

2m11. 2465. 10

**Université de Montréal**

**Pathogénie et transmission de *Giardia* et de *Cryptosporidium*  
chez le veau et prévalence de *Giardia* au Québec**

par

**Nicole RUEST**

Département de sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

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

**AVRIL, 1996**

© Nicole RUEST, 1996



SF

607

U54

1996

V.007

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé:**

**Pathogénie et transmission de *Giardia* et de *Cryptosporidium*  
chez le veau et prévalence de *Giardia* au Québec**

**présenté par:**

**Nicole RUEST**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:**

<b>Président-rapporteur:</b>	<b>Dr. Alain Villeneuve</b>
<b>Directeur de recherche:</b>	<b>Dr. Yvon Couture</b>
<b>Codirecteur de recherche:</b>	<b>Dr. Gaetan M. Faubert</b>
<b>Membre du jury:</b>	<b>Dr. Serge Messier</b>

**Mémoire accepté le: 09 OCT 1996**

## SOMMAIRE

Le but de cette étude consistait à évaluer la pathogénèse de *Giardia* sp. chez des veaux exempts d'agents entéropathogènes. De plus, d'étudier la prévalence de l'infection dans toutes les régions du Québec. Cinquante troupeaux par région agricole furent évalués. L'hypothèse de travail était que *Giardia* sp. a le potentiel, tout comme chez l'homme, de causer des signes cliniques et des lésions intestinales.

Pour vérifier cette hypothèse, 40 veaux furent achetés à l'encan et leur statut parasitaire évalué. Trois d'entre-eux étaient porteurs de *Giardia* sp. et deux de *Cryptosporidium* sp.. Ces veaux infectés de façon naturelle furent utilisés comme source d'infection pour les autres animaux. Des prélèvements répétés de fèces chez les veaux ont permis de les diviser en quatre groupes soit: Giardia, Giardia-Crypto, Crypto et un groupe Témoin.

Huit veaux infectés à *Giardia* sp. furent utilisés pour étudier la courbe d'excrétion des kystes. Deux types d'excrétions furent observés soit l'une constante et l'autre intermittente. Les autres veaux furent envoyés à l'abattoir à intervalles réguliers et la caillette, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, le caecum et le côlon furent prélevés sur chacun d'eux. Un examen histopathologique fut effectué sur toutes ces pièces et une attention particulière fut portée au ratio villosité-crypte (RVC) au niveau du jéjunum. Le degré d'inflammation fut déterminé par le nombre de lymphocytes intraépithéliaux présents par millimètre de surface épithéliale (LIE/mm). Les résultats indiquent qu'il y a une différence significative entre le RVC des veaux des groupes Giardia, Giardia-Crypto et Témoin. Cependant, *Cryptosporidium* sp. ne semble pas jouer un rôle significatif dans l'avènement des lésions. Une différence significative est aussi observée entre le LIE des groupes Giardia, Crypto et Témoin. Les résultats obtenus semblent donc indiquer que les trophozoïtes de *Giardia* sp. peuvent générer un degré de pathologie chez le veau au niveau du jéjunum et selon

l'étude de prévalence, son importance n'est plus mise en doute car il est présent partout au Québec et de façon notable. Des 505 fermes échantillonnées et vérifiées pour la présence de *Giardia* spp., 231 (45.7%) se sont avérées infectées. Aucun lien n'a pu être établi cependant entre la présence du protozoaire et les critères étudiés qui étaient le nombre de veaux sur la ferme, le type de plancher et la sévérité de la diarrhée dans le troupeau.

# TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
SOMMAIRE .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	xii
REMERCIEMENTS .....	xiv
INTRODUCTION .....	1
REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	2
I. La giardiose .....	2
1- Historique .....	2
2- Morphologie .....	2
3- Taxonomie et génétique .....	4
4- Cycle de développement .....	5
4.1- Phase trophique et de reproduction .....	5
4.2- Phase d'enkystement .....	6
5- Culture <i>in vitro</i> .....	6
5.1- Forme végétative .....	6
5.2- Forme infectieuse .....	8

6- Épidémiologie . . . . .	8
6.1- Humain . . . . .	8
6.1.1- Incidence . . . . .	8
6.1.2- Source de contamination . . . . .	8
6.2- Animaux domestiques . . . . .	9
6.2.1- Incidence . . . . .	9
6.2.2- Source de contamination . . . . .	9
6.2.3- Rôle des femelles adultes . . . . .	10
7- Manifestation clinique . . . . .	10
7.1- Chez l'homme . . . . .	10
7.2- Chez le bovin . . . . .	11
8- Pathogénie . . . . .	11
8.1- Lésions intestinales et malabsorption . . . . .	11
8.2- Exotoxine et lectine . . . . .	12
8.3- Réponse immunitaire . . . . .	13
9- Immunologie . . . . .	13
9.1- Immunité humorale . . . . .	13
9.2- Immunité cellulaire . . . . .	14
9.3- Antigènes . . . . .	15
10- Mécanismes non-immuns . . . . .	16
11- Diagnostic . . . . .	17
11.1- Méthodes traditionnelles . . . . .	17
11.2- Méthodes immunologiques . . . . .	18
11.2.1- Anticorps circulants . . . . .	18
11.2.2- Antigènes dans les selles . . . . .	19
12- Pharmacothérapie . . . . .	21
12.1- Quinacrine . . . . .	21

12.2- Métronidazole, dimétridazole et tinidazole . . . . .	21
12.3- Furazolidone . . . . .	21
12.4- Paromomycine . . . . .	22
12.5- Albendazole . . . . .	22
12.6- Salinomycine . . . . .	22
12.7- Posologie . . . . .	23
13- Prévention . . . . .	23
13.1- Vaccin . . . . .	23
13.2- La qualité de l'eau et la nourriture . . . . .	23
13.3- Les animaux . . . . .	24
II- La cryptosporidiose . . . . .	27
1- Historique . . . . .	27
2- Taxonomie . . . . .	27
3- Cycle de développement . . . . .	27
4- Morphologie . . . . .	29
5- Manifestation clinique . . . . .	29
6- Pathogénie . . . . .	32
7- Immunologie . . . . .	33
8- Épidémiologie . . . . .	34
8.1- Prévalence . . . . .	34
8.2- Âge . . . . .	34
8.3- Saison . . . . .	34
8.4- Mode de transmission . . . . .	36
8.5- Sources de l'infection . . . . .	36
8.6- Infections concomitantes . . . . .	37
9- Diagnostic . . . . .	37



10- Traitements . . . . .	38
11-Prévention . . . . .	38
11.1- Vaccin . . . . .	38
11.2- Désinfection de l'environnement . . . . .	41
11.3- Mesures préventives . . . . .	41
 CHAPITRE 1.      Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with <i>Giardia</i> spp. and <i>Cryptosporidium</i> spp. . . . .	 42
 CHAPITRE 2.      Rapid spreading of giardiosis and cryptosporidiosis in calves housed in individual pens . . . . .	 59
 CHAPITRE 3.      Prevalence and geographical distribution of <i>Giardia</i> sp. in bovine dairy farms in Québec . . . . .	 74
 DISCUSSION . . . . .	 83
1- Pathologie intestinale . . . . .	.83
2- Nature infectieuse de <i>Giardia</i> sp. et de <i>Cryptosporidium</i> sp. . . . .	84
3- Prévalence de <i>Giardia</i> sp. dans les troupeaux de bovins laitiers du Québec. . . . .	.86
 CONCLUSION . . . . .	 88
 BIBLIOGRAPHIE . . . . .	 88

# LISTE DES TABLEAUX

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

### I. La giardiose

Tableau I.	Posologie chez l'humain . . . . .	25
Tableau II.	Posologie chez les animaux domestiques . . . . .	26

### II- La cryptosporidiose

Tableau I.	Études de prévalence de <i>Cryptosporidium</i> sp. chez le bovin . . . . .	35
Tableau II.	Liste des médicaments utilisés contre les infections à <i>Cryptosporidium</i> sp. . . . .	39

## CHAPITRE 2

Table 1.	Incidence and intensity of diarrhea in calves infected with <i>Giardia</i> sp. . . . .	73
----------	---	----

## CHAPITRE 3

Table 1.	Mean number of calves, presence of diarrhea and type of floor used in <i>Giardia</i> positive farms and negative farms. . . . .	82
----------	--	----

# LISTE DES FIGURES

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 1- La giardiose

Figure 1.	Description morphologique d'un trophozoïte et d'un kyste . . . . .	3
Figure 2.	Schéma des 3 types morphologiques de <i>Giardia</i> . . . . .	4
Figure 3.	Cycle de vie de <i>Giardia duodenalis</i> chez l'humain . . . . .	7

### 2- La cryptosporidiose

Figure 1.	Cycle de vie de <i>Cryptosporidium</i> . . . . .	28
Figure 2.	Morphologie de <i>Cryptosporidium</i> sp. à différents stades de développement. . . . .	30
Figure 3.	Microscopie à transmission électronique d'un microgamète et d'un macrogamète de <i>Cryptosporidium</i> sp.. . . . .	31

## CHAPITRE 1

Figure 1.	Cross-section of the proximal jejunum of a calf infected with <i>Giardia</i> . . . . .	55
Figure 2.	Cross-section of the proximal jejunum of a calf used as a control . . . . .	56
Figure 3.	Number of IEL in jejunum of calves. . . . .	57
Figure 4.	Villus to crypt ratio in jejunum of calves. . . . .	58

**CHAPITRE 2**

Figure 1. Spreading of giardiosis amongst 35 calves housed in individual pens 70

Figure 2. Spreading of cryptosporidiosis amongst 35 calves housed in individual pens . . . . . 71

Figure 3. Patterns of *Giardia* cyst release in eight calves infected naturally . . 72

**CHAPITRE 3**

Figure 1. Prevalence and geographical distribution of *Giardia* in dairy farms in the province of Québec. . . . . 81

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
BVD	Bovine viral diarrhea
°C	Degré Celsius; degree Celsius
CI	Confidence interval
CIE	Contre-immunoelectrophorèse
cm	Centimeter
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
g	Gramme; gram
HPS	Haematoxylin, phloxin, saffron
IEL	Intraepithelial lymphocyte
IEL/mm	Intraepithelial lymphocyte per millimeter
IFD	Immunofluorescence directe
IFI	Immunofluorescence indirecte
j	Jours
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramme; kilogram
LIE/mm	Nombre de lymphocytes intraépithéliaux par millimètre
log	Logarithms
mg	Milligramme; milligram
mg/kg	Milligrams per kilogram
mL	Millilitre; milliliter
n	Sample number

No.	Number
OR	Odd ratio
rpm	Rotation per minute
RVC	Ratio villosité-crypte
SAF	Sodium acetate, acetic acid, formaldehyde
S.D.	Standard deviation
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
TEM	Microscopie électronique à transmission
$\mu\text{g}$	Microgramme
$\mu\text{m}$	Micromètre; micrometer
VCR	Villus to crypt ratio
X g	Centrifugal force
ZSCT	Technique de concentration au sulfate de zinc

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le "Fonds du centenaire" de la faculté de médecine vétérinaire qui, par sa généreuse contribution, m'a permis de réaliser cette maîtrise.

