Canada, 2004).

2.4.3 Faune

Le fait que *Cryptosporidium* et *Giardia* soient retrouvés dans l'environnement dépend des sources humaines, agricoles et sauvages (Heitman *et al.*, 2002). Bien que l'importance de chaque source demeure inconnue, la contribution des animaux sauvages est loin d'être négligeable (Heitman *et al.*, 2002). Peu d'études ont toutefois porté sur la prévalence des parasites chez les animaux de la faune, ainsi que du rôle de ceux-ci dans la contamination environnementale.

Ce sont les mammifères aquatiques tels que le castor et le rat musqué qui sont les plus susceptibles de contaminer les plans d'eau, notamment pour *Giardia* (van Keulen *et al.*, 2002). Effectivement, ces deux espèces animales sont reconnues comme réservoir significatif de ce parasite, avec une prévalence d'environ 50 % en Amérique du Nord (Thompson, 2004; Taylor et Webster, 1998). L'étude de Dunlap et Thies (2002) a examiné la prévalence de *Giardia* sp. chez le castor au Texas. Les résultats ont suggéré que 30 % des échantillons analysés étaient porteurs du parasite, avec une nette prédominance de mâles infectés comparés aux femelles.

Par ailleurs, le cerf de Virginie a fait l'objet de plusieurs études, autant pour *Cryptosporidium* que pour *Giardia* (Thompson, 2004; Trout *et al.*, 2003; Deng et Cliver, 1999; Rickard *et al.*, 1999). Les cerf de Virginie, de par leur nombre élevé au Québec, deviennent une source potentielle importante, d'autant plus que les génotypes retrouvés chez ces animaux se sont avérés être zoonotiques (Thompson, 2004; Huot *et al.*, 2002).

Par la suite, les oiseaux migrateurs et aquatiques peuvent également contribuer à la contamination des plans d'eau en agissant comme vecteurs des parasites (Santé Canada, 2004; Villeneuve, 2003).

Toutes les études qui ont porté sur la bernache du Canada ont démontré une prévalence variable chez ces animaux, rapportant aussi que des génotypes zoonotiques, notamment celui du chat, y ont été isolés (Jellison *et al.*, 2004; Kassa *et al.*, 2004; Santé Canada, 2004; Heitman *et al.*, 2002; Graczyk *et al.*, 2000). Une prévalence des parasites chez cette espèce ne peut toutefois pas être établie, puisque la plupart des études ont fait des échantillons composites. L'étude de Jellison *et al.* (2004) rapporte cependant une prévalence de 6.8% de *Cryptosporidium* sur un total de 161 échantillons testés par PCR.

Enfin, d'autres animaux sauvages ont été étudiés afin de déterminer si les parasites qu'ils portaient pouvaient être transmissibles aux humains. C'est le cas, entre autres, des rongeurs, notamment les écureuils, les mulots et les souris (Bajer *et al.*, 2003; Bednarska *et al.*, 2003; Atwill *et al.*, 2001). Chacune de ces études a suggéré que la présence des parasites chez ces animaux pouvait faire en sorte que les plans d'eau deviennent contaminés et donc que la transmission zoonotique était possible. Par ailleurs, les mammifères marins ont récemment fait l'objet de recherches. On rapporte des prévalences appréciables chez plusieurs espèces, notamment les phoques annelés (*Phoca hispida*) et les baleines noires (*Eubalena glacialis*) (Hughes-Hanks *et al.*, 2005; Santín *et al.*, 2005). En effet, des prévalences de 64.5% concernant *Giardia* et d'environ 20% pour *Cryptosporidium* ont été rapportées pour les phoques annelés, alors qu'une prévalence de 71.4% pour *Giardia* a été rapportée pour les baleines noires.

Puisque les animaux de la faune ont accès aux cours d'eau à leur guise, la contamination de l'eau par leurs matières fécales est inévitable, d'où une exposition potentielle pour les individus qui ingèrent cette eau.

2.4.4 Humains

L'étude de Payment et Gehr (2004) fait part du rôle des humains dans la contamination environnementale. Réalisée dans la région de Montréal, où les débits d'eaux usées à traiter sont impressionnants, cette étude fait état des effets possibles sur

les populations qui sont en contact avec les cours d'eau en aval de la ville de Montréal. Au Québec, la désinfection des eaux usées avant leur rejet dans l'environnement n'est pas pratiquée, à cause de la formation de sous-produits dangereux ou encore des coûts associés à une telle pratique.

Cette absence de désinfection peut mener à la présence dans l'eau de micro-organismes potentiellement pathogènes comme *Cryptosporidium* et *Giardia*. En effet, dans les conditions actuelles, Payment et Gehr (2004) rapportent que les risques pour la santé sont élevés lors d'activités extérieures qui impliquent un contact avec l'eau ayant reçu des effluents non-désinfectés de stations d'épuration. La contamination de l'eau par les rejets urbains peut prendre une envergure telle que, par exemple, dans la région de Montréal, il n'est pas possible d'utiliser l'eau du fleuve pour en faire de l'eau potable et ce, même à 10 km du site de rejet de la ville (Payment et Gehr, 2004).

Étant donné que plusieurs sources de contamination microbienne de l'eau sont possibles, il devient impératif de détecter adéquatement les micro-organismes pathogènes pour en faire une identification précise et ce, afin de pouvoir déterminer clairement l'origine de la contamination. Ce n'est qu'en identifiant la source des parasites que des recommandations pourront être émises afin de réduire les risques pour la santé des animaux et des humains.

2.5 Méthodes de détection et d'identification

La compréhension de l'épidémiologie des infections parasitaires dépend grandement de la disponibilité de techniques de diagnostic sensibles et fiables (Morgan, 2000). C'est également par le développement de protocoles spécifiques aux micro-organismes recherchés que le contrôle de ces derniers pourra être possible et efficace (Morgan, 2000). Par ailleurs, de meilleures techniques de détection deviennent nécessaires à cause de la hausse du nombre d'agents infectieux retrouvés dans l'environnement, de même qu'à cause du bioterrorisme, de la disparition progressive des

barrières entre les pays lors d'échanges internationaux et de l'expansion des voyages personnels à l'étranger (Zarlenga et Trout, 2004). De ce fait, des maladies infectieuses auparavant considérées comme exotiques peuvent facilement connaître une expansion d'aire dans leur distribution géographique (Zarlenga et Trout, 2004).

En ce qui concerne *Cryptosporidium* et *Giardia*, il faut prendre en considération les méthodes qui analysent les matières fécales et l'eau. Puisque les parasites peuvent se retrouver en concentrations très faibles et que leur culture *in vitro* est complexe (Slifco *et al.*, 1997), il devient nécessaire de les concentrer avant de procéder à une analyse plus précise (Santé Canada, 2004; Groupe scientifique sur l'eau, 2003a; Groupe scientifique sur l'eau, 2003b; Adam, 2001). D'ailleurs, il semble que la culture *in vitro* ne soit pas efficace lorsqu'on désire augmenter la quantité d'ADN, selon McIntyre *et al.* (2000). Cette même étude rapporte également le coût élevé et le travail délicat et ardu qu'implique une telle méthode. Santé Canada (2004) ne reconnaît officiellement aucune technique fiable pour cultiver les parasites retrouvés dans l'eau. Cette section présente plusieurs méthodes qui permettent finalement la caractérisation génotypique des isolats de *Cryptosporidium* et/ou de *Giardia* retrouvés dans l'eau ou les matières fécales. Les protocoles qui sont couramment utilisés seront décrits au même titre que ceux qui sont en développement et dont l'usage est limité. Finalement, il est bon de noter que la plupart des méthodes permettent de détecter à la fois *Cryptosporidium* et *Giardia*.

2.5.1 Techniques de concentration

Que l'analyse se fasse à partir de matières fécales ou d'eau, la détection de *Cryptosporidium* et de *Giardia* doit débiter par une concentration des parasites. À cause de l'effet de dilution, ce concept est particulièrement important lorsque des échantillons environnementaux sont analysés.

2.5.1.1 Filtration

Bien que la filtration puisse servir à enlever les débris et autres particules grossières des matières fécales, elle est plutôt utilisée pour des échantillons d'eau. Qu'elle se fasse sur membrane ou à l'aide d'une cartouche, elle permet de recueillir les parasites présents dans un grand volume d'eau (Zarlenga et Trout, 2004).

La détection de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans l'eau se fait couramment par le protocole standard élaboré par la United States Environmental Protection Agency (USEPA), soit la méthode 1623 (USEPA, 2005). L'application de cette méthode a permis d'augmenter significativement le taux de récupération des parasites, par l'utilisation d'une cartouche spécifique à *Cryptosporidium* et *Giardia* (Zarlenga et Trout, 2004; Hsu, 2003; McCuin et Clancy, 2003) et ce, tout en augmentant le nombre de micro-organismes qui pouvaient être détectés (Hsu, 2003).

2.5.1.2 Flottation et centrifugation

La flottation fait appel au concept de gradient de densité. Théoriquement, les kystes de *Giardia* et les ookystes de *Cryptosporidium* doivent flotter à la surface du médium dense, pour qu'il soit possible de les récupérer à la pipette ou à l'aide d'une lame de microscope (Santé Canada, 2004). Pour le diagnostic de routine de la cryptosporidiose dans les fèces, les médiums denses utilisés sont des solutions saturées de sucrose (Robertson *et al.*, 2005; Zarlenga et Trout, 2004; Guy *et al.*, 2003; Massanet-Nicolau, 2003; Villeneuve, 2003; Payment *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 1997a) ou de chlorure de sodium (NaCl) (Massanet-Nicolau, 2003; Bukhari et Smith, 1995), ainsi qu'une solution de formol et d'éther (Zarlenga et Trout, 2004; Villeneuve, 2003). Dans le cas de *Giardia*, on utilise une solution de sulfate de zinc (Zarlenga et Trout, 2004; Villeneuve, 2003; Wade *et al.*, 2000; Ruest *et al.*, 1998), malgré que McGlade *et al.* (2003b) aient rapporté des limites considérables à une telle méthode. En effet, le sulfate de zinc provoquerait une dégradation ainsi qu'une altération de la morphologie des kystes. De plus, cette technique ne permet pas la détection de faibles concentrations de

parasites, d'où une sous-estimation possible de la présence des parasites dans les échantillons. D'ailleurs, il faut savoir que la sensibilité de la flottation demeure faible et dépend en partie de l'habileté et de l'expérience du technicien (Verweij *et al.*, 2004; Villeneuve, 2003; Morgan, 2000), surtout en ce qui a trait au diagnostic basé sur la microscopie. De plus, les méthodes courantes de concentration sont considérées comme laborieuses, coûteuses et plutôt longues (Deng *et al.*, 1997).

Finalement, en plus d'être utilisée au cours de la flottation, la centrifugation s'avère indispensable pour purifier grossièrement l'échantillon (Zarlenga et Trout, 2004). La centrifugation est également une étape importante de la méthode 1623 pour la détection des parasites dans l'eau (USEPA, 2005).

2.5.1.3 Immunocapture

Après que les échantillons aient été partiellement concentrés et purifiés par filtration et centrifugation, ils peuvent être soumis à une procédure d'immunocapture. Cette technique implique la présence de billes de métal miniatures dont les parois ont été couvertes d'anticorps spécifiques à *Giardia* et à *Cryptosporidium*. De cette façon, les kystes et les ookystes réagissent en se couplant avec les billes (Zarlenga et Trout, 2004) et peuvent alors être récupérés par magnétisme. Il est rapporté que cette technique est significativement plus sensible que la flottation, puisqu'elle peut détecter dix (oo)kystes par gramme de fèces (Power *et al.*, 2003). Lorsque l'échantillon ne présente pas trop de matière en suspension, l'immunocapture permet de récupérer jusqu'à 90 % des (oo)kystes présents (Bukhari *et al.*, 1998), comparé à 5 à 20 % pour les méthodes de flottation (Deng *et al.*, 1997).

Les avantages de l'immunocapture sont sa simplicité d'utilisation, ainsi que le fait qu'elle peut concentrer les parasites tout en les séparant des inhibiteurs qui peuvent être présents (Kaucner et Stinear, 1998). L'étude de Mahbubani *et al.* (1998) rapporte que l'usage de l'immunocapture a été le seul moyen efficace de récupérer les kystes de

Giardia retrouvés dans des échantillons d'eau plutôt turbides, afin de procéder à une amplification efficace de leur ADN.

Par contre, la quantité de matière en suspension (Ferrari et Veal, 2003; Bukhari *et al.*, 1998), l'âge des (oo)kystes (McCuin *et al.*, 2001), de même que la quantité de fer présent dans les échantillons d'eau (Yakub et Stadermann-Knauer, 2000), sont des paramètres qui affectent la limite de la méthode.

La plupart des études portant sur la détection de *Cryptosporidium* et de *Giardia* procèdent à une étape d'immunocapture avant de poursuivre avec des techniques de biologie moléculaire (Trout *et al.*, 2003; Halier-Soulier et Guillot, 2000; Lowery *et al.*, 2000; Kostrzynska *et al.*, 1999). D'ailleurs la méthode 1623 de la USEPA, spécifique à la détection de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans l'eau, inclut une étape d'immunocapture (USEPA, 2005).

2.5.2 Méthodes de détection

Bien que l'on puisse détecter la présence de *Cryptosporidium* et de *Giardia* séparément ou simultanément, les méthodes existantes pour la surveillance régulière ne sont que semi-quantitatives et ne fournissent aucune information en ce qui a trait à la viabilité ou à l'infectivité pour les humains (Santé Canada, 2004). Par contre, d'autres méthodes permettent de vérifier ces deux paramètres. L'infection de gerbilles semble être le modèle le plus utilisé quant à l'infectivité des parasites (Baishanbo *et al.*, 2005; Majewska, 2004; Wallis *et al.*, 1996), tandis que l'équipe de Mahbubani *et al.* (1991) a développé une méthode qui distingue les kystes vivants de *Giardia*, notamment en mesurant les quantités d'ARN.

2.5.2.1 Microscopie directe

À l'origine, le diagnostic en laboratoire de *Cryptosporidium* et de *Giardia* était fait par l'examen microscopique des matières fécales (Verweij *et al.*, 2004). Suite à différentes colorations, on procède à l'examen des échantillons, en analysant la morphologie des micro-organismes colorés. Selon la dimension, la forme générale, la couleur et les structures internes visibles, le diagnostic peut être porté (Barwick *et al.*, 2003). Cette méthode n'est pourtant pas très sensible et spécifique, notamment à cause du direct avec l'expérience de la personne au microscope (Verweij *et al.*, 2004). La faible concentration de parasites présents dans les matières fécales constitue une autre limite importante de cette méthode (Xiao et Herd, 1993). En ce qui concerne la détection des parasites dans l'eau, la méthode standard de la USEPA inclut une étape de coloration à fluorescence avant de procéder à la microscopie. Cette méthode est spécifiquement décrite ci-après.

2.5.2.2 Immunofluorescence

L'utilisation d'anticorps spécifiques à *Cryptosporidium* et *Giardia* a fortement amélioré la capacité à détecter ces micro-organismes (Santé Canada, 2004). La coloration par immunofluorescence permet donc une spécificité accrue comparativement à la flottation et à la microscopie directe, sans toutefois permettre l'identification à l'espèce. Plusieurs fabricants ont commercialisé des anticorps monoclonaux qui permettent la détection de *Cryptosporidium* et de *Giardia* (Santé Canada, 2004), la plupart utilisant désormais le fluorochrome *fluorescein isothiocyanate* (FITC) conjugué aux anticorps pour l'identification des parasites (Zarlenga et Trout, 2004). L'étude de Garcia et Shimizu (1997) a permis de constater que neuf des trousse les plus utilisées sur le marché ont des sensibilités semblables. En effet, toutes les trousse permettent une bonne détection des parasites, avec une sensibilité qui varie de 94 à 99 %. Toutes les trousse étudiées se sont révélées à 100 % spécifiques pour la détection des deux parasites. Par ailleurs, l'utilisation conjointe du colorant vital 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) avec les trousse commerciales met en évidence les noyaux, ce qui

facilite l'identification et renseigne sur la viabilité des parasites (Santé Canada, 2004; Zarlenga et Trout, 2004; Robertson *et al.*, 1992).

Malheureusement, la taille et les caractéristiques de certaines algues sont très semblables à celles des parasites, notamment à celles de *Cryptosporidium*, et peuvent conduire à des résultats erronés (Santé Canada, 2004; Mayer et Palmer, 1996; Wallis *et al.*, 1996). En effet, ces algues peuvent être colorées par le colorant FITC sans que la réaction immunologique se produise, d'où les faux résultats positifs. Puisque l'interférence avec des débris organiques a été signalée et que les réactions croisées avec d'autres micro-organismes ont été rapportées comme possibles, il est reconnu que les méthodes de microscopie utilisant les anticorps et la fluorescence sont peu spécifiques et présentent une assez faible sensibilité (Verweij *et al.*, 2004; Rochelle *et al.*, 1997). La limite de détection pour *Giardia* est de 500 kystes par gramme de fèces et de 200 ookystes par gramme de fèces pour *Cryptosporidium* (Deng et Cliver, 1999). Puisque la microscopie est encore utilisée, le problème relatif au manque d'expérience du technicien se pose toujours (Verweij *et al.*, 2004).

L'immunofluorescence nécessite un équipement spécialisé et un niveau élevé de connaissances techniques (Santé Canada, 2004). L'analyse est fastidieuse, coûteuse et révèle fréquemment la présence de (oo)kystes fantômes, particulièrement dans les eaux usées (Santé Canada, 2004).

Pour la détection des parasites dans l'eau, l'immunofluorescence au FITC de même que l'ajout du DAPI font partie intégrante de la méthode 1623 (USEPA, 2005; Zarlenga et Trout, 2004). L'usage du DAPI s'avère particulièrement crucial, puisque selon LeChevallier *et al.* (1991), la plupart des (oo)kystes présents dans l'eau sont non viables : sur 46 kystes de *Giardia* isolés, 40 se sont trouvés être non viables, c'est-à-dire dont le cytoplasme est déformé ou rétréci. En moyenne, 21 % des kystes de *Giardia* et 5,3 % des ookystes de *Cryptosporidium* peuvent être récupérées en effectuant la méthode d'immunofluorescence (Santé Canada, 2004).

Étant donné le développement continu des méthodes, de nouveaux types de techniques utilisant l'immunofluorescence pourront voir le jour. Par exemple, l'emploi de nanocristaux où des anticorps contre *Cryptosporidium* et *Giardia* ont été liés par conjugaison semble prometteur. L'étude de Zhu *et al.* (2004) a d'ailleurs permis de constater que cette méthode était plus photostable et plus sensible que l'immunofluorescence régulière.

2.5.2.3 ELISA (enzyme-linked immunoassay)

Ayant déjà été utilisée comme méthode standard de détection pour *Cryptosporidium* et *Giardia*, l'ELISA est toujours considérée comme outil valable, quoique beaucoup moins utilisée qu'autrefois (Zarlenga et Trout, 2004). Cette méthode fait appel à la détection des antigènes présents dans les matières fécales (Xiao et Herd, 1993). À partir d'échantillons de fèces, un anticorps monoclonal se lie aux antigènes spécifiques à *Cryptosporidium* et à *Giardia* (USEPA, 2005). Une trousse commerciale de diagnostic ProSpecT® *Cryptosporidium/Giardia* Microplate Assay (Alexon-Trend, Ramsey (MN), USA) s'avère efficace dans la détection des parasites.

D'ailleurs, il est possible de conserver les échantillons congelés de matières fécales durant un an avant de procéder au test, puisque la congélation n'altère pas l'antigène à détecter (Rosoff *et al.*, 1989). Selon Rosoff *et al.* (1989), la sensibilité et la spécificité de ce test sont de 96 % et de 100 % respectivement, comparativement à l'utilisation de la microscopie directe traditionnelle. Par contre, cette idée est contredite par Moss *et al.* (1990), puisque l'utilisation d'anticorps monoclonaux peut mener à de nombreux faux résultats négatifs, surtout lorsque les antigènes qui sont en présence ne sont pas adéquats.

2.5.2.4 PCR

Les techniques moléculaires sont en développement continu et de nouvelles découvertes sont réalisées au fur et à mesure que notre compréhension de l'ADN

parasitaire s'accroît. La biologie moléculaire permet d'identifier les parasites sans que leur stade de développement ne soit une variable limitante (Zarlenga et Trout, 2004). Par contre, cette réaction ne permet pas la différenciation entre les (oo)kystes morts et vivants. L'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est largement répandue, puisque sa sensibilité et sa spécificité sont beaucoup plus élevées que les méthodes habituelles qui ne recourent pas à la biologie moléculaire (Verweij *et al.*, 2004; Rochelle *et al.*, 1997).

La PCR comporte plusieurs avantages. Entre autres, notons particulièrement la rapidité avec laquelle plusieurs échantillons peuvent être traités simultanément, les coûts relativement faibles, la détection possible de plusieurs micro-organismes pathogènes en même temps, de même que la capacité de discriminer les espèces des isolats à l'étude lorsque les amorces adéquates sont utilisées (Rochelle *et al.*, 1997).

Les facteurs principaux qui font en sorte que la PCR peut être moins efficace sont les manipulations expérimentales excessives, le besoin de posséder des contrôles adéquats, ainsi que les nombreux inhibiteurs qui se retrouvent dans les échantillons (Zarlenga et Trout, 2004). Dans les matières fécales, la présence de bilirubine, de l'urobilinogène et de sels biliaires peut s'avérer problématique (Ghosh *et al.*, 2000).

Les matières fécales peuvent également être composées de mucus, lipides, bactéries et fungi, insectes, pollen et aliments partiellement digérés qui, lorsque la purification de l'échantillon est inadéquate, affectent fortement la réaction PCR. Dans les échantillons environnementaux, notamment l'eau, les phénols sont des inhibiteurs importants du PCR (Guy *et al.*, 2003). Ces substances proviennent de la biodégradation des substances humiques, de la lignine et des tannins de source naturelle (Guy *et al.*, 2003). Les phénols peuvent également provenir de sources anthropiques, puisque ce sont des molécules dérivées du plastique et de la dégradation des pesticides (Guy *et al.*, 2003). L'eau contient des acides humiques et fulviques (Rimhanen-Finne *et al.*, 2002; Mayer et Palmer, 1996), du limon, des composés organiques, des micro-organismes indésirables qui peuvent être néfastes à la PCR, en plus de pouvoir boucher les filtres,

emprisonner les parasites lors de la flottation et empêcher la formation du gradient (Zarlenga et Trout, 2004). Pourtant, les auteurs de cette dernière étude rapportent que des particules de matière organique variant de 5 à 40 μm dans l'eau peuvent permettre une meilleure détection de *Cryptosporidium parvum*, car elles servent de vecteur.

La technique PCR est 1 000 à 10 000 fois plus sensible que l'immunofluorescence (Rimhanen-Finne *et al.*, 2002) : il est possible de détecter jusqu'à un (oo)kyste dans les préparations purifiées (Rochelle *et al.*, 1997). Dans les échantillons environnementaux, une limite de détection de 5 à 50 (oo)kystes a pu être constatée comme limite de détection (Rimhanen-Finne *et al.*, 2002; Rochelle *et al.*, 1997).

La Nested PCR, une technique qui requiert deux amplifications avec des paires d'amorces différentes, peut s'avérer utile pour diminuer significativement l'effet des inhibiteurs (Mayer et Palmer, 1996) Il est également reconnu qu'une telle méthode peut être adéquate lorsque les échantillons présentent une faible concentration en parasites (Ghosh *et al.*, 2000). La Nested PCR pourrait être de deux à trois fois plus sensible que la simple PCR (Kostrzynska *et al.*, 1999).

Dans la plupart des études qui ont été réalisées et qui visaient la caractérisation de *Cryptosporidium* et de *Giardia*, une étape de PCR était incluse. Que ce soit une épreuve PCR simple (Scorza *et al.*, 2003; Rimhanen-Finne *et al.*, 2001; Mahbubani *et al.*, 1998), une Nested PCR (Pedraza-Diaz *et al.*, 2001; Homan *et al.*, 1999; Mayer et Palmer, 1996), une PCR en temps réel (Verweij *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 2003; Verweij *et al.*, 2003) ou une *reverse-transcriptase PCR* (Hallier-Soulier et Guillot, 2003), l'utilisation de techniques moléculaires a dans presque tous les cas surpassé les méthodes faisant uniquement appel aux anticorps. En effet, lorsque l'étude comparait les deux types d'analyses, la corrélation entre les résultats de l'immunofluorescence et ceux de la PCR était plutôt faible. Par contre, les résultats de l'immunofluorescence de l'étude de Trout *et al.* (2003) coïncident parfaitement avec la PCR.

2.5.3 Méthodes d'identification à l'espèce

Étant donné qu'il existe une quantité considérable d'espèces de *Cryptosporidium* et de *Giardia*, et que la plupart d'entre elles sont potentiellement zoonotiques, il est intéressant d'identifier quelles espèces sont présentes dans l'environnement. De plus, un tel outil peut renseigner sur les sources de contamination de l'eau, ou encore la source d'une infection.

2.5.3.1 RFLP

Faisant appel à l'emploi d'enzymes de restriction, généralement des endonucléases, le RFLP a été parmi les premières méthodes moléculaires utilisées pour l'identification des parasites (Zarlenga et Trout, 2004). Mis en contact avec des fragments d'ADN purifiés du parasite, l'enzyme coupe la séquence nucléotidique en plus petits fragments qui, en formant un patron précis, sont spécifiques à une espèce définie.

Dans la littérature, les espèces de *Cryptosporidium* peuvent être discriminées par différentes enzymes de restriction, selon le gène qui a été préalablement amplifié par PCR. Les enzymes *Dra* I et II, *Ssp* I, *Vsp* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Sca* I, *Mwo* I, *Mlu* I, *Bpm* I et *Rsa* I sont celles qui sont le plus souvent utilisées (Jiang et Xiao, 2003; Guyot *et al.*, 2002; Gobet et Toze, 2001; Sturbaum *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001). Par ailleurs, il est reconnu que la combinaison du RFLP avec la PCR peut détecter une faible quantité d'ookystes et ce, lorsqu'une étape d'immunocapture est effectuée au préalable (Sturbaum *et al.*, 2001).

En ce qui concerne *Giardia*, ce sont *Rsa* I, *Hha* I et *Hae* III qui sont les endonucléases les plus utilisées (Amar *et al.*, 2002; Cacciò *et al.*, 2002). Par contre, ces enzymes ne permettent pas une discrimination à l'espèce, mais plutôt à l'assemblage (Cacciò *et al.*, 2002). Ainsi, *Hha* I discrimine entre les assemblages A1, A2 et A3, tandis que *Hae* III détecte les différences entre les assemblages A, B et E (Cacciò *et al.*, 2002).

De cette façon, il est peu probable que la discrimination entre les isolats humains et ceux des différentes espèces animales puisse être établie, étant donné que chaque assemblage peut contenir des isolats provenant des humains et des animaux (Rocha *et al.*, 2003). McIntyre *et al.* (2000) suggère d'ailleurs la nécessité de développer de nouvelles méthodes moléculaires pour détecter et caractériser *Giardia* chez l'hôte animal original, de même que dans les échantillons environnementaux. Jusqu'à présent, c'est par le séquençage que les espèces de *Giardia* peuvent être le mieux différenciées.

2.5.3.2 Séquençage

Bien que le séquençage soit utilisé pour discriminer les isolats d'origine humaine de ceux provenant d'animaux (Morgan *et al.*, 1997; Spano *et al.*, 1997), il est également possible d'analyser les parasites selon leurs différences intra-espèces et inter-espèces. En effet, l'identification de plusieurs génotypes à l'intérieur d'un même assemblage est possible grâce au séquençage.

2.5.4 Caractérisation génétique

Pour la détection des parasites, les méthodes de détection basées sur la PCR se sont avérées être les plus sensibles et spécifiques, que les échantillons soient d'origine clinique ou environnementale (Sulaiman *et al.*, 1999). De plus, les amorces permettant d'amplifier le segment désiré peuvent être basées sur des séquences génomiques indéfinies ou sur des gènes spécifiques (Sulaiman *et al.*, 1999). La plupart du temps, c'est cette dernière option qui est retenue. Plusieurs gènes de *Cryptosporidium* ont été séquencés et sont devenus des outils importants de la caractérisation du parasite. Par contre, peu de gènes de *Giardia* ont été caractérisés.

2.5.4.1 *Giardia*

Possédant environ 12 millions de paires de bases réparties sur cinq chromosomes, le génome de *Giardia* est relativement petit (McArthur *et al.*, 2000). Des

études ont porté sur le génome complet, afin que puissent être ciblés les zones les plus discriminantes (Adam, 2000; McArthur *et al.*, 2000).

Étant donné qu'il est considéré comme unique à ce parasite (Cacciò *et al.*, 2002), le gène β -*giardin*, possédant 839 pb (Baker *et al.*, 1988), est communément ciblé dans les différentes études citées dans la littérature. Ce gène code pour une protéine structurale qui compose le disque adhésif du parasite (Guy *et al.*, 2003). Cette composante est indispensable à l'adhésion du trophozoïte à l'épithélium intestinal de l'hôte. Chez *Giardia lamblia*, ce gène présente de 3 à 5 % de variabilité (Guy *et al.*, 2003), mais est tout de même considéré comme ayant un pouvoir discriminant élevé (Cacciò *et al.*, 2002). De cette façon, le gène β -*giardin* a fait l'objet de plusieurs études, que ce soit par PCR, PCR-RFLP ou séquençage (Lalle *et al.*, 2005; Cacciò *et al.*, 2002; Heyworth *et al.*, 1999; Mahbubani *et al.*, 1992).