Je remercie également toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à ce projet:

- Dr Yvon Couture pour sa collaboration scientifique, ses conseils et sa grande disponibilité.
- Dr Gaétan M. Faubert pour sa collaboration scientifique et ses pertinents conseils concernant la rédaction des articles et du mémoire.
- Dre Christiane Girard pour sa précieuse collaboration dans le domaine de la pathologie et ses conseils.
- Dr Alain Villeneuve pour m'avoir accueillie et permis de travailler dans son laboratoire de diagnostic.
- Les vétérinaires et employés des nombreuses cliniques qui ont si gentiment collaboré à la récolte des échantillons pour l'étude de prévalence.
- Mme Francine Lavoie et Mme Murielle Cordeau pour leur aide technique.
- Dre Béatrice Doizé pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire de recherche.
- Les animaliers; Paul, Claude, Robert et Gilles pour leur aide technique.
- Normand, ma famille et mes amis, pour leurs nombreux encouragements.

Merci à vous tous !

## INTRODUCTION

*Giardia* sp. est un protozoaire de l'intestin grêle rencontré chez tous les mammifères, y compris l'homme. Observé pour la première fois en 1681 par van Leuwenhoek, il est l'un des plus anciens protozoaires connus. Depuis environ 15 ans, il suscite beaucoup d'intérêt quant à son pouvoir pathogène et comme agent de contamination de l'eau potable. En médecine humaine, la giardiose est responsable de la parasitose intestinale la plus souvent diagnostiquée; on associe sa présence à des signes cliniques et à des changements pathologiques du petit intestin tels que l'atrophie des villosités et l'infiltration cellulaire de la muqueuse et de la sous-muqueuse.

Chez l'espèce bovine, la présence de *Giardia* sp. est reconnue depuis plus de 70 ans et les études de prévalence semblent indiquer qu'il est présent dans plusieurs troupeaux un peu partout à travers le monde. Cependant, son caractère pathogène n'a pas fait l'objet d'études chez le bovin et il n'est pas clairement établi que sa présence puisse être responsable de lésions comme c'est le cas chez l'homme. Ce protozoaire fut à l'occasion impliqué comme cause de diarrhée et de retard de croissance chez le veau. Toutefois, dans ces études, la présence d'agents infectieux autres que *Giardia* sp. n'est pas spécifiée. Il est donc difficile d'associer les signes cliniques observés au protozoaire.

Le présent travail a pour but de vérifier si *Giardia* sp. est réellement pathogène chez le bovin. Les questions auxquelles nous tenterons de répondre sont les suivantes: "*Giardia* sp. cause-t-il des lésions intestinales chez le bovin?"; "Les veaux infectés présentent-ils des signes cliniques?"; "Quel est le schéma d'excrétion de *Giardia* sp. chez cette espèce?" Et finalement, "Quelle est la prévalence de ce protozoaire dans les troupeaux de bovins laitiers du Québec?"



# REVUE DE LA LITTÉRATURE

## I. La giardiose

### 1- HISTORIQUE

Le protozoaire *Giardia* spp. fut décrit pour la première fois en 1681 par von Leuwenhoek. C'est en examinant ses propres selles au microscope qu'il fit la découverte de ce petit protozoaire flagellé (57). Par la suite, les travaux de Lambl en 1859 ont permis la caractérisation morphologique du trophozoïte. Le nom *Giardia lamblia* fut donné à l'espèce des giardies isolées chez les humains pour souligner les recherches de Lambl (126). Depuis sa découverte, ce parasite fut isolé chez plus de 40 espèces animales, dont le bovin en 1921 (64,222). Classifié dans le phylum Sarcomastigophora et dans l'ordre des Diplomonadida, il est le protozoaire le plus évolué de la famille des Hexamitidae (131). De plus, la séquence de la petite sous-unité de l'acide ribonucléique ribosomal (16S like-ARNr) démontre que *Giardia* sp. est probablement l'eucaryote le plus primitif (115,214).

### 2- MORPHOLOGIE

*Giardia* spp. a deux formes morphologiques distinctes selon son stade de développement (Fig.1). Le trophozoïte représente la forme végétative du parasite et le kyste représente la forme infectieuse. Le trophozoïte a l'aspect d'une poire coupée en deux; sa surface dorsale est convexe et sa surface ventrale est concave. Ses dimensions sont variables; il mesure entre 10 et 15  $\mu\text{m}$  de long et entre 6 et 10  $\mu\text{m}$  de large. Le trophozoïte est symétrique bilatéralement et un disque adhésif est présent sur sa surface ventrale. Cette structure qui le distingue des autres protozoaires flagellés lui permet de s'accoler à la paroi intestinale de son hôte. Le disque est composé de protéines spécifiques à *Giardia* spp. appelées "giardines" qui, elles, jouent un rôle majeur dans la fonction de ce disque (47,180). La forme végétative est également munie de quatre paires de flagelles qui lui permettent de

se mouvoir. Les structures internes des trophozoïtes sont composées de noyaux à caryosome central, d'un appareil de Golgi et des vacuoles périphériques qui constituent son système endosomal-lysosomal, mais il est déficient en peroxyosomes, en glycosomes et en hydrogènesomes (82,115,118,194). De plus, les mitochondries sont absentes. Ceci explique l'utilisation de la voie Embden-Meyerhof pour produire l'énergie nécessaire à sa survie (135). Enfin, *Giardia* spp. est munie d'une structure qui lui est unique, une paire de corps médians de fonction toujours inconnue. Cette structure a permis à Filice de classer le genre en trois groupes spécifiques; soit *Giardia agilis* chez les batraciens et poissons, *Giardia muris* chez les rongeurs et *Giardia intestinalis* chez les mammifères autres que les rongeurs incluant l'homme (Fig.2) (78).

Le kyste, lui, est légèrement plus petit et de forme ovale. Il mesure entre 8 et 12  $\mu\text{m}$  de long et entre 7 et 10  $\mu\text{m}$  de large. Il est dépourvu d'organes de locomotion. Le kyste contient généralement deux trophozoïtes et offre une protection contre les conditions défavorables du milieu.

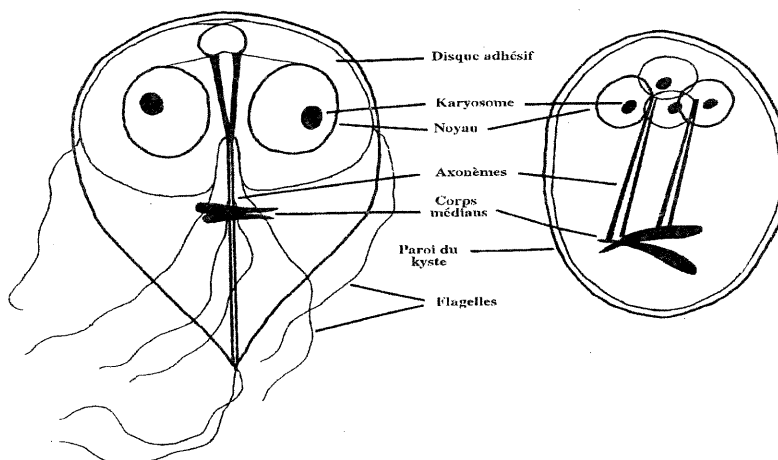


Figure 1. Description morphologique d'un trophozoïte (à gauche) et d'un kyste de *Giardia* (à droite) (78).

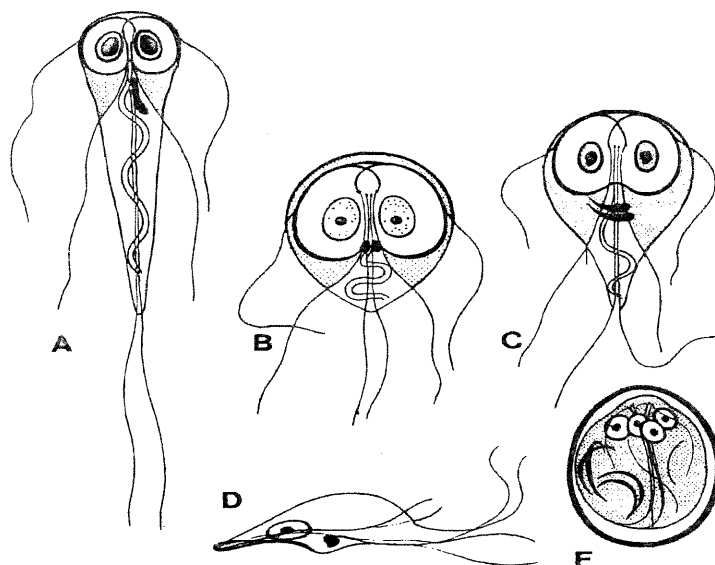


Figure 2. Schéma des 3 types morphologiques de *Giardia* reconnus par Filice. (A-C) Vue ventrale des trophozoïtes de *G. agilis* (A), *G. muris* (B) et de *G. duodenalis* (C). (D) Vue latérale d'un trophozoïte de *G. duodenalis* et (E) d'un kyste (125).