D'autres gènes comme le *triosephosphate isomerase* (TPI), peuvent être choisis pour caractériser *Giardia* (Sulaiman *et al.*, 2003). Ce gène présente une hétérogénéité élevée entre les espèces de *Giardia*, d'où son utilisation pour discriminer entre les isolats (Sulaiman *et al.*, 2003). Sulaiman *et al.* (2003) ont réussi à amplifier et différencier des isolats de chiens, de rats musqués, de bovins, de castors, de lapins, de rats et d'humains. Que ce soit entre les espèces ou à l'intérieur d'une même espèce, le polymorphisme génétique de TPI a pu être reconnu par séquençage. Riche en guanines et en cytosines (GC) (50 à 58 %), la caractérisation du gène TPI peut être associée à des difficultés techniques, particulièrement lors du séquençage.

Les gènes 18S rRNA ou 18S rDNA, qui codent respectivement pour la petite sous-unité de l'ARN ou l'ADN ribosomal, sont également utilisés à la caractérisation de *Giardia* (McGlade *et al.*, 2003b; Sulaiman *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 1992). Dû au grand nombre de copies présentes chez tous les micro-organismes, il semble que les gènes de l'ARN ribosomal soient une très bonne cible pour une amplification par PCR (Ghosh *et al.*, 2000). Par contre, puisque leur contenu en GC est encore plus élevé que le gène TPI, soit de l'ordre de 72 %, les gènes de la petite sous-

unité ribosomale sont associés à des problèmes techniques lors de leur amplification (Cacciò *et al.*, 2002).

Le gène qui code pour la glutamate déshydrogénase, le *gdh*, possède 1350 nucléotides codant pour une protéine de 449 acides aminés (Yee et Dennis, 1992). Bien que le rôle de la glutamate déshydrogénase est de produire le glutamate, *Giardia* l'utilise plutôt pour maintenir la balance d'oxydo-réduction du pool intracellulaire de NAD(P) (Yee et Dennis, 1992). L'analyse du gène *gdh* a entre autres été utilisée pour la détection de *Giardia* dans l'eau (Rimhanen-Finne *et al.*, 2002). Malgré le fait que cette équipe ait réussi à caractériser le parasite, l'étude rapporte que les échantillons d'eau présentant une turbidité importante requéraient une purification supplémentaire de l'ADN parasitaire.

Finalement, le gène *hsp* (heat shock protein) peut être utilisé dans le cadre d'une réaction PCR multiplex. En effet, il est possible de détecter simultanément la présence de *hsp* chez *Giardia* et de 18S rRNA chez *Cryptosporidium* dans la même réaction. L'étude de Rochelle *et al.* (1997) sur des échantillons d'eau a d'ailleurs permis une telle détection, en soulignant toutefois que le développement de la méthode devait être poursuivi afin de la rendre plus efficace. De son côté, l'équipe de Rimhanen-Finne *et al.* (2001) a également élaboré un PCR multiplex qui permet de détecter simultanément les deux parasites. En ciblant le gène *gdh* de *Giardia* et le gène COWP de *Cryptosporidium*, les auteurs de l'étude rapportent toutefois une limite de détection de 625 micro-organismes par millilitre. Cette méthode s'avère donc moins efficace pour des échantillons qui présenteraient des concentrations faibles en micro-organismes pathogènes.

2.5.4.2 *Cryptosporidium*

Possédant environ neuf millions de paires de bases réparties sur huit chromosomes (Puiu *et al.*, 2004), le génome de *Cryptosporidium*, quelles que soient les espèces en présence, a fait l'objet de plusieurs études. En effet, quelques chercheurs ont

travaillé sur les différentes espèces du parasite pour que diverses techniques de génotypage puissent être établies. Ce sont ces techniques qui permettent entre autres de différencier les espèces de *Cryptosporidium* entre elles. Jusqu'à présent, les génomes de *C. hominis* (Xu *et al.*, 2004) et de *C. parvum* provenant de diverses origines ont pu être décrits (Abrahamsen *et al.*, 2004). Bien que le génome de *Cryptosporidium* possède un peu plus de 3 800 gènes (Abrahamsen *et al.*, 2004), seuls un petit nombre permet de discriminer efficacement entre les nombreuses espèces du parasite. Selon les gènes ciblés, plusieurs amorces ont été élaborées afin d'amplifier par PCR un fragment qui ait le pouvoir discriminant le plus élevé lors de sa caractérisation.

Trois publications ont rapporté l'énumération et l'évaluation de diverses méthodes moléculaires utilisées dans la caractérisation de *Cryptosporidium*. La première met surtout en relief les gènes qui peuvent être ciblés lors du génotypage et ce, selon les espèces animales (Fayer *et al.*, 2000).

Les deux autres études font plutôt l'évaluation de certaines méthodes de façon à déterminer si elles s'avèrent efficaces pour la caractérisation spécifique de *Cryptosporidium* (Jiang et Xiao, 2003; Sulaiman *et al.*, 1999). Par le fait même, ces études permettent de vérifier la spécificité des amorces. Les résultats suggèrent que certains fragments de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (SSUrRNA) ne sont pas spécifiques à *Cryptosporidium* (Sulaiman *et al.*, 1999). En effet, des fragments de gènes provenant de deux espèces d'*Eimeria* (*E. neischulzi* et *E. papillata*) peuvent être également amplifiés et ce, avec des longueurs équivalentes aux fragments amplifiés chez *Cryptosporidium*. Même si toutes les autres amorces évaluées étaient spécifiques à *Cryptosporidium* (Sulaiman *et al.*, 1999), toutes ne pouvaient cependant identifier d'autres espèces que *C. parvum* (Jiang et Xiao, 2003).

Quoi qu'il en soit, des fragments des gènes COWP, SSUrRNA, DHFR, poly-T, TRAP-C1, TRAP-C2, ITS1, ainsi que certaines régions génomiques inconnues peuvent être ciblés pour caractériser *Cryptosporidium* (Jiang et Xiao, 2003; Sulaiman *et al.*, 1999). Toutefois, selon ces mêmes auteurs, seuls des fragments précis du gène COWP et

de SSUrRNA permettent de discriminer entre *C. parvum* d'origine bovine et humaine, *C. muris* et *C. serpentis*. Les autres gènes permettent quant à eux la différenciation entre les *C. parvum* animaux et humains.

D'ailleurs, ces résultats sont en partie corroborés par les études de Elwin *et al.* (2001), de Spano *et al.* (1998) et de Sulaiman *et al.* (1998), qui stipulent que l'analyse des gènes TRAP-C1 et TRAP-C2 ne permettent de discriminer qu'entre les *C. parvum* d'origine bovine et humaine. En ce qui a trait à l'analyse des gènes ITS1 et du poly-T, l'étude de Spano *et al.* (1998) en arrive également aux mêmes conclusions. En effet, la caractérisation de *Cryptosporidium* ne peut pas être complète lorsque ces sites sont ciblés, puisque seuls deux génotypes ont pu être dénotés (Spano *et al.*, 1998).

Il semble toutefois que les résultats varient selon les auteurs, car l'analyse des séquences des ITS1 et 2 a permis d'établir qu'il existait une grande variabilité entre les séquences d'isolats provenant d'espèces animales différentes tout en conservant une faible variation entre les séquences isolées des parasites retrouvées chez une même espèce animale (Morgan *et al.*, 1999).

D'autres gènes peuvent également être ciblés afin de différencier les divers génotypes. D'abord, malgré que certaines études n'aient pas permis de noter que d'autres espèces que *C. parvum* pouvaient être identifiées (Hallier-Soulier et Guillot, 2003; Jiang et Xiao, 2003; Gobet et Toze, 2001), l'analyse du gène HSP70, qui code pour une protéine de choc thermique de 70kDa, est rapportée fréquemment dans la littérature. C'est par l'analyse de ce gène qu'on a pu rapporter que *C. canis*, retrouvé chez le chien, devait être pris comme étant une espèce de *Cryptosporidium* à part entière (Fayer *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2000). L'étude de Morgan *et al.* (2000) a également suggéré que le génotype de *C. canis* semblait demeurer constant malgré que les isolats analysés soient de sources géographiques différentes.

Ensuite, le gène COWP permet également une bonne différenciation entre les génotypes. Ce gène de 6030 pb (Ranucci *et al.*, 1993) code pour une protéine importante

dans le maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire de l'ookyste (Guy *et al.*, 2003). C'est cette membrane qui permet au parasite de survivre dans les environnements difficiles et ce, jusqu'à son ingestion par un hôte (Guy *et al.*, 2003). De plus, cette membrane jouerait un rôle dans l'infectiosité du parasite (Ranucci *et al.*, 1993). Que ce soit pour différencier entre les trois génotypes humains (Pedraza-Diaz *et al.*, 2001), ou encore pour distinguer la plupart des espèces de *Cryptosporidium* d'origine animale et humaine entre elles (Xiao *et al.*, 2000b), l'analyse du gène COWP, associé au RFLP, permet un bon pouvoir discriminant. Dans la plupart des cas, *C. parvum* a pu être distingué de *C. muris* et de *C. wrairi* (Xiao *et al.*, 2000b; Spano *et al.*, 1997).

Certaines régions du génome de *Cryptosporidium* dont la fonction est inconnue peuvent également être étudiées. C'est le cas entre autres des amorces développées par Laxer *et al.* (1991), qui ont fréquemment été utilisées afin de distinguer certains génotypes (Guyot *et al.*, 2002; Hallier-Soulier et Guillot, 2000). En effet, le parasite *C. meleagridis* a pu être différencié de *C. parvum* (Guyot *et al.*, 2002), et les *C. parvum* retrouvés chez des chevreuils ont été efficacement détectés à l'aide de ces amorces (Deng et Cliver, 1999).

Finalement, la petite sous-unité de l'ARN ribosomal, décrite par SSUrRNA, reste sans doute le gène le plus souvent examiné dans la littérature. C'est par l'analyse de ce locus que le *Cryptosporidium* génotype II du porc (Ryan *et al.*, 2003), *C. felis* et *Cryptosporidium* génotype I du porc (Jiang et Xiao, 2003), de même que *C. baileyi* (Xiao *et al.*, 1999) et *C. serpentis* (Kimbell III *et al.*, 1999), ont pu être discriminés et ce, en plus des *C. parvum*, *C. wrairi*, *C. muris* et *C. meleagridis* généralement distingués par les autres méthodes. De plus, l'étude de Jellison *et al.* (2004) sur la bernache du Canada a rapporté que cinq génotypes différents pouvaient être perçus suite à l'examen du gène SSUrRNA chez cette espèce. Ces génotypes semblent être distincts de tous les autres qui avaient été publiés préalablement.

Par ailleurs, plusieurs publications portant sur la caractérisation de *Cryptosporidium* dans l'eau ont pris en considération que l'analyse de ce gène était la plus discriminante et permettait de distinguer un plus grand nombre de génotypes (Xiao *et al.*, 2000a; Xiao *et al.*, 2000b).

Enfin, après avoir détecté les *C. parvum* de génotype bovin par l'emploi du SSUrRNA, il est possible d'identifier plusieurs sous-génotypes par l'analyse du gène GP60 qui code pour une glycoprotéine de 60kDa (Peng *et al.*, 2003). Les travaux de cette équipe ont suggéré six sous-génotypes distincts sur 34 échantillons qui avaient été caractérisés par le SSUrRNA. De plus, les fermes à l'étude pouvaient présenter plus d'un sous-génotype. Malgré tout, les auteurs proposent cette méthode afin que la transmission de la cryptosporidiose soit comprise, car l'étude a également permis de démontrer que le génotype bovin de *C. parvum* était transmissible à l'humain.

Chapitre 3.

**Detection and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp.
Isolates from Various Animals in Two Watersheds**

ARTICLE EN PRÉPARATION

ABSTRACT

Cryptosporidium and *Giardia* are both significant causes of waterborne gastroenteritis outbreaks. Because farm animals are major carriers of these parasites, environmental contamination is possible when infected animal wastes are not managed appropriately. In order to determine the source of environmental contamination, molecular techniques are nowadays essential to characterize *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. In this study, parasites isolates were obtained from various animal species and also from surface and drinking water in two watersheds in southern Québec (Canada). Isolates were submitted to IFA and PCR. After PCR amplification using COWP and SSUrRNA genes of *Cryptosporidium* and β -giardin gene of *Giardia*, molecular characterization was performed by RFLP and DNA sequencing. Parasites genotypes recovered in water samples were compared to those recovered in animals to establish which animal species could have been responsible for the environmental contamination. Both parasites were detected by IFA and PCR in many animal species, including farm, companion and wildlife animals. From April 5th through September 1st 2005, both parasites were detected by IFA and PCR intermittently in surface and drinking waters. DNA analyses revealed only one sequence for *Cryptosporidium* and sixteen different sequences for *Giardia*. Using RFLP, it was not possible to discriminate between parasites encountered in the different animal species; however, two different profiles were observed. This study demonstrates the presence of one genotype of *Cryptosporidium* and many genotypes of *Giardia* in the watersheds' surface and drinking waters, and in different inhabiting animal species.

INTRODUCTION

The protozoa of the *Cryptosporidium* and *Giardia* genera are worldwide major cause of severe gastroenteritis. Both parasites infect humans as well as farm, companion and wildlife animals (Fayer, 2004; Adam, 2001). They constitute public concern mainly because of their long-term survival in water, resistance to chlorination, and low infectious dose (Chevalier *et al.*, 2004; Fayer, 2004). These microorganisms cause economic losses to livestock producers, particularly *Cryptosporidium*, since it is sometimes fatal to calves (Chevalier *et al.*, 2004). Transmission of the parasites occurs via the fecal-oral route, or during the ingestion of contaminated water or food (Guy *et al.*, 2003; Fayer *et al.*, 2000). Farm animals, especially cattle, are major source of these parasites; there is thus a potential environmental contamination during land fertilization by animal dejections and manures (Massanet-Nicolau, 2003). More precisely, the fecal contamination of surface and ground water may constitute a risk of zoonotic transmission of cryptosporidiosis and giardiasis. Consequently, the watersheds of agricultural communities are at high risk of contamination by *Cryptosporidium* and *Giardia*, particularly where soil conservation measures are lacking (Chevalier *et al.*, 2004).

In an attempt to determine the source of contamination in watershed, genetic characterization of parasite isolates by molecular techniques could be used to establish which parasite species are found in the water and in its possible contaminating hosts. The aim of this study was to compare the parasites genotypes encountered in two regions of the Rivière-aux-Brochets watershed, located in Québec, to those observed in different inhabiting animal species. To our knowledge, this is the first time that *Cryptosporidium* and *Giardia* were studied in water and were genetically characterized in the province of Québec.

MATERIALS AND METHODS

Sources of isolates

Fecal material

A survey of *Cryptosporidium* and *Giardia* was conducted in two small watersheds included in the Rivière-aux-Brochets watershed in Québec, from June 2004 to September 2005. Fresh fecal samples were collected in 23 farms whose owners agreed to be involved in the study, out of 27 located in both watersheds, including avian (1), pig (2), avian and pig (1), dairy cattle and pig (1) and dairy cattle (18) productions. In each dairy farm, feces from young (< 1 year old, n=32) and adult (\geq 1 year old, n=36) animals were sampled and separated in 2 distinct pools. These pools consisted of 10 samples each, and were analysed separately. Three and five pools, containing 5 samples, were respectively collected in every pig and avian productions, with the exception of 1 pig production where only 1 pool was collected. All samples consisted of approximately 5 g of fresh feces that were collected on the floor. When possible, fecal samples from cats and dogs were also collected on the ground.

Manures from 21 farms, out of the 23, were also sampled during the week before they were spread to land. In every manure storage tank, 5 to 10 samples were collected at various depths and pooled; after homogenisation 1 liter was kept for analysis. A total of 28 pooled samples were analysed. Moreover, fecal material was also collected in the watershed from wildlife animals, including beaver, muskrat, Canada goose, racoon and white-tailed deer. Beaver, muskrat and racoon feces were provided by a local hunter; those from goose and deer were collected from freshly voided feces on the ground. All the samples from wildlife were added to a phosphate buffered saline (PBS) solution and kept between 2-8°C to preserve the isolates before analyses.

Water sampling

Two influents of the Rivière-aux-Brochets watershed were studied; the Ruisseau aux Castors, draining 10 km², and the Ruisseau Wallbridge, draining approximately 14 km². The area drained by both influents is mainly agricultural land,

respectively about 97 % and 75 %. The surface water was collected from April to September 2005 in 5 sites distributed among the watersheds of both influents. Two sites were sampled in the Ruisseau aux Castors region, including one that was sampled on rainfall events only. The three other sites were sampled in the Ruisseau Wallbridge region. Every 2 weeks and after rainfall events, 10L of water was filtered on-site using the Envirocheck™ capsule, according to the USEPA method 1623 (USEPA, 2005), for a total of 38 samples. During summer 2005, drinking water was also collected three times from 11 private wells distributed among both watersheds, on May 2nd, June 1st and July 25th. The characteristics of the wells were noted (deep or surface, non-treated or chlorinated). Drinking water samples were collected at the faucets. All water samples were kept between 2-8 °C before analyses.

Detection

Immunomagnetic separation (IMS)

The preparation of specimens for microscopic examination and PCR was done by an IMS concentration and purification step. Samples were prepared by standard filtration and centrifugation methods to obtain a final volume of 10mL. Ten grams of raw fecal material was diluted 1:5 in a Tris-Tween 80 dispersing solution before being filtered through cotton gauze. Ten milliliters of this filtrate were diluted 1:5 in sterile deionised water, and centrifuged 15 min at 1 000 X g . A final volume of 10 mL was taken after re-homogenisation of the sample. Then, the parasites in the samples were concentrated using IMS with the Dynabeads GC-Combo kit according to the manufacturer's instructions (Dyna® Biotech ASA, Oslo, Norway). Water samples were also concentrated by IMS according to the method 1623 of the USEPA (USEPA, 2005). At the end of this procedure, 10 µL were transferred to a microscopic slide for direct immunofluorescent detection. The samples were kept at -20 °C until DNA extraction.

Immunofluorescence assay (IFA)

The microscopic examination of all samples was completed with the Merifluor® *Cryptosporidium/Giardia* kit (Meridian Bioscience inc., Cincinnati, OH, USA) according to the manufacturer's recommended procedures. All slides were stained

with FITC and examined with a fluorescent microscope. As a semi-quantitative result, the number of cysts and oocysts was noted.

DNA extraction

From previously frozen samples, DNA was extracted with the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen inc., Mississauga, On, Canada) according to manufacturer's procedure. The resulting purified DNA was kept at -20 °C until PCR analysis.

PCR

Three sets of primers were used to amplify fragments of two distinct genes of *Cryptosporidium* and one gene of *Giardia*. All isolates were initially analysed using primers cry9 and cry15 described by Spano *et al.* (1997). These primer sequences amplify a 550 bp of the COWP gene of *Cryptosporidium*. Then, the Secondary Forward and Secondary Reverse primers described by Jiang and Xiao (2003) were used to amplify a 825 bp fragment of the SSUrRNA gene of *Cryptosporidium*. Finally, a 384 bp fragment of the β -giardin gene of *Giardia* was amplified using primers G376 and G759 described by Cacciò *et al.* (2002). Briefly, the PCR master mix consisted of 10X PCR buffer containing 1.5 mM MgCl₂, 5 pmol/ μ L of each primer, 10 mM of each dNTP, 5 μ L of BSA 1 μ g/ μ L, 5 U/ μ L of HotStar Taq DNA polymerase and 5 μ L of DNA template in a final volume of 50 μ L. For each experiment, a negative control consisting of the PCR mix without DNA template was included. Also, purified isolates from Waterborne inc. (New Orleans, LA, USA) were used as positive control. *Cryptosporidium* isolates amplification was performed as follows: after an initial denaturation step of 15 min at 95 °C, 36 cycles were run, each consisting of 55 s at 94 °C; 30 s at 55 °C; 50 s at 72 °C, followed by a final extension of 10min at 72 °C. *Giardia* isolates templates were subjected to an initial step of 15 min at 95 °C, and to 40 amplification cycles (30 s at 94 °C; 30s at 65 °C; 1 min at 72 °C), followed by an extension step of 7 min at 72 °C. All amplifications were performed in a Techgene thermocycler (Techne inc., Princeton, NJ, USA). PCR products were visualized by 1.5 % (COWP and β -giardin) and 1 % (SSUrRNA) agarose gel electrophoresis.

Characterization

DNA sequence analysis

PCR products were purified using the NucleoSpin® Extraction kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) and sequenced in both directions at the McGill University Genome Québec Innovation Center Sequencing Platform using the ABI 3730XL DNA analyzer system. Sequences were aligned using the BioEdit v7.0.5 program (Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA).

Restriction analysis of PCR products

RFLP analyses were done on the COWP and SSUrRNA genes of *Cryptosporidium* as described by Spano *et al.* (1997) and Jiang and Xiao (2003), respectively. Briefly, *Rsa* I restriction enzyme was used to differentiate species on the COWP gene, and both *Ssp* I and *Vsp* I (all enzymes are from Invitrogen Canada inc., Burlington, On, Canada) were used for the SSUrRNA gene. DNA profiles were visualized by 2 % agarose gel electrophoresis. Only isolates that had an intense PCR amplification were subjected to RFLP. No RFLP was done on the *Giardia* isolates, since it is impossible to differentiate this parasite at the specie level using actual molecular diagnosis methods.

RESULTS

Presence of parasites in the animal species of the watershed

IFA and/or PCR positive isolates were found in almost all animal species. *Cryptosporidium* was detected in all farm animal species, as well as in white-tailed deer, racoon and cat. *Giardia* was also found in all farm animal species, and in white-tailed deer, racoon, cat, beaver, muskrat, and dog. No parasites were found in Canada goose. The presence of both parasites did not seem to be more important in young than in adult dairy cattle. The number of fresh fecal material or manures isolates that were detected positive to IFA and PCR is listed in Table I and Table II, respectively.

Presence of parasites in water

Between April 5th 2005 and September 1st 2005, 38 surface water samples were collected once in two weeks and after two rainfall events on June 15th and September 1st. Examination of IMS concentrates by PCR indicates that 9 of the surface water samples were positive for *Cryptosporidium* and 8 for *Giardia* (Table III). No parasites have been detected after rainfall events. A total of 33 drinking water samples were also analyzed in this study; 10 samples were positive to *Cryptosporidium* and 8 were to *Giardia* by PCR (Table IV). All sampled wells were at one time or another found positive to *Cryptosporidium* and/or *Giardia* (Table V).

PCR-RFLP analyses of *Cryptosporidium* spp.

Concerning the COWP 550 bp fragment, a total of 30 samples from fecal material and water were subjected to RFLP, when the DNA amounts allowed it. From these, only one profile was identified (Figure 1). In fact, 20 isolates from dairy cow (young and adult), 3 from poultry, 1 from deer, 4 surface waters and 2 groundwaters showed the same RFLP profile. The pattern obtained was *C. parvum* bovine/murine, with 413 bp and 106 bp visible bands, as described by Xiao *et al.* (2000). The digestion of the SSUrRNA fragment of 825 bp identified 1 profile (Figure 1). In fact, isolates recovered from 1 dairy cow and 4 swines had the *Cryptosporidium parvum* pattern. No other genotypes were observed even if we expected to find different genotypes in young and adult dairy cows. In fact, it is known that *C. parvum* is more present in young calves, as *C. andersoni* is more common in adult cattle (Wade *et al.*, 2000).

Sequence analyses

Only parts of the amplified genes could be sequenced. So, the comparison between the isolates has been done on the common sequenced fraction. All sequenced COWP fragments resulted in the same 327 bp nucleotide sequence (see Figure 2). Those results agree with the RFLP analysis, as isolates recovered from dairy cow and poultry had the same profile. Comparison between our *Cryptosporidium* genotype and the genotypes already described was possible, but less than 50% homology was observed. For *Giardia*, a total of 16 different genotypes were found in 47 sequenced samples after

alignment of a 106 bp common region (Figure 3). None of these genotypes belonged to previously described *Giardia* genotypes. None of our genotypes could be associated to specific animal species. Actually, some genotypes have been recovered from different animal species. Particularly, one genotype seemed to be more common throughout the two influent watersheds. This genotype included 12 different isolates. Thus, isolates B1, B7, and B13 from dairy cows, Pig1 from swine, P3, P6, and P7 from poultry, D2 from a white-tailed deer, SW1, SW2, and SW6 from surface waters, and DW1 from groundwater, got the same 106 bp sequence.

DISCUSSION

Animal species

In this study, the presence of *Cryptosporidium* and *Giardia* was analysed in 10 animal species, including farm, wildlife and companion animals. Since a convenience sampling was used, our results cannot be used to estimate prevalences. Both parasites seemed to be common in all farm animals, similarly to the works of Olson *et al.* (1997). No parasites were detected in Canada goose by IFA and PCR. Heitman *et al.* observed similar results in 2002, as none of their 77 samples were found positive. They also reported high prevalence of *Giardia* in aquatic mammals as beaver and muskrat. During our study, this parasite was detected by IFA in muskrat, but not in beaver. IFA seemed to be more sensitive to detect parasites in muskrat than PCR. In fact, only one out of three *Giardia* isolates recovered from muskrats was amplified by PCR. *Giardia* of different genotypes could have been detected in muskrat using the IFA technique since it does not distinguish the *Giardia lamblia* type from other *Giardia* species (Mahbubani *et al.*, 1992). In this case, the PCR amplification of another gene fragment could have been necessary in order to detect the other genotypes. Generally, presence of diarrhea in sampled farm and companion animals was not observed. Therefore, it may be possible that the quantity of excreted parasites was too low to obtain positive results on IFA and PCR, even in infected animals. Indeed, it is well known that animal experiencing enteric illnesses are more susceptible to shed higher numbers of parasites (Fayer, 2004). Moreover, the sample size could have impaired our ability to detect the parasites.

The detection of *Cryptosporidium* in manures seemed to be more efficient using IFA than PCR, especially in swine. This may be due to cross-reaction with algae or other micro-organisms, as previously described by Verweij *et al.* (2004) and Rochelle *et al.* (1997). In addition, since pig slurry is composed of fecal material, urine and mostly water, the presence of contaminants and PCR inhibitors, like organic compounds, could have affected the PCR reaction (Zarlenga and Trout, 2004). Nevertheless, because *Cryptosporidium* and/or *Giardia* were detected in all types of sampled manures to be applied in field, it was possible to assume that there is a potential risk of environmental contamination when manures are spread to land as fertilizers (Chevalier *et al.*, 2004).

Surface water

In most cases, our PCR results suggested that in surface water this technique is more sensitive than the IFA, as reported by Verweij *et al.*, (2004) and Rimhanen-Finne *et al.* (2002). However, *Cryptosporidium* was more often detected by IFA than by PCR. As in pig slurry, we can not exclude that some of our IFA results could have been false positives, due to cross-reaction with algae. In environmental samples such as water, this situation has been reported by various authors (Mayer and Palmer, 1996; Wallis *et al.*, 1996). For *Giardia*, cross-reactions are less common in comparison to *Cryptosporidium*. On June 27th, July 20th, August 10th and 24th, 2005, *Giardia* was detected by IFA but not by PCR. This is also likely due to the presence of inhibitors in the water samples. In fact, the presence of phenols (Guy *et al.*, 2003), humic and fulvic acids (Rimhanen-Finne *et al.*, 2002), various micro-organisms, and organic compounds in environmental samples is unfavorable to PCR reaction (Zarlenga and Trout, 2004).

Concerning the surface water results, an environmental contamination was found on April 5th, 2005. However, those PCR results do not give information on the viability and infectivity of the parasites, since those parameters were not examined during this study. Nevertheless, on April 5th, 2005, no dejections had been spread to land since fall 2004. This could be explained by a possible wildlife or human contamination. The possibility of human contamination was not examined during this study. That aimed to

explore the possible role of wildlife in the contamination by use of genetic characterization of the isolates. In our study, rainfall did not appear to influence the detection of parasites in water courses, in opposition to the works of Xiao *et al.* (2000), where *Cryptosporidium* was detected in stream storm water samples. This disagreement might be possibly explained by the dilution effect observed in water courses after rainfall events. It is possible that the concentration of parasites in streams was significantly low, mostly because samples were collected shortly after rainfall events. Moreover, the USEPA method 1623 has limitations for larger volume samples of water after rainfall events and runoff. In these cases, sampling of more than 10 L could have increased our parasites recovery rate.

Drinking water

Cryptosporidium and/or *Giardia* were detected in all sampled wells. Since both parasites are quite resistant to chlorine (Fayer, 2004, Jarroll *et al.*, 1981), their presence in chlorinated wells is not surprising. However, their presence in deep wells does not necessarily suggest groundwater contamination. Since the groundwater was sampled at the faucets, parameters like canalizations and well integrity were not taken into account. Such characteristics could have influenced the tap water quality. Our results however indicate a potential hazard for the people drinking such water.

RFLP

The possibility to concentrate parasites in environmental samples is generally known to be low (Xiao *et al.*, 2000). Consequently, small quantity of DNA can be extracted from such samples. We also observed this phenomenon in this study, even if we proceeded with an IMS procedure to concentrate parasites before processing of samples. This phenomenon has resulted in many instances in a poor detection and visualization of DNA patterns on agarose gel. Relatively few of the PCR positive isolates were thus submitted to RFLP. In dairy cattle, even if we expected to find *C. parvum* in young animals and *C. andersoni* in adult animals, only *C. parvum* was detected in both groups. In opposition to our results, Wade *et al.* (2000) did not observe *C. parvum* in cows older than 6 months, and found *C. andersoni* in all groups of age. Since the

differentiation between *C. parvum* and *C. andersoni* was performed by microscopic examination of the morphology of the parasites, they could have underestimated the prevalence of *C. parvum* in adult animals.

Sequencing

Since it was not possible, using RFLP, to discriminate between parasites encountered in the different animal species, we proceeded to the DNA sequencing of the positive samples. In small geographic areas, it was expected to find a low variability in the genotypes of the parasites, particularly using a discriminatory technique as DNA sequencing. Our results indicated quite an opposite situation for *Cryptosporidium* than for *Giardia*. Using the same procedure, a great genetic variability was observed for *Giardia*, while only one genotype was found for *Cryptosporidium*, even if the amplified genes were shown to be variable in previous studies (Jiang et Xiao, 2003; Spano *et al.*, 1997). It is thus likely that this unique genotype is quite stable and is well established in the watersheds.