### 3- TAXONOMIE ET GÉNÉTIQUE

Aux types morphologiques de Filice, on a ajouté récemment deux autres groupes soit *Giardia psittaci* et *Giardia ardeae* (60,62). Grâce à de nouvelles technologies, l'électrophorèse des caryotypes, l'analyse de l'ARNr et l'usage de sonde à ADN, il a été possible de vérifier la validité de ces deux groupes ainsi que les groupes proposés par Filice (36,140,233,234). De plus, ces nouvelles technologies ont permis de constater qu'il existe des variations génétiques considérables à l'intérieur du groupe *duodenalis*; il y aurait donc plusieurs souches distinctes à l'intérieur de ce groupe. Aucune évidence ne laisse entrevoir cependant que ces différentes souches sont associées à des hôtes spécifiques ou que leur morphologie diffère (11,148,149,150). Selon une étude portant sur l'analyse d'isoenzymes, les phénomènes de mutation et de sélection clonale seraient les mécanismes responsables du maintien de cette diversité génétique (224). Certains chercheurs ont même

proposé l'existence d'une phase sexuelle à l'intérieur du cycle de développement de *Giardia*. C'est durant cette phase que s'effectuerait le transfert génétique d'une génération à l'autre (148,149). D'autres études sont nécessaires toutefois pour vérifier cette hypothèse.

#### **4- CYCLE DE DÉVELOPPEMENT**

Le cycle de développement de *Giardia* spp. est de type direct, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'hôte intermédiaire (Fig.3). La transmission du protozoaire se fait habituellement par la voie féco-orale (174). L'eau est la source principale de contamination lors d'infection endémique chez l'homme. Toutefois, la nourriture souillée par les excréments peut aussi jouer un rôle (16,173,182). La transmission vénérienne chez les homosexuels mâles est courante (181,183). L'infection est courante également chez les jeunes enfants qui fréquentent les garderies. Dans ce milieu, l'infection se propage par le partage de la nourriture et les jouets contaminés. Le personnel porteur de l'infection peut être aussi une source de contamination pour les enfants (28). Chez l'humain, on considère que dix kystes ou seulement un simple trophozoïte peuvent initier l'infection (55,195). Une fois ingéré, le désenkystement a lieu dans le duodénum. Ce phénomène semble être initié par le pH acide de l'estomac, quoique *in vitro*, il est possible de reproduire le désenkystement à pH plus élevé (31,75).

##### **4.1- Phase trophique et de reproduction**

Chaque kyste libère au moins deux trophozoïtes. Rapidement, ceux-ci se scindent en deux pour former quatre trophozoïtes binucléés qui s'attachent aux microvillosités de l'épithélium de l'intestin grêle. Cet attachement à la paroi intestinale est surtout possible grâce au processus mécanique relié à la contractilité des protéines du disque ventral (59). Les trophozoïtes absorbent leurs nutriments par pinocytose à travers leur membrane dorsale. Grâce à leurs quatre paires de flagelles, ils peuvent se déplacer (125). Les périodes de détachement sont cependant de courte durée afin d'empêcher que le parasite

ne soit entraîné par le mouvement péristaltique de l'intestin (175,223). Leur reproduction est asexuée; ils se multiplient par fission binaire et le temps de régénération est variable selon les différentes souches de *duodenalis* ainsi que le statut immunitaire et nutritionnel de l'hôte (26).

#### **4.2- Phase d'enkystement**

L'enkystement se fait dans la partie distale du petit intestin et semble être initié par la présence de sels biliaires (81). La formation de la paroi du kyste est complétée en 44 à 70 heures *in vitro* (194). Une division nucléaire se produit à l'intérieur du kyste avant ou après formation de la paroi, ce qui résulte en un kyste à quatre noyaux (151). Les kystes immobiles produits sont excrétés de façon passive avec les selles. Ceux-ci peuvent survivre quelques mois dans l'environnement lorsque les conditions de température et d'humidité leur sont adéquates (152). Les trophozoïtes peuvent également être excrétés à l'extérieur de l'hôte mais seulement lors de la phase aiguë et leur temps de survie est très limité dans l'environnement (152). Ils ne sont donc pas une cause de contamination importante mais sont à considérer lors de transmission directe entre individus (Fig.3)..

### **5- CULTURE IN VITRO**

#### **5.1- Forme végétative**

Depuis 1970, la culture axénique de plusieurs isolats de *duodenalis* fut réalisée. Toutefois, il n'y a dans la littérature qu'une étude sur la culture axénique de *G. muris* et *G. ardeae* respectivement (62,88). Le milieu utilisé pour la culture de *Giardia duodenalis* est le TYI-S-33 composé de sérum bovin, de sels biliaires, de caséine digérée, d'extraits de levure, de cystéine, de dextrose, d'ammonium ferrique, de citrate et d'acide ascorbique (119). Des antibiotiques sont aussi rajoutés afin de prévenir les contaminations bactériennes et fongiques. Les trophozoïtes survivent mieux dans des conditions où la tension en oxygène est faible. La cystéine est alors ajoutée au milieu de culture afin de réduire les radicaux O<sub>2</sub> qui sont toxiques aux trophozoïtes (80).

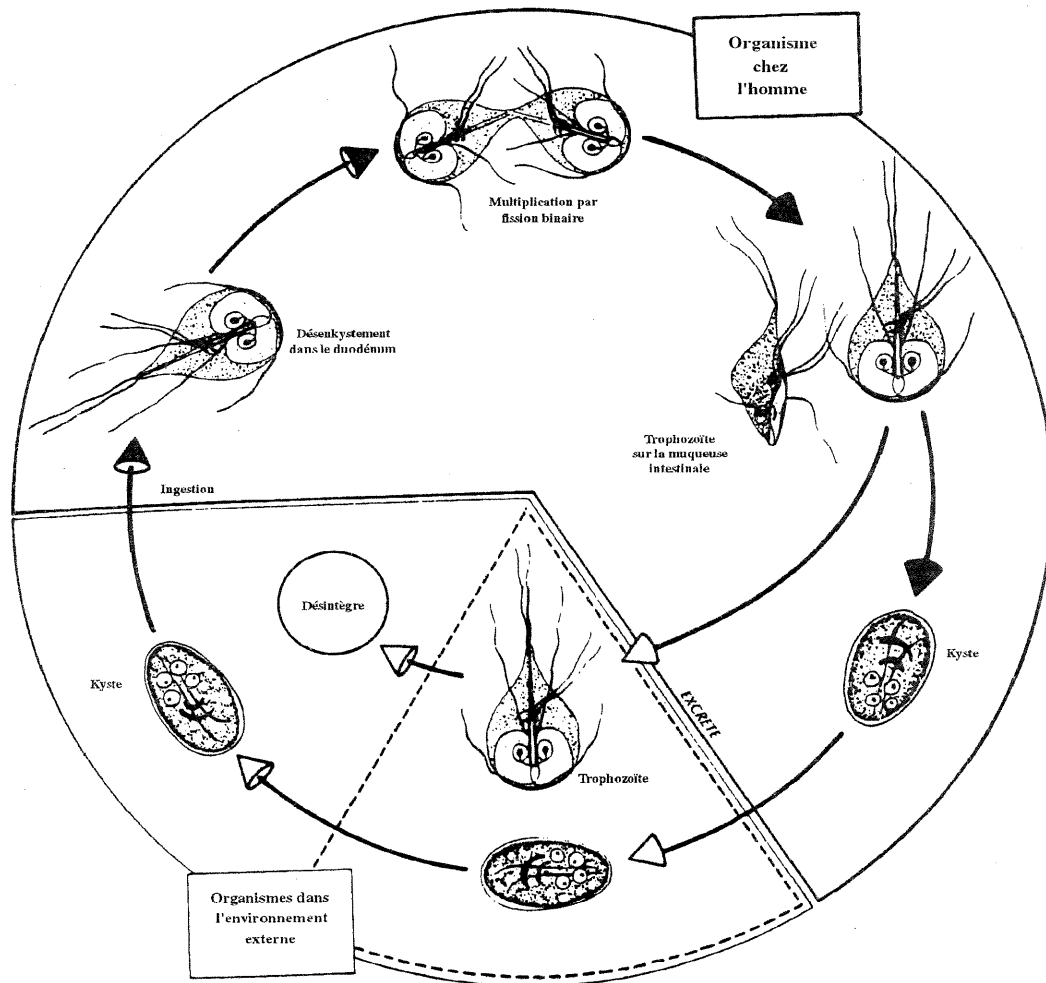


Figure 3. Cycle de vie de *Giardia duodenalis* chez l'humain (Adapté de réf. 152).

## **5.2- Forme infectieuse**

Depuis peu, le cycle de vie complet de *Giardia* peut se faire *in vitro* grâce à des techniques efficaces de désenkystement et d'enkystement. Le désenkystement est possible dans des conditions qui miment l'environnement acide de l'estomac. Le pH optimal suggéré pour favoriser le désenkystement de *Giardia* se situe entre 1.3 et 2.7 (25). Cependant, ce processus peut également se produire à pH neutre (31). Les conditions optimales d'enkystement nécessitent la présence de sels biliaries, de glycocholate avec acide myristique et un pH de 7.8 (81). La formation de la paroi du kyste est complète en 44 à 70 heures (194). Les techniques de désenkystement et d'enkystement, ont permis de réaliser *in vitro*, l'isolement, l'amplification et le maintien de nombreux isolats en laboratoire, ce qui facilite grandement leurs études et ce, à divers niveaux.

## **6- ÉPIDÉMIOLOGIE**

### **6.1- Humain**

#### **6.1.1- Incidence**

Présentement, la giardiose est la parasitose intestinale parmi les infections à protozoaires la plus fréquemment diagnostiquée chez l'humain et ce, à travers le monde (2). L'incidence de ce parasite varie entre 5 et 10% dans les pays industrialisés et entre 20 et 30% dans les pays en voie de développement (65). Cette infection est particulièrement commune chez les enfants dans les pays du tiers-monde (66,84,143,144). Aux États-Unis, *Giardia* est l'agent infectieux le plus souvent identifié lorsque l'eau potable est contaminée par les matières fécales (132).

#### **6.1.2- Source de contamination**

Une filtration inadéquate de l'eau d'aqueduc ou une contamination du système de distribution par les eaux d'égouts sont la cause de la plupart des épidémies à *Giardia* spp. (46,209). En ce qui concerne la contamination de l'eau en milieu rural ou lors d'activités

de plein air dans les parcs nationaux, les animaux domestiques ou bien les animaux sauvages tels que le castor et le rat musqué peuvent être à l'origine d'infection car ils peuvent jouer le rôle de réservoir (23,222). Dans ces endroits, l'eau est habituellement consommée sans aucun traitement. Toutefois, le réservoir de l'infection le plus important pour l'homme demeure néanmoins l'homme lui-même (65,189). La non-spécificité de *Giardia* vis-à-vis son hôte a incité plusieurs autorités à considérer *Giardia* comme une zoonose ou, du moins, une anthrozoonose. En laboratoire, on a réussi à infecter plusieurs espèces animales à partir de *Giardia* d'origine humaine (20,43,54,61,69,103,105,117).

## **6.2- Animaux domestiques**

### **6.2.1- Incidence**

Quelques études rapportent l'incidence de *G. duodenalis* chez les animaux domestiques. Par exemple, chez le chien et le chat, les études ont révélé que *Giardia* est une infection très commune. Les taux d'infection rapportés varient de 12 à 50% chez le chien et de 7 à 35% chez le chat (223). Pour ce qui est des animaux de la ferme, une étude canadienne récente rapporte un taux d'infection de 17.7% pour l'espèce ovine et 10.4% pour l'espèce bovine. Cette incidence est même plus élevée chez les jeunes; soit de 35.6% et 27.7% pour les agneaux et les veaux respectivement (34). En Suisse, on a rapporté également la présence de *Giardia* dans les cheptels bovins et ovins. Dans ce pays, des incidences aussi élevées que 26.6% et 29.8% ont été respectivement rapportées chez les veaux et agneaux (218). Une étude effectuée à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal a démontré que 23% des jeunes bovins hospitalisés étaient infectés par *Giardia* (207). *G. duodenalis* fut également isolé chez les équins, les lamas et les porcs, mais l'incidence semble être moins importante (22,121,250).

### **6.2.2- Source de contamination**

La source de contamination demeure inconnue. Certains auteurs suggèrent que cette source



serait l'eau (246). Chez les bovins, il est suggéré que les veaux sont la principale source de contamination du milieu (122,250). L'élevage en groupe est la méthode usuelle utilisée pour les veaux. Le contact physique constant entre les animaux favorise la transmission féco-orale de *Giardia* (122,171,249). Lors de surpopulation, la contamination du milieu par les veaux peut-être importante. Les nouveaux-nés placés dans un tel environnement ne peuvent que s'infecter et à leur tour, contaminent les parcs et perpétuent l'infection.

### **6.2.3- Rôle des femelles adultes**

Chez plusieurs espèces animales domestiques tels que les équins, les ovins et les porcins, il a été démontré que la femelle adulte serait la principale source de contamination pour les nouveaux-nés (248,250,251). En effet, au moment de la parturition, un pic d'excrétion de kystes de *Giardia* est noté chez ces animaux. Dans ce cas, le risque de contamination augmente à cause du nombre accru de kystes présents dans l'enclos de mise-bas. L'hypothèse émise pouvant expliquer un tel phénomène chez la jument, la brebis et la truie, est qu'au moment de la parturition, les changements hormonaux s'accompagnent d'une baisse de la réponse immunitaire (248,250,251). Chez le bovin cependant, ce pic d'excrétion ne fut jamais vérifié.

## **7- MANIFESTATION CLINIQUE**

### **7.1- Chez l'homme**

Les manifestations cliniques de la giardiose varient d'une personne à l'autre. Elles vont de l'infection asymptomatique à la diarrhée chronique accompagnée de malabsorption (133,243). Des facteurs tels que la virulence du parasite, l'importance de la dose infectante et l'efficacité des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte, peuvent influencer le caractère des manifestations cliniques (168,222,231,236). Des retards de croissance ont été notés chez les enfants et les jeunes animaux (15,32,66,67,144). Chez l'homme, la période d'incubation varie de 1 à 45 jours et la durée moyenne de l'infection est environ de 6 semaines. La nature de l'infection est de type auto-limitante et les signes cliniques

persistent rarement plus de deux semaines (114,242). Cependant, entre 30 et 50% des individus développent une infection chronique et des pertes de poids aussi élevées que de 10 à 20% du poids total de la personne infectée peuvent survenir (65). Dans plusieurs cas de giardiose, on a observé de l'arthralgie, de la myalgie, de l'urticaire et de l'éosinophilie. Ces manifestations ne semblent pas toutefois être causées par le parasite, mais elles sont une conséquence de sa présence puisqu'il favoriserait l'entrée d'antigènes d'origine alimentaire qui peuvent stimuler une réponse immunologique de type allergique (41,210).

### **7.2- Chez le bovin**

Chez le jeune bovin, la période prépatente n'est que d'une semaine et la période patente ou infectieuse peut persister aussi longtemps que quatre mois (178,215,219,240). Des fèces molles et mucoïdes ainsi que des retards de croissance sont les principaux signes cliniques observés lors de giardiose chez cet animal (171,178,215,240,249).

## **8- PATHOGÉNIE**

### **8.1- Lésions intestinales et malabsorption**

Chez l'humain, les signes cliniques sont liés aux lésions intestinales causées par le parasite. L'examen histopathologique de biopsies intestinales de patients infectés avec *Giardia* révèlent parfois des changements morphologiques de la muqueuse, soit de l'atrophie partielle à sévère et de l'hyperplasie des cryptes (77). De plus, une réponse inflammatoire plus ou moins importante caractérisée par une augmentation du nombre des lymphocytes intra-épithéliaux est parfois notée. Ces lymphocytes prédominent et possèdent les caractéristiques des lymphocytes T (76,245).

Quelques études ont démontré une certaine corrélation entre la sévérité des dommages à l'intestin grêle et le degré de malabsorption (58,245). Ce phénomène s'explique par la présence, à l'intérieur de la bordure en brosse de l'intestin, d'enzymes essentiels à la digestion ainsi que des systèmes de transport du glucose (pompes à sodium). Ainsi, lors

de dommages aux microvillosités, il y a perte de ces enzymes tels que les disaccharidases, les lactases et les lipases, et des mécanismes de transport, d'où malabsorption des disaccharides, du lactose, des lipides et du glucose (21,35,53). Dans une étude, il a été possible de classifier les gens infectés à *Giardia* en trois catégories selon la sévérité des lésions présentes: 1- intestin normal, 2- morphologie intestinale normale et infiltration lymphocytaire modérée et 3- atrophie villositaire et infiltration lymphocytaire marquée. Une certaine relation a pu être établie entre ces changements morphologiques et immunohistochimiques, et le degré des signes cliniques (203). Chez le veau, une seule étude fut effectuée afin de vérifier la pathogénèse de *Giardia*. Malheureusement, il fut difficile d'interpréter les résultats à cause de la présence d'infections bactériennes et virales concomitantes (219).

## **8.2- Exotoxine et lectine**

Afin d'expliquer les dommages associés à la présence du parasite, on a avancé l'hypothèse de l'existence d'une exotoxine sécrétée par *Giardia* qui endommagerait directement les entérocytes. Toutefois, son existence n'est pas encore démontrée. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que *Giardia* possède une variété de protéinases qui pourraient affecter les protéines de surface des microvillosités (94,177).

De plus, *Giardia* possède une lectine de surface liant le mannose qui pourrait contribuer à l'avènement des lésions. La lectine pourrait directement s'attacher aux résidus des sucres présents sur les protéines de surface de la membrane villositaire ou bien par un effet mitogène, augmenter le taux de remplacement des entérocytes, ce qui conduirait à une population relativement immature d'entérocytes et ainsi diminuerait la capacité d'absorption de la villosité. Ces deux mécanismes demeurent néanmoins spéculatifs (68,129).

### 8.3- Réponse immunitaire

La réponse immunitaire de l'hôte pourrait également contribuer à l'avènement des lésions. Chez la souris, il fut démontré que les dommages intestinaux sont moins sévères chez les souris athymiques que chez des souris immunocompétentes. Ces résultats démontrent un rôle pour le système immunitaire à médiation cellulaire dans l'apparition des lésions. De plus, lorsque des lymphocytes spléniques de souris immunocompétentes sont transférés aux souris athymiques, des changements morphologiques de la muqueuse se développent (200). L'activation des lymphocytes T pourrait sensibiliser à des antigènes spécifiques à *Giardia* (65). Toutefois, chez l'humain la pathologie est reliée à la réponse humorale et non à la réponse cellulaire (5,237). De plus, il fut démontré que l'augmentation des lymphocytes intra-épithéliaux survient après l'atrophie villositaire. Dans ce cas, la réponse immunitaire cellulaire a peut-être une importance moindre dans l'apparition des lésions (83).

## 9- IMMUNOLOGIE

L'immunité humorale et l'immunité cellulaire ont chacune un rôle à jouer dans le contrôle de l'infection à *Giardia*. L'importance de l'immunité humorale a été initialement démontrée par la prévalence élevée de giardiose symptomatique chronique chez les patients hypogammaglobulinémiques (33). Par ailleurs, la prévalence élevée d'infection à *Giardia* chez les sidéens suggère que l'immunité cellulaire participe également au contrôle de l'infection (181).

### 9.1- Immunité humorale

La présence d'anticorps spécifiques à *Giardia* fut démontrée *in vitro* par Hill et al. en 1984 (106). Lorsque des trophozoïtes furent mis en présence de sérum provenant d'un patient infecté et une source externe de complément, 98% des trophozoïtes furent tués alors que 8 à 76% furent neutralisés en présence de sérum d'humain non infecté. Cette cytotoxicité était dépendante de la voie classique du complément (106). L'importance du complément dans la résolution de l'infection *in vivo* est cependant douteuse car les taux des protéines

du complément sont faibles dans l'intestin. De plus, la classe d'anticorps prédominante dans la réponse humorale est l'immunoglobuline A (IgA), qui ne possède aucun récepteur pour la fixation du complément (120,145).