The genotype of *Cryptosporidium* and three out of 16 *Giardia* genotypes were detected in many different animal species. Since bovine and poultry are not usually infected with the same genotypes, it can be hypothesed that water could act as a transmission agent of the parasites. Unlike some dairy cows, poultry were not showing any clinical signs at the sampling period. The bovine parasites could probably have contaminated poultry through drinking water. In fact, we can speculate that drinking water was contaminated after that bovine manures were spread to land. Drinking water could have been contaminated if well integrity is not maintained. So, it is possible that poultry became infected after drinking the untreated water.

Our study suggests a greater genetic variability in the β -giardin gene of *Giardia* than what was previously reported. After a study of a 753bp region of the β -giardin gene, Cacciò *et al.* (2002) have observed an approximate diversity of 5% between Assemblages, with sequences that are relatively well conserved. Our sequencing data show an approximate diversity of 7% in the selected locus of 106bp. It is likely that

sequencing of a larger locus would have increased the genetic variability observed in this study. In addition, in the small watersheds studied here, the use of a less discriminatory molecular technique would lead to less clusters of *Giardia* isolates. The high genetic diversity had thus a negative impact on the possibility to identify the animal species responsible for contamination.

In future works, it would be interesting to quantify the load of parasites in the environment and to improve the RFLP techniques in a way to differentiate the parasites at the species level. Also, the parasites should be studied with different approaches, using characterization techniques with variable discriminatory powers to increase likelihood to establish the source of water contamination.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the Nature and Technology Research Fund from the Quebec government. Our thanks to Louise Lessard and summer students for the technical support and Gabriel G. Perron for his support in the sequencing analysis.

REFERENCES

Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev 14(3): 447-475.

Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E. 2002. Sequence analysis of the β -*giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol 32: 1023-1030.

Chevalier, P., Levallois, P., Michel, P. 2004. Infections entériques d'origine hydrique potentiellement associées à la production animale : revue de littérature. Vecteur Environnement 37(2): 90-106.

Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol 126: 37-56.

Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int J Parasitol 30: 1305-1322.

Guy, R.A., Payment, P., Krull, U.J., Horgen, P.A. 2003. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. Appl Environ Microbiol 69(9): 5178-5185.

Heitman, T.L., Frederick, L.M., Viste, J.R., Guselle, N.J., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., Olson, M.E. 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River basin in Alberta, Canada. Can J Microbiol 48(6): 530-541.

Jarroll, E.L., Bingham, A.K., Meyer, E.A. 1981. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. Appl Environ Microbiol 41(2): 483-487.

Jiang, J., Xiao, L. 2003. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp.. J Eukaryot Microbiol 50(6): 542-547.

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Perlin, M.H., Schaefer III, F.W., Jakubowski, W., Atlas, R.M. 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. J Clin Microbiol 30(1): 74-78.

Massanet-Nicolau, J. 2003. New method using sedimentation and immunomagnetic separation for isolation and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. Appl Environ Microbiol 69(11): 6758-6761.

Mayer, C.L., Palmer, C.J. 1996. Evaluation of PCR, nested-PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. Appl Environ Microbiol 62(6): 2081-2085.

Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., McAllister, T.A. 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. Vet Parasitol 68: 375-381.

Rimhanen-Finne, R., Hörman, A., Ronkainen, P., Hänninen, M.-L. 2002. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. J Microbiol Methods 50: 299-303.

Rochelle, P.A., De Leon, R., Stewart, M.H., Wolfe, R.L. 1997. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. Appl Environ Microbiol 63(1): 106-114.

Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P., Crisanti, A. 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. FEMS Microbiol Lett 150: 209-217.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Office of Water. EPA 815-R-05-002. Accessible à <http://www.epa.gov/microbes/> .

Verweij, J.J., Blangé, R.A., Templeton, K., Schinkel, J., Brienen, E.A.T., van Rooyen, M.A.A., van Lieshout, L., Polderman, A.M. 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J Clin Microbiol 42(3): 1220-1223.

Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L. 2000. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. Vet Parasitol 93: 1-11.

Wallis, P.M., Erlandsen, S.L., Isaac-Renton, J.L., Olson, M.E., Robertson, W.J., van Keulen, H. 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. Appl Environ Microbiol 62(8): 2789-2797.

Xiao, L., Limor, J., Morgan, U.M., Sulaiman, I.M., Thompson, R.C.A., Lal, A.A. 2000. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. Appl Environ Microbiol 66(12): 5499-5502.

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

Table I. *Cryptosporidium* and *Giardia* detected positive by IFA and PCR in animal fresh feces

Animal species	Total no. of samples	No. of positive samples by IFA ¹									No. of positive samples by PCR	
		1+			2+			3+			<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>			
Dairy cow (≥ 1 year old)	36	3	2								20	30
Dairy cow (< 1 year old)	32	1	4		2						16	28
Swine	10	5	3	4							4	3
Poultry	11										5	9
White tailed-deer	39	1	4		1						4	4
Canada goose	12											
Raccoon	12									1	1	4
Muskrat	4			1	1							1
Beaver	5											1
Cat	3		1								2	2
Dog	3										2	2

¹ IFA quotation: 1+: 1-9 (oo)cysts detected on slide ; 2+: 10-49 (oo)cysts ; 3+: ≥ 50 (oo)cysts

Table II. *Cryptosporidium* and *Giardia* detected positive in manures

Animal species	Total no. of samples	No. of positive samples by IFA ¹						No. of positive samples by PCR	
		1+		2+		3+		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>		
Dairy cow	21	5	6			1		5	6
Swine	6		3	1	1	3		1	3
Poultry	1					1			1

¹ IFA quotation: 1+: 1-9 (oo)cysts detected on slide ; 2+: 10-49 (oo)cysts ; 3+: ≥ 50 (oo)cysts

Table III. Isolates of *Cryptosporidium* and *Giardia* detected in surface water

Date in 2005 ^{3,4}	Ruisseau aux Castors ²		Ruisseau Wallbridge ²	
	IFA	PCR	IFA	PCR
April 5 th		G+ ¹		C+, G+
June 6 th	G+	C+, G+		
June 15th	C+			
June 27 th	C+		G+	
July 13 th	G+	C+, G+	G+	C+, G+
July 20 th	G+	G+	G+	C+
August 10 th	G+		G+	C+, G+
August 24 th			G+	
September 1st				

¹ A positive result is shown by G+ for *Giardia* and C+ for *Cryptosporidium*.

² Includes 2 and 3 sampling sites for the Ruisseau aux Castors and Wallbridge, respectively.

When at least 1 sample was detected positive, the final result was positive (G+ or C+).

³ On April 5th, no animal dejections had been spread to land.

⁴ On June 15th and September 1st, the sampling was performed after heavy rainfall events.

Table IV. *Cryptosporidium* and *Giardia* in surface and drinking water

Sample type	Total no. of samples	No. of positive samples by IFA		No. of positive samples by PCR	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
		Surface water	38	3	13
Drinking water	33	1	1	9	8

Table V. Parasites detected by PCR in drinking water according to the well type and sampling dates

Well	Well type	May 2 nd , 2005		June 1 st , 2005		July 25 th , 2005	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
1	Deep, non-treated					+	+
2	Deep, non-treated	+				+	
3	Deep, chlorinated			+		+	
4	Deep, non-treated	+				+	
5	Deep, non-treated				+		
6	Deep, non-treated				+		
7	Deep, non-treated				+	1	1
8	Deep, chlorinated					+	
9	Surface, non-treated		+				
10	Deep, non-treated		+			+	
11	Deep, non-treated				+	+	

1 On these dates, IFA results were positives, but not PCR.

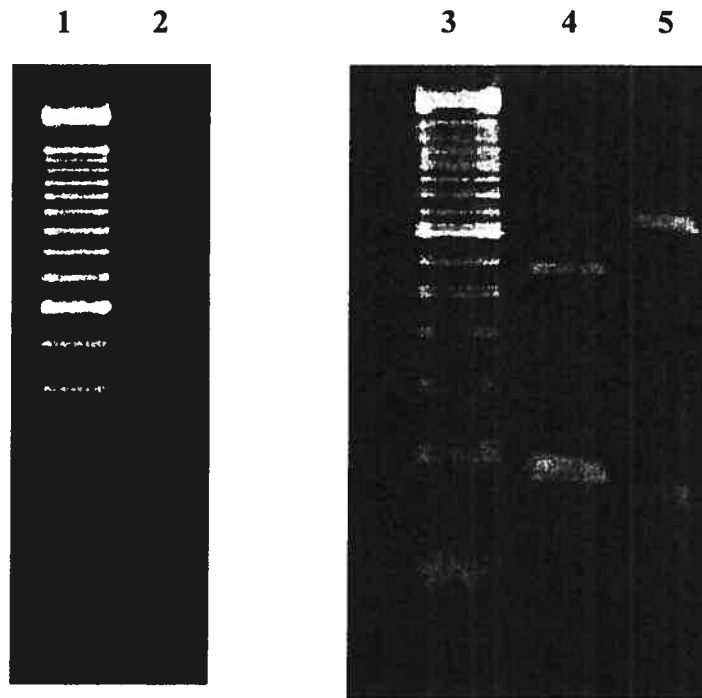


Figure 1. RFLP profiles of *Cryptosporidium* COWP gene after *Rsa* I digestion (left panel) and SSUrRNA gene after *Ssp* I and *Vsp* I digestion (right panel). Lanes 1 & 3, 100bp DNA ladder; lane 2, *C. parvum* bovine/murine; lane 4, *C. parvum* (*Ssp* I); lane 5, *C. parvum* (*Vsp* I).

```

      10      20      30      40      50      60
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GGCATTATCT TGTAATACTG TACCTGGAGG GCAGACAGGT TGAGTTGGAG CAGAACTAGT

      70      80      90      100     110     120
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TTGTATACAT TGGAGGCCTT GTAAAATGAA ATTTGGTGGG CATTCTTTG CAGGAGCTAC

     130     140     150     160     170     180
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
ATATAGTACA CAATCATCTC CTGAGTCTGT ATATCCTGGT GGCAGACCA TATCAATATT

     190     200     210     220     230     240
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TTTAATCACT TTACATTTTC CATTTTCAAA TATTGAATTA GGTGGGCATG TCGATTCTAA

     250     260     270     280     290     300
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TTCAGCTGAT TCTGGTGCCA TACATTGTTG TCCTGACAAA TTGAATCCAG GAGGACAGAT

     310     320
....|....| ....|....| ....|..
TTTATTTGCA GGGAGATATT GAACACA

```

Figure 2. 327 bp DNA sequence of *Cryptosporidium* isolates. This genotype was recovered in dairy cow, poultry and water.

	10	20	30	40	50	60
B1	GGGATTTCGCC	CGCATCTCCG	CCGCCATCGA	GAAGGAGACG	ATCGCCCGCG	AGAGGGCCGT
B2	...C.....G.....
B3	...C.....G.....
B4	...C.....G.....
B5	...C.....G..	...G.....
B6	...C.....A.G....
B7
B8	...C.....G.....
B9	...C.....G.....
B10	...C.....G.....
B11	...C.....G.....
B12	...C.....G.....
B13
Pig1
P1	...C.....G.....
P2
P3
P4G.....
P5	...C.....G.....
P6
P7
Dog1	...C.....G.....
Dog2
Cat1
Cat2
D1
D2
D3	...C.....G.....
D4C..GG....
D5
R1G....
R2G.....
R3	...C.....G.....
SW1	...C.....G.....
SW2
SW3
SW4	...C.....T.....
SW5	...G.....
SW6
SW7	...C.....G.....
DW1
DW2	...C.....G.....
DW3	...C.....G.....
DW4G.....
DW5	...C.....G.....
DW6	...C.....G.....G....
DW7	...C.....G.....

	70	80	90	100
B1
B1	CAGCGCAGCC	ACGACCCGAGG	CGCTCACAAA	CACGAAGCTT GTCGAG
B2	T.....T...A..A.C.....
B3	T.....T...A..A.C.....
B4	T.....T...A..A.C.....
B5	T.....T...A..A.C.....
B6	T.....T...A..A.C.....
B7
B8	T.....T...A..A.C.....
B9	T.....T...A..A.C.....
B10	T.....T...A..A.C.....
B11	T.....T...A..A.C.....
B12	T.....T...A..A.C.....
B13
Pig1
P1	T.....T...A..A.C.....
P2A.....
P3
P4	T.....T...
P5	T.....T...A..A.C.....
P6
P7
Dog1	T.....T...A..A.C.....
Dog2A..A.C.....
Cat1A.....
Cat2A.....
D1T...
D2
D3	T.....T...A..A.C.....
D4G.....
D5T...
R1T.....
R2	T.....T...A..A.C.....
R3	T.....T...A..A.C.....
SW1	T.....T...A.....
SW2
SW3
SW4C...A.....C.....C.....
SW5G.....
SW6
SW7	T.....T...A..A.C.....
DW1
DW2	T.....T...A..A.C.....
DW3	T.....T...A..A.C.....
DW4	T.....T...C.....
DW5	T.....T...A..A.C.....
DW6	T.....T...A..A.C.....
DW7	T.....T...A..A.C.....

Figure 3. Genotype diversity among *Giardia* isolates after multiple alignment of a 106 bp region of the β -giardin gene. Isolates “B” are from dairy cows, “P” from poultry, “D” from deers, “R” from racoons, “SW” from surface waters and “DW” from drinking waters. Nucleotides that are identical to those from the B1 genotype sequence are denoted by a dot (.).

Chapitre 4.
DISCUSSION GÉNÉRALE

Afin de comprendre le cycle de transmission des micro-organismes tels que *Cryptosporidium* et *Giardia* dans l'environnement, la caractérisation génotypique des isolats provenant des animaux et du milieu environnant devient indispensable. D'ailleurs, ce ne sont pas toutes les techniques moléculaires qui permettent de différencier les parasites jusqu'à l'espèce, ce qui rend l'identification de la source de contamination plutôt difficile. Pourtant, plusieurs études exposent désormais des méthodes qui semblent pouvoir répondre à un tel besoin. À l'échelle d'un petit bassin versant du Québec, il s'agissait de relever les génotypes présents chez les espèces animales, pour ainsi les comparer à ceux qui étaient retrouvés dans les cours d'eau et l'eau souterraine. De cette façon, la source de contamination environnementale pouvait potentiellement être ciblée.