Les anticorps produits au niveau intestinal lors de la giardiose sont d'abord de type IgM et par la suite de types IgA et IgG lorsque l'infection atteint le stade de chronicité (197,221). Les IgA semblent être la composante la plus importante de la réponse humorale et chez la souris, il fut démontré qu'une corrélation existe entre la présence des anticorps IgA et la résolution de l'infection (2,56,120). Les IgA réagissent avec une protéine localisée à la surface membranaire des trophozoïtes dont le poids moléculaire est de 30 kDa et empêchent ainsi l'adhérence des trophozoïtes à la paroi intestinale. Ces anticorps provoquent l'agglutination des trophozoïtes et interfèrent avec la motilité du parasite (190). Une concentration plus faible d'IgA dans les sécrétions intestinales est souvent rapportée chez les patients atteints de giardiose chronique et la malabsorption observée est souvent liée à un déficit en IgA intestinal (188,254). Pour les anticorps circulants, les taux des différentes classes d'immunoglobulines sont habituellement à l'intérieur des valeurs normales chez les gens avec un système immunitaire normal (160). Toutefois, une augmentation des niveaux d'IgA et d'IgG fut rapportée lors d'infection de courte durée (190,201). Chez les patients atteints de giardiose chronique, les concentrations en IgG et IgA sériques sont plutôt faibles. Cette diminution pourrait s'expliquer par des problèmes de maturation ou de différenciation cellulaire des lymphocytes B (96). Il n'y a aucune corrélation entre le titre d'anticorps sérique d'une part, et le nombre de parasites présents ou bien l'importance des dommages intestinaux d'autre part (197).

## **9.2- Immunité cellulaire**

Chez la souris infectée avec *G. muris*, la réponse humorale est dépendante d'une immunité cellulaire intacte (101). Chez l'humain, cette dépendance entre l'immunité humorale et cellulaire est inconnue. Toutefois, l'importance des lymphocytes T dans le contrôle de

l'infection à *G. duodenalis* est bien démontrée. Lorsque les lymphocytes T sont absents, il en résulte une infection chronique à *Giardia* chez le patient (90). Le même phénomène fut observé chez des souris athymiques et des gerboises traitées avec des corticostéroïdes. Ces résultats démontrent l'importance que joue l'immunité cellulaire dans le contrôle de l'infection (134,200). Par exemple, une corrélation a été démontrée entre la prolifération de lymphocytes chez des souris infectées avec *G. muris* et la résolution de l'infection (104).

Outre les lymphocytes, les macrophages jouent également un rôle dans le contrôle de l'infection. Plusieurs études *in vitro* ont démontré une activité phagocytaire vis-à-vis les trophozoïtes. Cette phagocytose est augmentée en présence de sérum immun (116). Ceci suggère que le macrophage n'élimine pas de façon spontanée *Giardia* mais qu'il agit plutôt comme une cellule qui présente les antigènes des trophozoïtes aux lymphocytes et/ou qui participe à la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps du trophozoïte (2).

Les neutrophiles, tout comme les macrophages, opsonisent les trophozoïtes. Leur rôle est cependant secondaire dans l'élimination du parasite car lors de giardiose, il n'y a pas d'infiltration marquée par les polymorphonucléaires au niveau de la paroi intestinale (116). Les cellules K ne semblent pas non plus être importantes dans la résolution de l'infection car des souris génétiquement déficientes en ces cellules se sont débarrassées facilement de l'infection (102). Toutefois, les souris déficientes en basophiles ont développé une infection chronique à *G. muris*. Le rôle des basophiles dans la résolution de l'infection est inconnu (63).

### **9.3- Antigènes**

Plusieurs antigènes de *Giardia* ont été isolés et caractérisés. Ces antigènes sont pour la plupart des protéines des membranes de surface qui constituent le cytosquelette de *Giardia*. Un antigène de surface de poids moléculaire de 170 kDa fut isolé par électrophorèse sur

gel de polyacrylamide à partir de trophozoïtes de la souche humaine WB (163). Cet antigène de surface fut étudié chez 19 isolats humains et beaucoup d'hétérogénéité fut observé entre les isolats (162). En utilisant un anticorps monoclonal spécifique pour l'antigène de 170 kDa, on a démontré que la variabilité antigénique existe même à l'intérieur des clones individuels de cette souche (165). Cette variation antigénique des protéines de surface chez *Giardia* a été découverte récemment. Les expériences en laboratoire ont démontré l'existence de ce phénomène *in vitro* et *in vivo* (89,165). Apparemment, une variation antigénique pourrait se produire à partir de la 6<sup>ème</sup> génération selon l'isolat. Pour d'autres isolats, cette variation antigénique pourrait se produire après la 13<sup>ème</sup> génération (166). La possibilité d'exprimer un certain degré d'épitopes est caractéristique de l'isolat de base et est génétiquement déterminée (167). Les antigènes qui entrent en variation semblent être tous des protéines riches en cystéine (4). En effet, cet acide aminé recouvre la surface entière du trophozoïte et de façon uniforme. Il n'y a qu'un "variant" présent à la surface du parasite à un moment donné (184). L'importance de ces protéines riches en cystéine est démontrée par la susceptibilité marquée des trophozoïtes aux anticorps dirigés contre celles-ci. Leur rôle biologique est cependant inconnu (2). L'expression génétique de ces protéines de surface peut être perçue comme un moyen d'évasion pour le trophozoïte à la réponse immunitaire de l'hôte. Certains isolats de *Giardia* possèdent des protéines de surface d'antigénicité variable uniques qui les protègent contre les protéases du système digestif de l'hôte (169). Selon certains auteurs, ce pouvoir de *Giardia* de changer son image antigénique serait une explication possible pour la chronicité de la maladie chez des sujets immuns (89,168). Toutefois, la preuve définitive de l'importance que joue la variation antigénique sur l'aspect chronologique de la maladie reste à déterminer.

## **10- MÉCANISMES NON-IMMUNS**

Chez l'homme et plusieurs espèces animales, il fut suggéré qu'une immunité passive serait transmise entre la mère et le nouveau-né via le colostrum (10,158). Les études

épidémiologiques ont démontré que les infections à *Giardia* sont rares chez les enfants qui sont nourris au sein (113,211). *In vitro*, il fut démontré que le lait avait des pouvoirs cytotoxiques non-spécifiques contre les trophozoïtes de *Giardia* et également, empêcherait l'adhérence de ceux-ci aux parois du tube de culture grâce aux acides gras qui le constituent (48,193). Ce mécanisme de défense n'est pas dû à la présence d'anticorps humoraux mais plutôt relié à l'exposition du parasite à une lipase présente dans le lait et dont la stimulation est dépendante de la présence de sels biliaires (193).

Les autres mécanismes non-immuns de l'hôte, importants dans la défense contre *Giardia* sont le mucus intestinal, suggérés par la faible invasion du parasite dans les tissus, et la motilité digestive (2). Des gerboises infectées avec *G. duodenalis* ont démontré plus de résistance à l'infection quand elles furent nourries avec une diète à haute teneur en fibres, diète qui stimule la motilité intestinale (128).

## **11- DIAGNOSTIC**

### **11.1- Méthodes traditionnelles**

L'anamnèse et les signes cliniques peuvent suggérer une infection à *Giardia* mais la confirmation de la présence de ce protozoaire demeure la visualisation de kystes ou de trophozoïtes dans les selles à l'aide du microscope. Les méthodes coprologiques utilisées sont le frottis direct et les techniques de concentration telles que le sulfate de zinc ou le formol-éther. Afin de faciliter le diagnostic, des colorants peuvent être utilisés. L'iode, le trichrome et l'hématoxyline de fer sont parmi les colorants les plus utilisés. Ceux-ci colorent les structures internes du parasite facilitant ainsi son identification (216).

Étant donné le caractère intermittent de l'excrétion de kystes de *Giardia* dans les selles, il faut soumettre un minimum de trois échantillons prélevés à intervalles de deux jours. Ainsi, la sensibilité des méthodes directes de détection est accrue de façon significative. Lorsqu'un seul prélèvement est soumis et que la méthode diagnostique utilisée est la



concentration au sulfate de zinc, 70% des infections à *Giardia* peuvent être diagnostiquées. L'examen de trois échantillons augmente la sensibilité à 94%. Pour le frottis direct, la sensibilité est de 20% et 43% pour un et trois échantillons respectivement (252).

Lorsque les méthodes traditionnelles ne réussissent pas à confirmer un cas fortement soupçonné de giardiose à cause de la nature intermittente de l'excrétion des kystes, d'autres techniques peuvent être utilisées. La biopsie, l'aspiration duodénale et l'Entéro-test peuvent s'avérer plus sensibles (19,93). Toutefois, elles sont invasives et coûteuses. Chez le chien, l'aspiration duodénale s'est avérée plus efficace que la méthode de concentration avec le sulfate de zinc. Des 18 chiens infectés, 89% furent détectés par aspiration duodénale et seulement 39% par la technique de concentration avec le sulfate de zinc (185). Chez l'homme, l'aspiration duodénale semble moins efficace. Seulement 44% des humains infectés à *Giardia* furent détectés par aspiration duodénale alors que des kystes furent observés chez 85% des patients (87). Les résultats obtenus avec l'Entéro-test diffèrent aussi d'une étude à l'autre. Cette technique qui utilise un fil de nylon absorbant pour prélever les trophozoïtes présents dans le liquide duodénal s'est avérée efficace et sécuritaire chez l'humain (205). Chez le chien, seulement 5 des 21 fils de nylon administrés se sont rendus dans le duodénum et aucun n'a permis la récupération de *Giardia*. Puisque le fil de nylon peut se rompre lors du retrait, les auteurs considèrent cette méthode dangereuse chez le chien vu la possibilité d'obstruction intestinale par corps étranger (18).

## **11.2- Méthodes immunologiques**

### ***11.2.1- Anticorps circulants***

La présence d'anticorps sériques contre *G. duodenalis* fut démontrée pour la première fois en 1976 avec le test d'immunofluorescence indirecte (IFI). La source d'antigène utilisée était des trophozoïtes prélevés du duodénum et du jéjunum de patients infectés. Parmi les 36 cas de giardiose avec symptômes, 32 avaient des anticorps dans le sérum. Pour les deux

patients asymptomatiques et les 17 contrôles, le test s'est avéré négatif (197). La spécificité de l'IFA fut démontrée par une étude contrôlée. Des sérums positifs à l'IFA furent incubés avec des antigènes homologues (*G. duodenalis*) et hétérologues (*E. histolytica*, *T. vaginalis*, *E. coli*). Après incubation, les titres sériques d'anticorps déterminés par IFA ont diminué de façon significative dans les sérums adsorbés avec les antigènes homologues. Aucun changement du titre en anticorps ne fut noté avec les antigènes hétérologues. Les titres des sérums individuels étaient reproductibles à 94% lorsque le sérum était dilué quatre fois (91).

Un test ELISA fut également utilisé pour la recherche d'anticorps anti-*Giardia*. Des trophozoïtes cultivés *in vitro* servirent de source d'antigènes pour ce test. Tout comme l'IFA, l'ELISA s'est révélé spécifique et reproductible. Dans une étude, l'ELISA a démontré la présence d'IgG spécifiques à *Giardia* chez 81% des 59 patients infectés et chez 12% des 17 patients non infectés. Le test a démontré également que les anticorps anti-*Giardia* peuvent persister de 2 à 15 semaines post-traitement (213). Ce test ne peut distinguer une infection nouvellement acquise d'une infection acquise dans le passé. Dans ce cas, elle a peu de valeur pour le diagnostic de nouveaux cas. Afin de pallier à ce problème, des chercheurs ont proposé un test sérique ELISA basé sur la recherche d'anticorps IgM. La réponse spécifique IgM étant de courte durée, la recherche d'anticorps IgM pourrait être intéressante pour le diagnostic individuel (86). Présentement, aucune trousse de diagnostic existe pour la détection d'anticorps de *Giardia* dans le sérum (112).

### **11.2.2- Antigènes dans les selles**

La présence d'antigènes dans les selles fut démontrée pour la première fois à l'aide de la technique de contre-immunoelectrophorèse (CIE). L'antisérum utilisé pour le test avait été préparé en immunisant des lapins avec des trophozoïtes de *G. duodenalis*. La CIE s'est révélée aussi sensible et spécifique que l'examen au microscope et l'aspiration duodénale combinées (44). Des tests commerciaux d'immunofluorescence indirecte (IFI) et directe

(IFD) furent développés également (Merifluor Giardia, Meridian Diagnostics, Inc., Cincinnati, OH). Dans une étude, l'IFI avait une sensibilité de 97% et une spécificité de 100%. Trente-trois des 34 patients infectés identifiés à l'aide de la technique de concentration fécale commerciale Para-Pak Macro-Con furent positifs à l'IFI (196). Le test FD s'est avéré également plus sensible que les méthodes usuelles de concentration. En présence de moins de 1000 kystes par gramme de fèces, 76.4% des cas sont détectés par IFD et 36.4% par le sulfate de zinc. Lorsque l'échantillon contient plus de 1000 kystes par gramme de fèces, la sensibilité de ces deux techniques est similaire (247).

Deux trousse de détection des antigènes de *Giardia* dans les selles de type ELISA sont disponibles commercialement. Le premier test emploie des microplaques en plastique sur lesquelles un anticorps anti-*Giardia* est fixé aux parois. L'échantillon de selles à tester est incubé en présence des anticorps spécifiques déjà fixés aux parois des microplaques. Un deuxième anticorps conjugué à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase de raifort est ajouté. Le substrat est ajouté au complexe et les résultats peuvent être lus visuellement ou à l'aide d'un spectrophotomètre (164). La seconde trousse ELISA disponible sur le marché est le ProSpecT/Giardia de Alexon Inc.. Cette épreuve est basée sur la recherche de l'antigène GSA-65 dans les selles. Cet antigène est retrouvé au niveau de la paroi du kyste (206). La sensibilité du ProSpecT/Giardia fut comparée à la méthode de concentration formol-éther pour détecter les kystes dans les selles des enfants infectés. Des 99 cas positifs par la méthode traditionnelle, 93 des échantillons se sont révélés positifs par ELISA. Trente-deux des cas négatifs par la technique de formol-éther étaient positifs par ELISA. Ces cas furent considérés comme étant de vrais positifs car d'autres échantillons avaient été prélevés de ces enfants et ils étaient positifs. La sensibilité de l'ELISA augmente avec le nombre d'échantillons prélevés. La sensibilité de l'ELISA pour un et trois échantillons est de 81.6% et 94.7% respectivement (3). Chez le chien, le CELISA (Cellabs, Brookvale, NSW, Australia) fut comparé à la technique de concentration au sulfate de zinc (ZSCT). Ce test recherche la présence des antigènes spécifiques 30kDa et

65kDA de *Giardia*. Seul 13 des 22 échantillons positifs par ZSCT se sont révélés positifs par ELISA. La sensibilité et la spécificité du CELISA chez le chien est de 59% et 89% respectivement (110).

## **12- PHARMACOTHÉRAPIE**

### **12.1- Quinacrine**

La quinacrine est le premier composé qui s'est avéré efficace contre *Giardia* (37). Utilisée *in vitro*, elle réduit la viabilité du kyste et le taux de désenkystement, elle cause des changements morphologiques et tue les trophozoïtes (161). *In vivo*, sa façon d'agir est inconnue. L'utilisation de la quinacrine est non homologuée chez les animaux et vu son potentiel tératogène, elle ne doit pas être utilisée chez les animaux gestants (17).

### **12.2- Métronidazole, dimétridazole et tinidazole**

Ces composés de la classe des 5-nitroimidazoles interfèrent avec l'activité mitotique de *Giardia*; ils agissent sur les trophozoïtes seulement (111). Ils ne peuvent être utilisés chez les femmes enceintes et les animaux gestants car ils traversent la barrière placentaire et se sont avérés mutagènes chez la bactérie (136,204). Ces médicaments sont également cancérigènes à fortes doses chez les animaux de laboratoire (208). Le métronidazole est le seul médicament homologué pour *Giardia* aux États-Unis (146).

### **12.3- Furazolidone**

De la classe des nitrofurans, seule la furazolidone est employée contre *Giardia*. Tout comme les nitroimidazoles, elle interfère avec l'activité mitotique du parasite et est cancérigène chez les animaux de laboratoires (111). Quoiqu'un peu moins efficace que les nitroimidazoles, ce produit est populaire car il a l'avantage d'être en suspension et d'être bien toléré chez les enfants (45).

#### 12.4- Paromomycine

Ce composé de la classe des aminoglycosides a l'avantage d'être peu absorbé au niveau intestinal et il cause peu d'effets secondaires ce qui en fait le médicament de choix chez les femmes enceintes (124). Son action *in vitro* et son efficacité réelle *in vivo* sont toutefois inconnues.

#### 12.5- Albendazole

L'albendazole, un composé de la classe des benzimidazoles utilisés surtout comme anthelminthiques, s'est avéré efficace contre *Giardia in vitro* (39). Il adhère aux tubulines du cytosquelette et induit des altérations. L'albendazole semble avoir une plus grande affinité pour les giardines présentes sur le disque ventral du parasite (39). L'avantage de son utilisation est que les effets secondaires sont relativement peu marqués dû à la faible absorption intestinale (30). L'utilisation de ce produit est non homologué chez les petits animaux; vu son potentiel tératogène, il ne doit pas être utilisé chez des animaux gestants (220). Chez les animaux de consommation, l'albendazole est homologuée (122,246). Cependant, aucune étude n'a évalué l'efficacité de l'albendazole contre *Giardia* chez le bovin jusqu'à présent.

#### 12.6- Salinomycine

La salinomycine, un promoteur de croissance utilisé chez les bovins, s'est révélée efficace contre *Giardia in vitro*. A une concentration de 2 à 3 µg/mL, la salinomycine inhibe l'adhérence de la moitié des trophozoïtes en culture (92). C'est un antibiotique dérivé d'une souche de *Streptomyces albus* et comme d'autres ionophores, il altère la perméabilité des canaux ioniques (154). Son mode d'action contre *Giardia* est toutefois inconnu. Le fait que le produit soit homologué chez le bovin rend son utilisation intéressante pour le traitement de *Giardia*. Aucune étude n'a été faite jusqu'à présent pour évaluer l'efficacité de la salinomycine contre *Giardia* chez le bovin.

De tous les médicaments mentionnés, aucun n'est idéal. Plusieurs engendrent des effets secondaires indésirables et dans certains cas, les contre-indications limitent leur utilisation. Le phénomène de résistance à *Giardia* semble de plus en plus craint, avec le métronidazole entre-autres, ce qui justifie la recherche d'autres médicaments.

### **12.7- Posologie**

La posologie utilisée chez les humains et les animaux domestiques est indiquée dans les tableaux I et II. On y trouvera aussi les effets secondaires ainsi que l'efficacité des antibiotiques.

## **13- PRÉVENTION**

### **13.1- Vaccin**

Deux vaccins semblent prometteurs; soit le vaccin oral qui utilise la protéine 56kDa de *Giardia* testé chez la souris ainsi que le vaccin fait à partir d'un sonicat de trophozoïtes testés chez le chat. Tous deux ont induits une bonne immunité (235). D'autres études sont toutefois nécessaires avant que ces vaccins soient prêts pour la mise en marché. Chez l'espèce humaine et la souris, une protection passive fut démontrée entre la mère et l'enfant via le colostrum mais ce phénomène ne fut pas observé chez les autres mammifères (153,170,246,251).

### **13.2- La qualité de l'eau et la nourriture**

Afin de diminuer les risques d'épidémie, la mise en place d'un bon système de filtration de l'eau est nécessaire puisque la chlorination de l'eau n'est pas suffisante en elle-même (109). Faire bouillir l'eau est aussi un moyen efficace pour tuer les kystes. Lorsque la nourriture est la source possible de contamination, il faut s'assurer que les légumes et les fruits frais soient bien lavés (232).

### **13.3- Les animaux**

Chez les animaux, la transmission de la giardiose peut être réduite en isolant les cas infectés (215). Des parcs secs limitent la survie du parasite et l'usage de cabanes individuelles chez les veaux diminuent la contagion (249). La désinfection du milieu environnant avec du lysol ou du phénol à 5% fut suggérée et pour les cages, les ammoniums quaternaires semblent être les produits les plus efficaces pour détruire le parasite (215,253).

Etant donné la promiscuité qui existe entre les animaux de compagnie et les humains, certains auteurs suggèrent le traitement des chiens et des chats atteints de giardiose à cause de la non spécificité de certaines souches, et malgré que les études épidémiologiques suggèrent que le risque de transmission croisée soit faible (1,244).