Détection des parasites dans les fèces et fumiers

Plusieurs espèces animales ont pu être suivies au cours de cette étude. Lors de l'échantillonnage des fèces fraîches, peu d'individus présentaient des symptômes cliniques de diarrhée. Au total, il a été possible de détecter la présence de *Cryptosporidium* et/ou de *Giardia* dans 10 espèces animales différentes. En fait, l'oie blanche a été la seule espèce où aucun parasite n'a été détecté, autant par immunofluorescence que par PCR, ce qui est en accord avec ce que Heitman *et al.* (2002) avaient observé. En ce qui concerne les autres animaux de la faune, les deux parasites ont pu être détectés, ce qui permet de croire que les gènes ciblés par PCR ont été utiles et efficaces. Peu d'études ont porté jusqu'à présent sur la faune; les méthodes de PCR développées pour de telles espèces sont donc plutôt rares. Il semble toutefois que le fragment du gène COWP de *Cryptosporidium* utilisé dans notre étude permet de détecter ce parasite chez les espèces fauniques. En effet, aucun des échantillons n'a été trouvé positif en utilisant le fragment de 825pb du gène SSUrRNA. Un faible nombre des études portant sur ces gènes avaient étudié les animaux de la faune. Ces études étaient surtout des études d'infections expérimentales (Bajer *et al.*, 2003 ; Bednarska *et al.*, 2003), quoique l'étude de Atwill *et al.* (2001) ait rapporté des résultats positifs chez l'écureuil pour les mêmes fragments de gènes que ceux utilisés dans notre étude. Dans des travaux futurs, il faudra considérer un plus grand nombre d'échantillons provenant de castors, de rats musqués et de rats laveurs afin de mieux évaluer le rôle que peuvent prendre ces

espèces dans la contamination du bassin versant à l'étude. Toutefois, le fait que nous ayons rapporté des résultats positifs pour les trois espèces avec un faible nombre d'échantillons tend à suggérer une grande prévalence des parasites chez ces animaux, surtout pour *Giardia*. Il est d'ailleurs reconnu que les animaux aquatiques comme les castors et les rats musqués sont des porteurs importants de ce parasite (Heitman *et al.*, 2002 ; Dunlap et Thies, 2002).

Pour ce qui est des animaux d'élevage, *Cryptosporidium* et/ou *Giardia* ont été détectés dans toutes les espèces animales à l'étude. Puisque nos résultats ne peuvent être considérés comme étant des estimations de prévalences à cause du mode d'échantillonnage utilisé et du nombre restreint d'échantillons, il devient difficile de comparer avec les autres études. Pourtant, nos résultats suggèrent une présence de parasites similaire à ce que d'autres équipes ont rapporté (Ruest *et al.*, 1998 ; Olson *et al.*, 1997b). Enfin, les deux parasites ont été détectés dans les animaux de compagnie étudiés, soit le chat et le chien, malgré le faible nombre d'échantillons qu'il a été possible de prélever pour chaque espèce animale. L'étude de McGlade *et al.* (2003a) avait montré une prévalence importante de *Giardia* chez le chat, de l'ordre de 80%, sans qu'aucun des échantillons n'ait été noté positif par microscopie directe. Afin de ne pas surestimer la présence des parasites au sein des animaux de compagnie, une étude future devra considérer un nombre plus important d'échantillons. Toutefois, la méthode de détection par PCR utilisée semble adéquate pour détecter *Cryptosporidium* et *Giardia* chez le chat et le chien, comme d'autres équipes l'avaient observé auparavant (Jiang et Xiao, 2003 ; Cacciò *et al.*, 2002 ; Spano *et al.*, 1997).

À l'intérieur des bassins versants, les fumiers qui allaient servir d'amendement pour les cultures ont également été étudiés. L'échantillonnage s'est effectué le plus tard possible, soit peu de temps avant que les fumiers ne soient épandus dans les champs. De cette façon, la présence éventuelle des parasites allait donc être représentative de ce qui allait être disséminé dans l'environnement. *Cryptosporidium* et/ou *Giardia* ayant été détectés dans tous les types de fumiers, la contamination de l'eau suite à l'épandage devient possible si ces effluents ne sont pas gérés convenablement. Par exemple, si les

fumiers sont épandus à un mauvais moment (avant des pluies fortes ou lorsque le sol est gelé ou trop froid), s'ils ne sont pas incorporés peu de temps après leur épandage ou s'ils sont appliqués trop près des cours d'eau ou des puits, la contamination de l'eau par les parasites devient potentielle. L'étude de Schijven *et al.* (2004) présente les différents facteurs physiques des fumiers de bovins qui influencent le largage des micro-organismes dans le milieu lors de précipitations. La dissémination des parasites dans l'environnement ne semble pas être liée à la température. Par contre, lors de précipitations intenses, le taux auquel les parasites sont transportés hors des fumiers est sensiblement augmenté. Ainsi, on pouvait s'attendre à détecter les parasites plus fréquemment suite aux événements de pluie.

Finalement, bien qu'ils concordent la plupart du temps avec ceux de PCR, les résultats d'immunofluorescence obtenus dans les matières fécales fraîches et les fumiers ne correspondent pas toujours à ce qui est rapporté par PCR. En effet, dans le cas de *Cryptosporidium*, il n'est pas rare de faire face à de faux résultats positifs, probablement à cause des nombreuses réactions croisées qui peuvent survenir avec d'autres micro-organismes (Mayer et Palmer, 1996 ; Wallis *et al.*, 1996). Les résultats suggèrent que les isolats de *Cryptosporidium* issus de certaines espèces animales, notamment le porc, sont plus facilement détectés par immunofluorescence que par PCR. Dans ce cas-ci, une autre hypothèse peut être posée. En effet, puisque l'élevage des porcs requiert des volumes d'eau importants, entre autres pour le lavage des parcs, il est possible qu'une quantité importante d'inhibiteurs issus de cette eau puisse se retrouver dans les échantillons de matières fécales fraîches et de lisier. Ainsi, il est possible que dans le cas de ces échantillons, la présence d'inhibiteurs ait agi au niveau de la PCR d'une manière plus importante qu'à l'immunofluorescence.

Mis à part le cas du rat musqué, les résultats d'immunofluorescence concernant *Giardia* sont comparables aux résultats de PCR. En fait, il semble que l'immunofluorescence soit plus efficace à détecter *Giardia* chez le rat musqué que la PCR. Il est possible que ces animaux soient porteurs de parasites dont le génotype n'ait pas été détecté par les amorces utilisées dans cette étude, tout en l'ayant été par la trousse

commerciale d'immunofluorescence, puisque celle-ci ne permet pas de distinguer entre les différentes espèces de *Giardia* (Mahbubani *et al.*, 1992). Dans de futurs travaux, il serait intéressant de prendre en considération l'étude d'au moins deux gènes différents afin que l'identification des génotypes en présence soit la plus exacte possible.

Détection des parasites dans l'eau

L'échantillonnage de l'eau de surface et souterraine des bassins s'est effectué entre le 5 avril et le 1^{er} septembre 2005. *Cryptosporidium* et *Giardia* ont été détectés de façon intermittente durant cette période, sans qu'il y ait particulièrement de lien avec les épandages et les précipitations. Même si l'érosion hydrique est le facteur qui influence le plus le mouvement des parasites vers les cours d'eau, plusieurs autres paramètres le régissent également (Walker *et al.*, 1998). Bien que ces facteurs n'aient pas été évalués lors de cette étude, il faut savoir que le type de sol, la pente, les pratiques de conservation, les précipitations (durée et quantité), les fentes de retrait et les voies d'écoulement préférentielles sont quelques exemples de critères à considérer.

Les parasites n'ayant pas été détectés suite aux événements de ruissellement, il est permis de supposer que l'effet de dilution ait été considérable. En effet, puisque l'échantillonnage s'est effectué peu de temps après la pluie, les volumes d'eau présents dans les ruisseaux étaient considérablement plus importants. La concentration des parasites s'en est vraisemblablement trouvée amoindrie, d'où le faible taux de récupération. Puisque les parasites ont été détectés aux autres moments de la saison, il semble que l'effet de dilution puisse expliquer leur absence lors d'événements de pluie. L'étude Xiao *et al.* (2000) a rapporté une présence importante de *Cryptosporidium* dans les eaux de ruissellement suite à des orages violents. Toutefois, une moyenne de 59 gallons d'eau (environ 220 L) avait été échantillonnée, comparé à 10 L dans notre étude. De plus, leur méthode de concentration des parasites incluait une étape de flottation par gradient de sucrose en plus de l'immunocapture que nous avons également réalisée. Ces deux raisons ont probablement fait en sorte que le nombre d'ookystes qu'ils récupéraient était plus important, sans toutefois suggérer une plus grande présence dans les cours d'eau, puisque l'échantillonnage d'eau à d'autres moments de l'année n'a pas été réalisé.

Par ailleurs, le fait que les événements de ruissellement contribuent à diluer les parasites dans l'eau ne signifie cependant pas un risque moindre pour les populations, puisque les quantités (charge) de micro-organismes transportés dans l'environnement peuvent être supérieures à ce qui est retrouvé en temps normal.

Le fait que *Cryptosporidium* et/ou *Giardia* aient été détectés dans l'eau de tous les puits échantillonnés suggère que le risque pour la population utilisant cette eau est significatif. Toutefois, la possibilité de la contamination de la nappe phréatique en tant que telle n'a pas été formellement démontrée. En effet, l'état des puits n'ayant pas été vérifié, la contamination de l'eau prélevée au robinet a pu s'effectuer à plusieurs niveaux. Par exemple, des fissures dans le puits ou dans la canalisation auraient été suffisantes à ce que des matières fécales provenant de la surface du sol s'infiltrent dans le puits et contaminent l'eau. Il est possible que le puits de surface ait été contaminé par du ruissellement de surface ou par infiltration de contaminants si l'intégrité du puits laisse à désirer. Par ailleurs, il est aussi possible que la présence d'inhibiteurs ait été moins importante dans les échantillons d'eau de puits comparativement aux échantillons d'eau de surface, d'où une meilleure détection des parasites dans l'eau de consommation.

Dans une étude future, il serait intéressant de quantifier les parasites récupérés dans l'eau, pour que l'exposition puisse être estimée. En général, les résultats d'immunofluorescence concordent avec les résultats de PCR, mis à part les résultats de *Cryptosporidium* dans l'eau de surface, alors que tous les parasites détectés par immunofluorescence n'ont pas été amplifiés par PCR. Ceci peut être expliqué par le fait qu'il n'est pas rare d'avoir de faux résultats positifs dans des échantillons d'eau analysés par microscopie (Santé Canada, 2004). En effet, des réactions croisées avec des algues et la détection d'ookystes fantômes (vides ; dont il ne reste que la membrane externe) peuvent produire de tels résultats. Pour ce qui est de *Giardia*, il y a quelques isolats qui n'ont pas été détectés par PCR contrairement à l'immunofluorescence. Comme dans le cas des matières fécales, il est possible que les inhibiteurs présents dans les échantillons aient été néfastes à la réaction de PCR ou que les génotypes présents dans l'eau ne pouvaient pas être amplifiés à partir des amorces que nous avons utilisées. Bien que les

amorces développées dans le but d'amplifier des fragments des gènes COWP (Spano *et al.*, 1997) et SSUrRNA (Jiang and Xiao, 2003) pour *Cryptosporidium*, et β -giardin pour *Giardia* (Cacciò *et al.*, 2002) permettaient de détecter plusieurs génotypes différents, il est fort possible que certains isolats prélevés dans le cadre de notre étude aient pu présenter des nouveaux génotypes. Étant donné qu'aucune étude de caractérisation génétique de *Cryptosporidium* et de *Giardia* n'avait été réalisée au Québec jusqu'à maintenant, il était donc légitime de supposer que les génotypes identifiés ailleurs pouvaient potentiellement être retrouvés ici. Il est toutefois possible que les génotypes pouvant être isolés au Québec ne soient pas semblables à ceux qui sont décrits dans la littérature. En effet, certains groupes et assemblages sont davantage prévalents dans certaines régions (Hopkins *et al.*, 1997). Il est également probable que les parasites du bassin versant à l'étude possèdent des mutations silencieuses au niveau des amorces utilisées, malgré le fait que ces régions soient normalement conservées. Ces changements de séquence génétique feraient en sorte que leur amplification se soit avérée impossible, sans que les isolats n'appartiennent nécessairement à des nouvelles espèces de parasite.

Caractérisation génétique

La caractérisation des parasites par RFLP s'est révélée plus ardue que ce qui était prévu. En effet, nos échantillons de fèces n'étant pas issus d'animaux nécessairement cliniquement affectés, il est apparu que souvent, la quantité d'ADN recueillie n'était pas suffisante pour que les profils de RFLP soient clairs. De plus, la faible conservation de l'ADN, même congelée, ne nous permettait pas d'analyser les isolats plusieurs fois. Il est en effet fort probable que l'on ait pu retrouver, dans les échantillons environnementaux récoltés, des inhibiteurs assez puissants pour diminuer considérablement la réaction de PCR (Mahbubani *et al.*, 1998).

Finalement, il a été possible de distinguer un seul profil génétique chez *Cryptosporidium*, soit celui de *C. parvum* bovin/murin avec le gène COWP et celui de *C. parvum* avec le SSUrRNA. En ce qui concerne les bovins laitiers, nous espérons retrouver des génotypes différents selon l'âge des animaux. Puisque nous avons établi la limite entre animaux jeunes et adultes à 1 an, âge auquel les vaches entrent

habituellement en production laitière, il est possible que le groupe contenant les jeunes animaux soit trop large pour qu'on y distingue un génotype différent du groupe des adultes. En effet, l'échantillonnage distinct des veaux de moins de 6 mois aurait peut-être mené à la détection d'un génotype différent. Toutefois, il est reconnu que les veaux sont plus souvent porteurs de *C. parvum* et que c'est *C. andersoni* qui peut être fréquemment détectée chez les animaux adultes (Wade *et al.*, 2000), ce qui est en contradiction avec nos résultats. En effet, *C. parvum* a été détectée par RFLP chez les animaux adultes. Étant donné que les méthodes utilisées permettaient la distinction entre *C. parvum* et *C. andersoni* et que des contrôles positifs et négatifs ont toujours été inclus au cours des analyses, la validité des résultats peut difficilement être mise en doute. La présence de *C. parvum* chez les bovins laitiers adultes dans le bassin versant étudié semble donc plus importante que pour *C. andersoni*. Il semble toutefois que le RFLP ne soit tout de même pas la meilleure méthode pour discriminer entre les différents isolats de *Cryptosporidium*. Puisque notre étude s'est déroulée dans un petit bassin versant, il nous apparaissait avantageux d'avoir recours à une méthode plus discriminante, soit le séquençage, pour différencier les génotypes qui pouvaient y être présents. Dans la littérature, les gènes COWP, SSUrRNA et β -giardin sont reconnus comme ayant un pouvoir discriminant assez puissant pour répondre à cette demande. Toutefois, en utilisant la même technique, nous avons pu observer des résultats contraires pour les deux parasites. En effet, un seul génotype de *Cryptosporidium*, ce qui traduit une faible variabilité génétique, a été observé chez les diverses espèces animales. Il est possible que ce génotype se soit établi dans l'ensemble des bassins versants et que sa grande stabilité fasse en sorte qu'on ne détecte qu'un génotype unique. Dans ce cas-ci, l'étude d'un autre gène ou d'un locus plus long du COWP pourrait assurer un plus grand pouvoir discriminant et ainsi permettre la détection d'un plus grand nombre de génotypes.