**Tableau I. Posologie chez l'humain**

Antibiotiques	Effets secondaires	Posologie	Efficacité
<b>Quinacrine</b>	- Étourdissements - Migraine - Nausée - Décoloration de la peau et l'urine	A <sup>a</sup> : 100mg-BID-7jrs E <sup>b</sup> : 6mg/kg-10jrs	60-100%
<b>Métronidazole</b>	- Migraine - Nausée - Infections cutanées	A: 1-2g-SID-3jrs E: 15mg/kg-10jrs	46-95%
<b>Tinidazole</b>	- Migraine - Nausée - Infections cutanées	A: 2g-1 dose ou 500mg-BID-7jrs	88-100%
<b>Furazolidone</b>	-Migraine -Nausée -Vomissements	A: 100mg-QID-10jrs E: 9mg/kg 7-10jrs	58-95%
<b>Albendazole</b>		A: 800mg-1 dose 400mg-SID-3jrs 400mg-SID-5jrs	75% 81% 95%

<sup>a</sup> adulte    <sup>b</sup> enfant



**Tableau II. Posologie chez les animaux domestiques**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Effets secondaires</b>	<b>Posologie</b>	<b>Efficacité</b>
<b>Quinacrine</b>		1mg/kg-BID-7jrs	2/2 Veaux
		5X dose humaine?	1/1 Cheval
	- Anorexie-45 % - Léthargie-27 %	6.6mg/kg-BID-5jrs	20/20 Chiens
		10mg/kg-SID-12jrs	4/5 Chats
<b>Métronidazole</b>		25mg/kg-TID-3jrs	5/5 Veaux
		5mg/kg-TID-10jrs	1/1 Cheval
		25mg/kg-TID-5jrs	1/1 Cheval
	- Anorexie - Vomissements - Ataxie	22mg/kg-BID-5jrs	13/19 Chiens
		22mg/kg-BID-5jrs	7/7 Chats
<b>Diméridazole</b>		50mg/kg-SID-5jrs	13/13 Veaux
<b>Furazolidone</b>		Non spécifiée	10/10 Veaux
	- Diarrhée - Vomissements	4mg/kg-BID-5jrs	? Chats
<b>Albendazole</b>		25mg/kg-BID-2jrs	18/20 Chiens
		Non spécifiée	5/5 Chats
<b>Fenbendazole</b>	Nil	50mg/kg-SID-3jrs	6/6 Chiens

## II- La cryptosporidiose

### 1- HISTORIQUE

La découverte du protozoaire *Cryptosporidium* spp. a été faite par Tyzzer au début du 20<sup>e</sup> siècle (225). Ce parasite fut isolé la première fois dans des glandes gastriques de souris et fut nommé par conséquent *Cryptosporidium muris* (226). Une espèce apparentée à cette dernière, *Cryptosporidium parvum*, est retrouvée fréquemment dans la partie distale du petit intestin de plusieurs espèces animales ainsi que chez l'homme (172,227). La présence de l'espèce *parvum* fut démontrée chez le bovin par Panciera en 1971 (176). L'espèce *Cryptosporidium muris* fut également isolée dans la caillette des bovins en 1985 (8). Ces observations démontraient la non-spécificité des différentes espèces de *Cryptosporidium*.

### 2- TAXONOMIE

*Cryptosporidium* fait partie de l'ordre des Sporozoasida et du phylum Apicomplexa. Il est donc considéré comme étant une coccidie, tout comme *Eimeria* et *Isospora* (71). Les différentes espèces de *Cryptosporidium* furent nommées selon l'hôte chez lequel le parasite était retrouvé. Au début, une vingtaine d'espèces furent nommées mais des études récentes sur le phénomène de transmission croisée ont mis en doute la validité de plusieurs de ces espèces (71). A présent, il y a six espèces reconnues, soient: *C. nasorum* chez les poissons (108), *C. serpentis* chez les reptiles (130), *C. meleagridis* (212) et *C. baileyi* (52) chez les oiseaux et finalement, *C. muris* (226) et *C. parvum* (227) chez les mammifères.

### 3- CYCLE DE DÉVELOPPEMENT

Le cycle de développement de *C. parvum* est de type direct (Fig.1). L'infection se produit après l'ingestion ou l'inhalation d'oocystes présents dans la nourriture, l'eau ou l'environnement. Le désenkystement de l'oocyste est la première étape du cycle de vie. Celui-ci est favorisé par la présence de sels biliaires, de la trypsine et du dioxyde de

carbone. La température optimale de désenkystement est de 37°C (192). Le désenkystement se passe dans le tiers distal du jéjunum et dans l'iléon de l'hôte. Après ingestion des oocystes, quatre sporozoïtes sont libérés au cours d'une période de 4 à 12 heures (50). Ces derniers vont s'attacher à la bordure en brosse des microvillosités d'une cellule-hôte grâce à un organe d'attachement qui est unique à *Cryptosporidium* (74). Les sporozoïtes vont pénétrer dans les entérocytes de l'hôte mais ils demeurent toutefois extracytoplasmiques (40). Chaque sporozoïte se différencie rapidement en un trophozoïte à l'intérieur duquel une division nucléaire se produit. Cette multiplication asexuée, appelée mérogonie, produit huit mérozoïtes. Ces derniers infectent de nouveaux entérocytes et deviennent des nouveaux trophozoïtes qui, à leur tour, subissent une shizogonie. Chaque trophozoïte produit quatre nouveaux mérozoïtes. Cette deuxième génération de mérozoïtes initie la phase sexuée appelée gamétogonie. Les mérozoïtes se différencient en micro ou macrogamétocytes qui produiront des microgamètes et macrogamètes respectivement. Ces derniers se fusionnent et produisent deux types d'oocystes; ceux qui possèdent une paroi mince et ceux qui possèdent une paroi épaisse. Les oocystes à paroi mince qui représentent 20% de la totalité des oocystes sont responsables du phénomène d'auto-infection. Ils se désenkystent à l'intérieur de l'hôte et recommencent un nouveau cycle. Ceux à paroi épaisse sont éliminés dans les selles (49). Les oocystes libérés dans l'environnement sont immédiatement infectieux (Fig.1) (50).

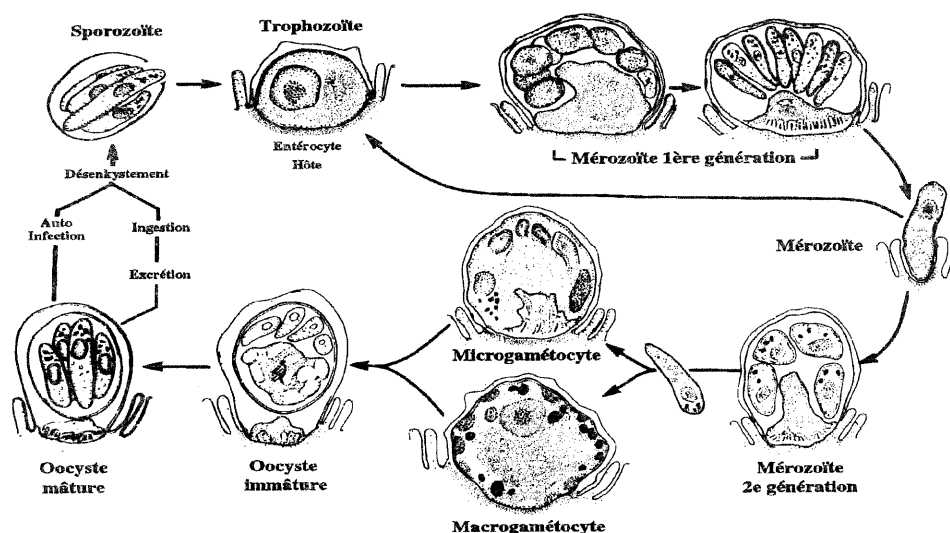


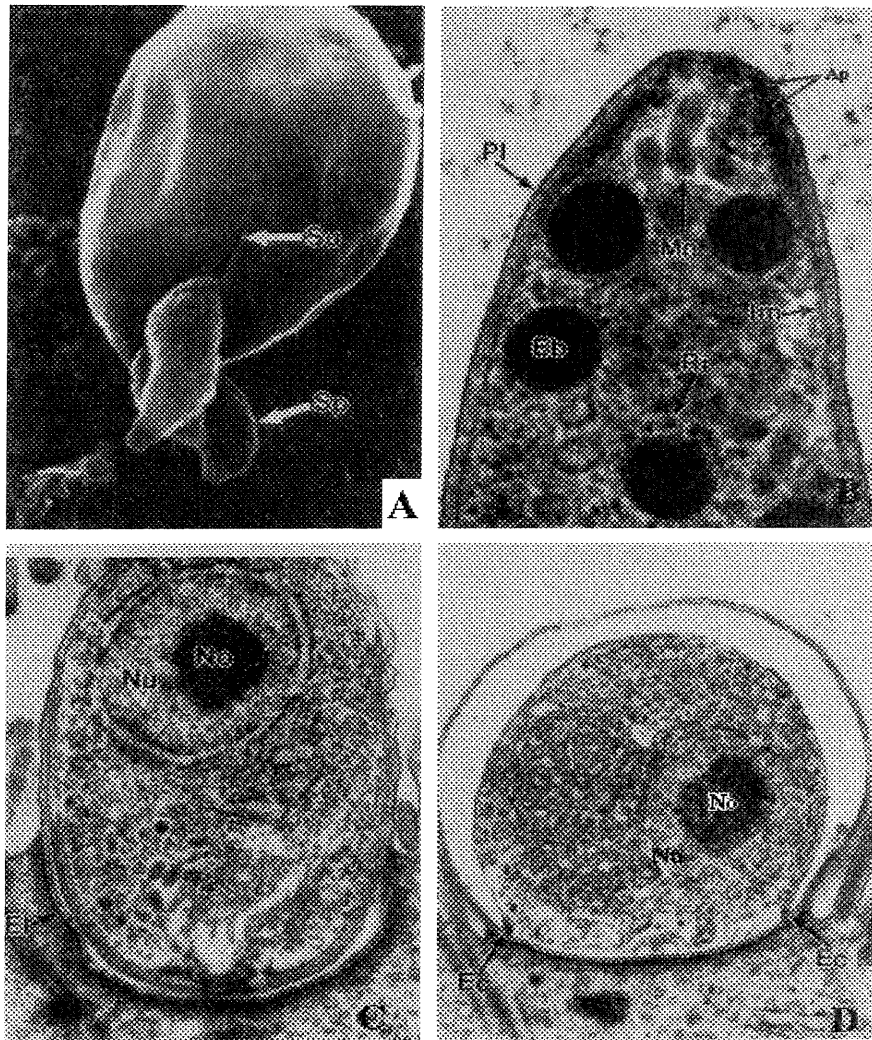
Figure 1. Cycle de vie de *Cryptosporidium*