Au contraire, 16 génotypes de *Giardia* ont pu être observés chez plusieurs espèces animales, révélant la très grande variabilité génétique de ce parasite. Une telle variabilité n'a d'ailleurs jamais été observée. De plus, les études qui ont considéré le gène β -giardin ont souvent analysé des isolats provenant d'une zone géographique beaucoup moins restreinte que celle étudiée dans ce projet. Le choix du gène ciblé ne devrait donc pas être

remis en considération. Dans ce cas particulier, l'utilisation d'une technique présentant un pouvoir discriminant moins élevé pourrait être considérée pour que les génotypes semblables puissent, le cas échéant, être regroupés et liés à des espèces animales spécifiques, si possible. De plus, l'étude de la phylogénie des génotypes que nous avons observés pourrait révéler une souche mère qui s'avérerait être la source probable de contamination de l'eau. De cette façon, il serait peut-être possible de déterminer l'origine potentielle de contamination de l'environnement.

Étant donné que des isolats de *Cryptosporidium* provenant de volaille et de mammifères présentent le même génotype, il est possible d'émettre l'hypothèse que l'eau ait pu agir comme vecteur du parasite. Ainsi, la contamination de l'eau aurait pu se faire par une espèce animale spécifique, et d'autres espèces animales auraient ensuite pu être contaminées après ingestion de l'eau. De plus, cette hypothèse expliquerait pourquoi les individus échantillonnés ne présentaient pas tous des symptômes cliniques. En effet, une espèce animale comme le poulet qui aurait été infectée avec des parasites issus de mammifères suite à l'ingestion d'eau pourrait tout de même être porteuse asymptomatique de parasites et les excréter dans le milieu. La grande variabilité des génotypes observés chez *Giardia* est peut-être liée au changement du génotype des parasites lors de leur passage à travers le système digestif des hôtes. Peu d'information est accessible à ce sujet dans la littérature. Dans une étude future, il serait intéressant de vérifier si une telle situation est possible.

D'une façon générale, la caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium* et de *Giardia* s'est révélée plutôt fastidieuse, surtout en utilisant des échantillons provenant de l'environnement et des sujets qui ne présentaient pas de signes cliniques. Même si la source de contamination n'a pas pu être ciblée spécifiquement, l'étude de la distribution des génotypes répartis à travers le territoire du bassin versant a permis d'accroître sensiblement notre connaissance de l'épidémiologie moléculaire des parasites étudiés au Québec et de raffiner les techniques d'analyse. Des études plus approfondies en utilisant des fragments de gènes plus importants devraient éventuellement pouvoir apporter des réponses intéressantes quant aux sources de contamination de l'environnement.

Chapitre 5.
CONCLUSIONS

Notre étude a permis d'évaluer la distribution des différents génotypes de *Cryptosporidium* et de *Giardia* chez les diverses espèces animales et dans l'eau du bassin versant de la Rivière-aux-Brochets. En général, les résultats de l'étude nous permettent de conclure que :

1. Toutes les espèces animales étudiées, sauf l'oie blanche, peuvent être porteuses des parasites.
2. La présence des parasites dans les fosses d'entreposage de fumiers rend la contamination environnementale possible lors des épandages.
3. Un nombre significatif d'échantillons d'eau provenant des eaux de surface et de consommation est porteur de *Cryptosporidium* et *Giardia*.
4. Un seul génotype de *Cryptosporidium* a été observé chez des bovins, des volailles et dans l'eau de surface, dénotant ainsi la faible variabilité génétique de ce parasite dans la région étudiée.
5. Seize génotypes de *Giardia* ont été observés chez différentes espèces animales. La grande variabilité génétique des isolats de *Giardia* implique que les génotypes observés ne sont pas associés à des espèces animales spécifiques.

De cette façon, il n'est pas possible de cibler quelle espèce animale est responsable de la contamination de l'eau du bassin versant. Par contre, il pourrait être possible d'y parvenir avec l'étude plus générale de *Giardia*, par des méthodes moins discriminantes qui permettraient d'obtenir des groupements de génotypes semblables selon les espèces animales. Ainsi, le génotype ou le groupe de génotypes communs à l'origine de la contamination pourraient être ciblés. Au contraire, l'étude de *Cryptosporidium* devra être encore plus discriminante, afin de trouver les gènes qui révéleraient des génotypes différents, même dans un micro-environnement comme

présenté dans cette étude. En général, l'étude des deux parasites devra se faire par des approches différentes, puisqu'il semble que leur variabilité génétique puisse être assez distincte pour qu'ils soient traités différemment.

L'étude d'un plus grand nombre d'isolats provenant de la faune et des animaux de compagnie sera nécessaire afin d'estimer leur rôle dans la dissémination des parasites dans l'environnement. De plus, une étape de quantification, de même que l'étude de la viabilité des parasites, seront indispensables si l'estimation du risque pour les populations du bassin versant veut être établie. Enfin, afin d'augmenter les chances de pouvoir identifier adéquatement les parasites présents dans les matières fécales et dans l'eau, l'étude de plus d'un gène devra être prise en considération, de façon à confirmer quels génotypes sont réellement présents.

BIBLIOGRAPHIE

Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B.A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V. 2004. Complete genome sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 34: 441-445.

Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14(3): 447-475.

Adam, R.D. 2000. The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol* 30: 475-484.

Adam, R.D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev* 55(4): 706-732.

Amar, C.F.L., Dear, P.H., Pedraza-Diaz, S., Looker, N., Linnane, E., McLauchlin, J. 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol* 40(2): 446-452.

Atwill, E.R., Maldonado-Camargo, S., Phillips, R., Herrera-Alonso, L., Tate, K.W., Jensen, W.A., Bennet, J., Little, S., Salmon, T.P. 2001. Quantitative shedding of two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Appl Environ Microbiol* 67(6): 2840-2843.

Baishanbo, A., Gargala, G., Delaunay, A., François, A., Ballet, J.-J., Favennec, L. 2005. Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed mongolian gerbils. *Infect Immun* 73(8): 5252-5255.

Bajer, A., Cacciò, S., Bednarska, M., Behnke, J.M., Pieniazek, N.J., Sinski, E. 2003. Preliminary molecular characterization of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents from Poland. *J Parasitol* 89(5): 1053-1055.

Baker, D.A., Holberton, D.V., Marshall, J. 1988. Sequence of a giardin subunit cDNA from *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res* 16: 7177.

Barwick, R.S., Mohammed, H.O., White, M.E., Bryant, R.B. 2003. Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state. *Prev Vet Med* 59(1): 1-11.

Bednarska, M., Bajer, A., Kuliś, K., Siński, E. 2003. Biological characterisation of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Ann Agric Environ Med* 10: 163-169.

Betancourt, W.Q., Rose, J.B. 2004. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet Parasitol* 126: 219-234.

Bukhari, Z., McCuin, R.M., Fricker, C.R., Clancy, J.L. 1998. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl Environ Microbiol* 64(11): 4495-4499.

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

Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio, E. 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Appl Environ Microbiol* 69(6): 3393-3398.

Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E. 2002. Sequence analysis of the β -*giardin* gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* 32: 1023-1030.

Capelli, G., Paoletti, B., Iorio, R., Frangipane di Regalbano, A., Pietrobelli, M., Bianciardi, P., Giangaspero, A. 2003. Prevalence of *Giardia* spp. in dogs and humans in northern and central Italy. *Parasitology Res* 90: 154-155.

Chevalier, P., Levallois, P., Michel, P. 2004. Infections entériques d'origine hydrique potentiellement associées à la production animale : revue de littérature. *Vecteur Environnement* 37(2): 90-106.

Corso, P.S., Kramer, M.H., Blair, K.A., Addiss, D.G., Davis, J.P., Haddix, A.C. 2003. Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg Infect Dis* 9(4): 426-431.

Deng, M.Q., Cliver, D.O. 1999. Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. *Parasitol Res* 85: 733-736.

Deng, M.Q., Cliver, D.O., Mariam, T.W. 1997. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 63(8): 3134-3138.

deRegnier, D.P., Cole, L., Schupp, D.G., Erlandsen, S.L. 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Appl Environ Microbiol* 55(5): 1223-1229.

Dorner, S.M., Huck, P.M., Slawson, R.M. 2004. Estimating potential environmental loadings of *Cryptosporidium* spp. and *Campylobacter* spp. from livestock in the Grand River watershed, Ontario, Canada. *Environ Sci Technol* 38(12): 3370-3380.

Dunlap, B.G., Thies, M.L. 2002. *Giardia* in beaver (*Castor canadensis*) and nutria (*Myocastor coypus*) from East Texas. *J Parasitol* 88(6): 1254-1258.

Elwin, K., Chalmers, R.M., Roberts, R., Guy, E.C., Casemore, D.P. 2001. Modification of a rapid method for the identification of gene-specific polymorphisms in *Cryptosporidium parvum* and its application to clinical and epidemiological investigations. *Appl Environ Microbiol* 67(12): 5581-5584.

Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 126: 37-56.

Fayer, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lal, A.A., Dubey, J.P. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol* 87(6): 1415-1422.

Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 30: 1305-1322.

Ferrari, B.C., Veal, D. 2003. Analysis-only detection of *Giardia* by combining immunomagnetic separation and two-color flow cytometry. *Cytometry Part A* 51A: 79-86.

Gajadhar, A.A., Allen, J.R. 2004. Factors contributing to the public health and economic importance of waterborne zoonotic parasites. *Vet Parasitol* 126: 3-14.

Garcia, L.S., Shimizu, R.Y. 1997. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* 35(6): 1526-1529.

Ghosh, S., Debnath, A., Sil, A., De, S., Chattopadhyay, D.J., Das, P. 2000. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. *Mol Cell Probes* 14: 181-189.

Gobet, P., Toze, S. 2001. Sensitive genotyping of *Cryptosporidium parvum* by PCR-RFLP analysis of the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *FEMS Microbiol Lett* 200: 37-41.

Graczyk, T.K., Fayer, R., Knight, R., Mhangami-Ruwende, B., Trout, J.M., Da Silva, A.J., Pieniazek, N.J. 2000. Mechanical transport and transmission of *Cryptosporidium parvum* oocysts by wild filth flies. *Am J Trop Med Hyg* 63(3,4): 178-183.

Graczyk, T.K., Fayer, R., Trout, J.M., Lewis, E.J., Farley, C.A., Sulaiman, I., Lal, A.A. 1998. *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *Appl Environ Microbiol* 64(7): 2736-2738.

Groupe scientifique sur l'eau. 2003a. *Cryptosporidium*. Dans: Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine, Institut National de Santé Publique du Québec, 9 p.

Groupe scientifique sur l'eau. 2003b. *Giardia lamblia*. Dans: Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine, Institut National de Santé Publique du Québec, 9 p.

Guy, R.A., Payment, P., Krull, U.J., Horgen, P.A. 2003. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Appl Environ Microbiol* 69(9): 5178-5185.

Guyot, K., Follet-Dumoulin, A., Recourt, C., Lelièvre, E., Cailliez, J.C., Dei-Cas, E. 2002. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair DNA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *Appl Environ Microbiol* 68(4): 2071-2076.

Hallier-Soulier, S., Guillot, E. 2003. An immunomagnetic separation-reverse transcription polymerase chain reaction (IMS-RT-PCR) test for sensitive and rapid detection of viable waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Environ Microbiol* 5(7): 592-598.

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

Heitman, T.L., Frederick, L.M., Viste, J.R., Guselle, N.J., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., Olson, M.E. 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River basin in Alberta, Canada. *Can J Microbiol* 48(6): 530-541.

Heyworth, M.F., Foell, J.D., Sell, T.W. 1999. *Giardia muris*: evidence for a β -Giardin homologue. *Exp Parasitol* 91: 284-287.

Hlavsa, M.C., Watson, J.C., Beach, M.J. 2005. Cryptosporidiosis surveillance – United States 1999-2002. *MMWR* 54(SS01): 1-8.

Homan, W., van Gorkom, T., Kan, Y.Y., Hepener, J. 1999. Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis. *Parasitol Res* 85: 707-712.

Hopkins, R.M., Meloni, B.P., Groth, D.M., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C.A. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 83(1): 44-51.

Hsu, B.-M. 2003. Evaluation of analysing methods for *Giardia* and *Cryptosporidium* in a Taiwan water treatment plant. *J Parasitol* 89(2): 369-371.

Hughes-Hanks, J.M., Rickard, L.G., Panuska, C., Saucier, J.R., O'Hara, T.M., Dehn, L., Rolland, R.M. 2005. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in five marine mammal species. *J Parasitol* 91(5): 1225-1228.

Huot, M., Lamontagne, G., Goudeault, F. et als. 2002. Plan de gestion du cerf de Virginie 2002-2008. Société de la faune et des parcs du Québec, Direction du développement de la faune. Québec.

Jarroll, E.L., Bingham, A.K., Meyer, E.A. 1981. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Appl Environ Microbiol* 41(2): 483-487.

Jellison, K.L., Distel, D.L. Hemond, H.F., Schauer, D.B. 2004. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*) : evidence for five novel genotypes. *Appl Environ Microbiol* 70(1): 452-458.

Jiang, J., Xiao, L. 2003. An evaluation of molecular diagnostic tools for the detection and differentiation of human-pathogenic *Cryptosporidium* spp.. *J Eukaryot Microbiol* 50(6): 542-547.

Kassa, H., Harrington, B.J., Bisesi, M.S. 2004. Cryptosporidiosis: a brief literature review and update regarding *Cryptosporidium* in feces of Canada geese (*Branta canadensis*). *J Environ Health* 66(7): 34-39.

Kaucner, C., Stinear, T. 1998. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fibreglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 64(5): 1743-1749.

Kimbell III, L.M., Miller, D.L., Chavez, W., Altman, N. 1999. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium serpentis* in a wild-caught corn snake (*Elaphe guttata guttata*) and a five-species restriction fragment length polymorphism-based assay that can additionally discern *C. parvum* from *C. wrairi*. *Appl Environ Microbiol* 65(12): 5345-5349.

Kostrzynska, M., Sankey, M., Haack, E., Power, C., Aldom, J.E., Chagla, A.H., Unger, S., Palmateer, G., Lee, H., Trevors, J.T., De Grandis, S.A. 1999. Three sample preparation protocols for polymerase chain reaction based detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples. *J Microbiol Methods* 35: 65-71.

Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., Cacciò, S.M. 2005. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 35: 207-213.

Laxer, M.A., Timblin, B.K., Patel, R.J. 1991. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 45(6): 688-694.

LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Lee, R.G. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. *Appl Environ Microbiol* 57(9): 2610-2616.

Lowery, C.J., Moore, J.E., Millar, B.C., Burke, D.P., McCorry, K.A.J., Crothers, E., Dooley, J.S.G. 2000. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. *J Med Microbiol* 49(9): 779-785.

MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 331(3): 161-167.

Mahbubani, M.H., Schaefer III, F.W., Jones, D.D., Bej, A.K. 1998. Detection of *Giardia* in environmental waters by immuno-PCR amplification methods. *Current Microbiol* 36: 107-113.

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Perlin, M.H., Schaefer III, F.W., Jakubowski, W., Atlas, R.M. 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J Clin Microbiol* 30(1): 74-78.

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Perlin, M., Schaefer III, F.W., Jakubowski, W., Atlas, R.M. 1991. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. *Appl Environ Microbiol* 57(12): 3456-3461.

Majewska, A.C. 2004. Successful experimental infections of a human volunteer and mongolian gerbils with *Giardia* of animal origin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88(3): 360-362.

Majowicz, S.E., Michel, P., Aramini, J.J., McEwen, S.A., Wilson, J.B. 2001. Descriptive analysis of endemic cryptosporidiosis cases reported in Ontario, 1996-1997. *Can J Public Health* 92(1): 62-66.

Massanet-Nicolau, J. 2003. New method using sedimentation and immunomagnetic separation for isolation and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Appl Environ Microbiol* 69(11): 6758-6761.

Mayer, C.L., Palmer, C.J. 1996. Evaluation of PCR, nested-PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl Environ Microbiol* 62(6): 2081-2085.

McAllister, T.A., Olson, M.E., Fletch, A., Wetzstein, M., Entz, T. 2005. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. *Can Vet J* 46: 47-55.

McArthur, A.G., Morrison, H.G., Nixon, J.E.J., Passamaneck, N.Q.E., Kim, U., Hinkle, G., Crocker, M.K., Holder, M.E., Farr, R., Reich, C.I., Olsen, G.E., Aley, S.B., Adam, R.D., Gillin, F.D., Sogin, M.L. 2000. The *Giardia* genome project database. FEMS Microbiol Lett 189: 271-273.

McCuin, R.M., Clancy, J.L. 2003. Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. Appl Environ Microbiol 69(1): 267-674.

McCuin, R.M., Bukhari, Z., Sobrinho, J., Clancy, J.L. 2001. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. J Microbiol Methods 45(2): 69-76.

McGlade, T.R., Robertson, I.D., Elliot, C., Thompson, R.C.A. 2003a. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. Vet Parasitol 110: 197-205.

McGlade, T.R., Robertson, I.D., Elliot, A.D., Read, C., Thompson, R.C.A. 2003b. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. Vet Parasitol 117: 251-262.

McIntyre, L., Hoang, L., Ong, C.S.L., Lee, P., Isaac-Renton, J.L. 2000. Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak. J Parasitol 86(1): 172-177.

Miller, D.L., Liggett, A., Radi, Z.A., Branch, L.O. 2003. Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy. Vet Parasitol 115: 199-204.

Ministère de la Santé et des Services Sociaux du Québec (MSSS). 2005. Surveillance des maladies à déclaration obligatoire au Québec - rapport annuel 2002. Direction générale de la santé publique, Bureau de surveillance et de vigie sanitaire, Gouvernement du Québec. Accessible à www.msss.gouv.qc.ca .

Mofidi, A.A., Baribeau, H., Rochelle, P.A., De Leon, R., Coffey, B.M., Green, J.F. 2002. Inactivation de *Cryptosporidium parvum* à l'aide de rayonnement UV polychromatique. Vecteur Environnement 35(2): 44-59.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Mackrill, J., Kulda, J., Isaac-Renton, J.L., Ey, P.L. 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. Parasitology 116: 7-19.

Morgan, U.M. 2000. Detection and characterisation of parasites causing emerging zoonoses. Int J Parasitol 30: 1407-1421.

Morgan, U.M., Xiao, L., Monis, P., Fall, A., Irwin, P.J., Fayer, R., Denholm, K.M., Limor, J., Lal, A., Thompson, R.C.A. 2000. *Cryptosporidium* spp. in domestic dogs: the "dog" genotype. Appl Environ Microbiol 66(5): 2220-2223.

Morgan, U.M., Deplazes, P., Forbes, D.A., Spano, F., Hertzberg, H., Sargent, K.D., Elliot, A., Thompson, R.C.A. 1999. Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. Parasitology 118: 49-58.

Morgan, U.M., Constantine, C.C., Forbes, D.A., Thompson, R.C.A. 1997. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. J Parasitol 83(5): 825-830.

Moss, D.M., Mathews, H.M., Visvesvara, G.S., Dickerson, J.W., Walker, E.M. 1990. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in the feces of mongolian gerbils. J Clin Microbiol 28(2): 254-257.

Naumova, E.N., Egorov, A.I., Morris, R.D., Griffiths, J.K. 2003. The elderly and waterborne *Cryptosporidium* infection: gastroenteritis hospitalizations before and during the 1993 Milwaukee outbreak. Emerg Infect Dis 9(4): 418-425.

O'Handley, R.M., Olson, M.E., Fraser, D., Adams, P., Thompson, R.C.A. 2000. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from western Australia and western Canada. *Vet Parasitol* 90: 193-200.

O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W., Olson, M.E. 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 214(3): 391-396.

Olson, M.E., Guselle, N.J., O'Handley, R.M., Swift, M.L., McAllister, T.A., Jelinski, M.D., Morck, D.W. 1997a. *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Can Vet J* 38: 703-706.

Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., McAllister, T.A. 1997b. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Canadian farm animals. *Vet Parasitol* 68: 375-381.

Ong, C., Moorehead, W., Ross, A., Isaac-Renton, J. 1996. Studies of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in two adjacent watersheds. *Appl Environ Microbiol* 62(8): 2798-2805.

Ongerth, J.E., Hunter, G.D., DeWalle, F.B. 1995. Watershed use and *Giarcia* cyst presence. *Water Res* 29(5): 1295-1299.

Payment, P., Gehr, R. 2004. Impact de la désinfection des eaux traitées de la Station d'épuration de la Ville de Montréal sur la qualité de eaux à vocation récréative en aval du rejet. *Vecteur Environnement* 37(1): 54-64.

Payment, P., Berte, A., Prévost, M., Ménard, B., Barbeau, B. 2000. Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Can J Microbiol* 46: 565-576.

- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Nichols, G.L., McLauchlin, J.** 2001. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene. *Emerg Infect Dis* 7(1): 49-56.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A.M., Stanley, P.J., McLauchlin, J.** 2000. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces : first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. *J Med Microbiol* 50 (3): 293.
- Peng, M.M., Wilson, M.L., Holland, R.E., Meshnick, S.R., Lal, A.A., Xiao, L.** 2003. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in cattle in Michigan : implications for understanding the transmission dynamics. *Parasitol Res* 90: 175-180.
- Power, M.L., Shanker, S.R., Sangster, N.C., Veal, D.A.** 2003. Evaluation of a combined immunomagnetic separation/flow cytometry technique for epidemiological investigations of *Cryptosporidium* in domestic and Australian native animals. *Vet Parasitol* 112: 21-31.
- Puiu, D., Enomoto, S., Buck, G.A., Abrahamsen, M.S., Kissinger, J.C.** 2004. CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. *Nucleic Acids Res* 32: 329-331.
- Ranucci, L., Müller, H., La Rosa, G., Reckmann, I., Gomez Morales, M.A., Spano, F., Pozio, E., Crisanti, A.** 1993. Characterization and immunolocalization of a *Cryptosporidium* protein containing repeated amino acid motifs. *Infect Immun* 61(6): 2347-2356.
- Rickard, L.G., Siefker, C., Boyle, C.R., Gentz, E.J.** 1999. The prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in fecal samples from free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in the southeastern United States . *J Vet Diagn Invest* 11(1): 65-72.

- Rimhanen-Finne, R., Hörman, A., Ronkainen, P., Hänninen, M.-L.** 2002. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. *J Microbiol Methods* 50: 299-303.
- Rimhanen-Finne, R., Ronkainen, P., Hänninen, M.-L.** 2001. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. *J Appl Microbiol* 91: 1030-1035.
- Robertson, L.J., Greig, J.D., Gjerde, B., Fazil, A.** 2005. The potential for acquiring cryptosporidiosis or giardiasis from consumption of mung bean sprouts in Norway : a preliminary step-wise risk assessment. *Int J Food Microbiol* 98: 291-300.
- Robertson, I.D., Irwin, P.J., Lymbery, A.J., Thompson, R.C.A.** 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1369-1377.
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V.** 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol* 58(11): 3494-3500.
- Rocha, M.O., Gomes, M.A., Costa, A.O., Furst, C., Silva, E.F.** 2003. Molecular characterization of Brazilian human *Giardia duodenalis* isolates using isoenzyme and random amplified polymorphic DNA analysis. *Diag Microbiol Infect Dis* 46: 273-278.
- Rochelle, P.A., De Leon, R., Stewart, M.H., Wolfe, R.L.** 1997. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl Environ Microbiol* 63(1): 106-114.

Rosoff, J.D., Sanders, C.A., Sonnad, S.S., De Lay, P.R., Hadley, W.K., Vincenzi, F.F., Yajko, D.M., O'Hanley, P.D. 1989. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65). *J Clin Microbiol* 27(9): 1997-2002.

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

Ryan, U.M., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, J.R., Robertson, I.D., Thompson, R.C.A. 2003. Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl Environ Microbiol* 69(7): 3970-3974.

Santé Canada. 2004. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Documentation à l'appui – Les protozoaires : la *Giardia* et le *Cryptosporidium*. Bureau de la qualité de l'eau et de la santé, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario).

Santín, M., Dixon, B.R., Fayer, R. 2005. Genetic characterization of *Cryptosporidium* isolates from ringed seals (*Phoca hispida*) in Northern Quebec, Canada. *J Parasitol* 91(3) : 712-716.

Sargent, K.D., Morgan, U.M., Elliot, A., Thompson, R.C.A. 1998. Morphological and genetic characterisation of *Cryptosporidium* oocysts from domestic cats. *Vet Parasitol* 77: 221-227.

Schijven, J.F., Bradford, S.A., Yang, S. 2004. Release of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy cattle manure : physical factors. *J Environ Qual* 33: 1499-1508.

- Schuster C.J., Ellis, A.G., Robertson, W.J., Charron, D.F., Aramini, J.J., Marshall, B.J., Medeiros, D.T.** 2005. Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada, 1974-2001. *Can J Public Health* 96(4): 254-258.
- Scorza, A.V., Brewer, M.M., Lappin, M.R.** 2003. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. *J Parasitol* 89(2): 423-426.
- Slifco, T.R., Friedman, D.E., Rose, J.B., Upton, S.J., Jakubowski, W.** 1997. Unique cultural methods used to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental samples. *Water Sci Technol* 35(11): 363-368.
- Smith, H.V., Rose, J.B.** 1998. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol Today* 14(1): 14-22.
- Smith, H.V.** 1992. *Cryptosporidium* and water: a review. *J Institution Water Environ Management* 6(4): 443-451.
- Spano, F., Putignani, L., Crisanti, A., Sallicandro, P., Morgan, U.M., Le Blancq, S.M., Tchack, L., Tzipori, S., Widmer, G.** 1998. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from different hosts and geographical origins. *J Clin Microbiol* 36(11): 3255-3259.
- Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P., Crisanti, A.** 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol Lett* 150: 209-217.
- Sturbaum, G.D., Reed, C., Hoover, P.J., Jost, B.H., Marshall, M.M., Sterling, C.R.** 2001. Species-specific, nested PCR-restriction fragment length polymorphism detection of single *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 67(6): 2665-2668.

Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M., Das, P., Lal, A.A., Xiao, L. 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9(11): 1444-1452.

Sulaiman, I.M., Xiao, L., Lal, A.A. 1999. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Appl Environ Microbiol* 65(10): 4431-4435.

Sulaiman, I.M., Xiao, L., Yang, C., Escalante, L., Moore, A., Beard, C.B., Arrowood, M.J., Lal, A.A. 1998. Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg Infect Dis* 4(4): 681-685.

Taylor, M.A., Webster, K.A. 1998. Recent advances in the diagnosis in livestock of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Giardia* and other protozoa of veterinary importance. *Res Vet Sci* 65: 183-193.

Thompson, R.C.A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 126: 15-35.

Thompson, R.C.A. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 30: 1259-1267.

Traub, R.J., Monis, P.T., Robertson, I., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C.A. 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same locality. *Parasitology* 128: 253-262.

Trout, J.M., Santin, M., Fayer, R. 2003. Identification of Assemblage A *Giardia* in white-tailed deer. *J Parasitol* 89(6): 1254-1255.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Office of Water. EPA 815-R-05-002. Accessible à <http://www.epa.gov/microbes/> .

van Keulen, H., Macechko, P.T., Wade, S., Schaaf, S., Wallis, P.M., Erlandsen, S.L. 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol* 108: 97-107.

Verweij, J.J., Blangé, R.A., Templeton, K., Schinkel, J., Brienen, E.A.T., van Rooyen, M.A.A., van Lieshout, L., Polderman, A.M. 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 42(3): 1220-1223.

Verweij, J.J., Schinkel, J., Laeijendecker, van Rooyen, M.A.A., van Lieshout, L., D., Polderman, A.M. 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol Cell Probes* 17: 223-225.

Villeneuve, A. 2003. Les zoonoses parasitaires: l'infection chez les animaux et chez l'homme. Les Presses de l'Université de Montréal. p. 499.

Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L. 2000. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet Parasitol* 93: 1-11.

Walker, M.J. 1998. Source water assessment and nonpoint sources of acutely toxic contaminants: a review of research related to survival and transport of *Cryptosporidium parvum*. *Water Resources Research* 34(12): 3383-3392.

Wallis, P.M., Erlandsen, S.L., Isaac-Renton, J.L., Olson, M.E., Robertson, W.J., van Keulen, H. 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. *Appl Environ Microbiol* 62(8): 2789-2797.

Weiss, J.B., van Keulen, H., Nash, T.E. 1992. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. *Mol Biol Evol* 54: 73-86.

Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R.H., Lal, A.A. 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 183: 492-497.

Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J., Royer, M., Lal, A.A. 2000a. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Appl Environ Microbiol* 66(12): 5492-5498.

Xiao, L., Limor, J., Morgan, U.M., Sulaiman, I.M., Thompson, R.C.A., Lal, A.A. 2000b. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Appl Environ Microbiol* 66(12): 5499-5502.

Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C.A., Fayer, R., Lal, A.A. 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol* 65(8): 3386-3391.

Xiao, L., Herd, R.P., Bowman, G.L. 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. *Vet Parasitol* 52: 331-336.

Xiao, L., Herd, R.P. 1993. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J Clin Microbiol* 31(11): 2944-2946.

Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R., Dear, P.H., Bankier, A.T., Peterson, D.L., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G.A. 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 431: 1107-1112.

Yakub, G.P., Stadterman-Knauer, K.L. 2000. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. *Appl Environ Microbiol* 66(8): 3628-3631.

Yee, J., Dennis, P.P. 1992. Isolation and characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 267(11): 7539-7544.

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

Zhu, L., Ang, S., Liu, W.-T. 2004. Quantum dots as a novel immunofluorescent detection system for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. *Appl Environ Microbiol* 70(1): 597-598.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Mylène Généreux		
M.Sc.	Sciences vétérinaires	microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Mylène Généreux, Caroline Côté, Kathie Roseberry, Sylvain Quessy	
<i>Detection AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Cryptosporidium spp. AND Giardia spp isolates FROM VARIOUS ANIMALS IN TWO WATERSHEDS.</i>	
Applied and Environmental Microbiology	

DÉCLARATION DES COAUTEURS

<p>À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que Mylène Généreux inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : <i>Détection et caractérisation d'isolats de Cryptosporidium spp. et de Giardia spp. provenant de différents types d'élevages et de la faune d'un bassin versant agricole.</i></p>		
Sylvain Quessy		14/08/06
Caroline Côté		14/08/06
Kathie Roseberry		14-08-06