#### 4- MORPHOLOGIE

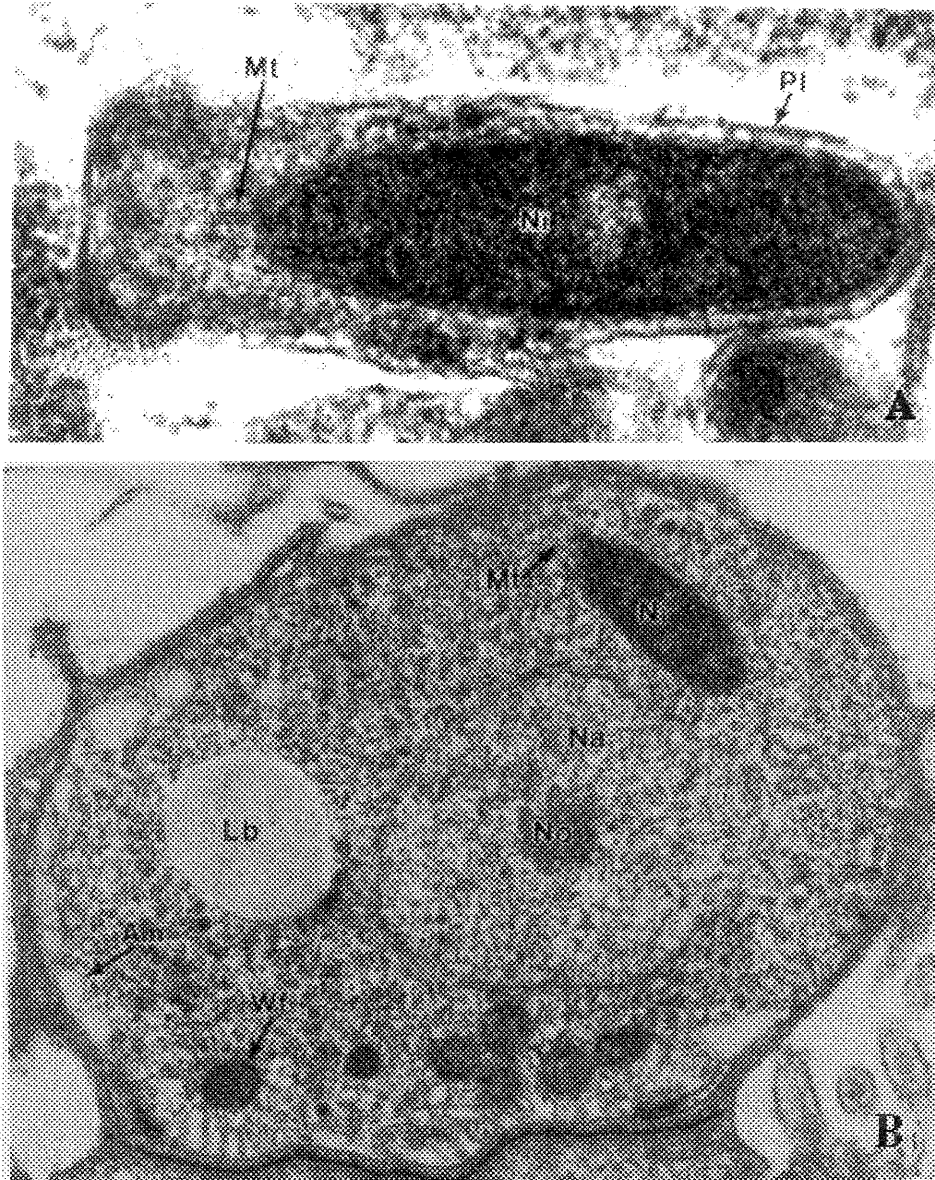
L'oocyste de *Cryptosporidium* est formé d'une double paroi distincte. À l'extrémité, il y a présence d'une suture qui lui est unique. Lors du désenkystement, cette suture se dissout et permet le passage des sporozoïtes (Fig.2A). Les sporozoïtes et les mérozoïtes, ont une forme plutôt cylindrique et possèdent un anneau polaire dans la partie antérieure qui est directement accolé à la membrane interne. Les inclusions cytoplasmiques des sporozoïtes et des mérozoïtes sont identiques. Il y a une pellicule, des micronèmes, des corps denses, un noyau, des ribosomes et des microtubules sub-pelliculaires. Ces deux formes transitoires de *Cryptosporidium* s'attachent aux cellules épithéliales grâce à une organelle unique (Fig.2B-C). Le trophozoïte, qui fait suite au sporozoïte lors de la mérogonie, possède également cette organelle d'attachement ainsi qu'un cytoplasme non-différencié et un noyau avec un nucléole proéminent (Fig.2D). Le microgamète qui origine des mérozoïtes de deuxième génération, a la forme d'une balle de fusil et possède un noyau énorme qui occupe la quasi totalité du cytoplasme. Le noyau est entouré d'un plasmalemme et de huit microtubules en étroite relation avec la surface externe du noyau (Fig.3A). Le macrogamète, dont l'origine est aussi des mérozoïtes de deuxième génération, est unique en ce sens qu'il est le seul à posséder un noyau central avec un nucléole proéminent, des corps lipidiques, des granules d'amylopectine et des structures au niveau de la membrane (Fig.3B) (74).

#### 5- MANIFESTATION CLINIQUE

La cryptosporidiose est une infection habituellement auto-limitante qui peut causer de la diarrhée jaunâtre qui varie de modérée à sévère et qui persiste de six à neuf jours. Cette diarrhée s'accompagne de perte de poids et de déshydratation pouvant même entraîner la mort de l'animal (9,49,156). Les facteurs tels que l'âge et le statut immunitaire de l'hôte, les conditions de régie, la présence d'infections concomitantes et la virulence de la souche infectieuse détermineront l'allure générale de cette infection (12,40,72,98,187). Les études effectuées chez le veau ont révélé une période prépatente de trois à six jours en moyenne



**Figure 2.** Morphologie de *Cryptosporidium* sp. à différents stades de développement. (A) Microscopie électronique à balayage d'un oocyste en phase de désenkystement. Trois sporozoïtes (Sp) sont libérés de l'oocyste par la suture (Su) (16000X). (B) Microscopie électronique à transmission (TEM) d'un mérozoïte. Il est composé d'un anneau polaire (AP) accolé à la membrane interne (Im), d'une pellicule (PI), de micronèmes (Mn), de corps denses (Eb) et de ribosomes (Ri) (32500X). (C) TEM d'un mérozoïte en début de phase d'attachement. Le nucléole est proéminent (No) dans le noyau (Nu) et la couche dense en électron de l'organelle d'attachement est visible (Le) (34000X). (D) TEM d'un trophozoïte. L'organelle d'attachement (Ec), le noyau (Nu) et le nucléole (No) sont visibles (18000X) (Adapté de réf. 74).



**Figure 3.** (A) Microscopie à transmission électronique (TEM) d'un microgamète de *Cryptosporidium* sp.. Il est composé d'un noyau proéminent (Ni), d'un plasmalemma (Pl), de microtubules (Mt) (75600X). (B) TEM d'un macrogamète et d'un microgamète lors de la fertilisation. Le microgamète est incorporé dans le macrogamète qui est composé d'un noyau central (Na), d'un nucléole (No), de corps lipidiques (Lb), de granules d'aminopeptine (Am) et de structures au niveau de la membrane (Wf) (33600X) (Adapté de réf. 74).

lors d'infection expérimentale et de 5 à 12 jours lorsque l'infection est acquise en nature (186). La période d'excrétion d'oocystes dans les selles est variable. Elle peut persister de 1 à 12 jours. Le nombre d'oocystes excrétés est directement proportionnelle à la sévérité de la diarrhée (229).

## **6- PATHOGÉNIE**

C'est seulement au début des années 1970 que l'on a associé *C. parvum* à des manifestations cliniques (176). Depuis, plusieurs études ont démontré que ce protozoaire peut causer une pathologie chez les animaux susceptibles. Les infections expérimentales effectuées chez des veaux, des souris et des poulets gnotobiotiques ainsi que chez des agneaux, exempts de pathogènes spécifiques (SPF), ont révélé que la présence de *C. parvum* est associée à des lésions intestinales importantes (14,97,186). Des résultats semblables furent également observés lors d'infections acquises naturellement chez les veaux, les agneaux et les porcelets (24,179,228).

Les lésions histopathologiques observées d'une étude à l'autre sont similaires. Les changements notés vont de l'atrophie jusqu'à la fusion des villosités par des ponts épithéliaux. De plus, on a noté de la distorsion au niveau des villosités. Les entérocytes sont plutôt cuboïdes et l'hyperplasie des cryptes est parfois observée. Une infiltration cellulaire de la lamina propria par des neutrophiles, des plasmocytes et parfois des macrophages et des lymphocytes a été observée (147). Ces lésions sont habituellement plus sévères dans les parties moyennes et distales du jéjunum ainsi qu'au niveau de l'iléon (157). Chez les animaux immunosupprimés, la distribution du protozoaire dans l'intestin est plus importante (6). Chez les veaux, les cryptosporidies sont souvent retrouvées au-dessus des plaques de Peyer au niveau de l'iléon (127). Les auteurs ont noté des changements ultrastructuraux tels la vacuolisation du cytoplasme et des mitochondries (27).

Les mécanismes impliqués dans la diarrhée sont inconnus. L'explication la plus plausible serait que les lésions structurales accompagnant cette infestation, ainsi que la diminution de l'activité des disaccharidases, pourraient interférer avec l'absorption de nutriments et conduire à la malabsorption et à la maldigestion (100). Une étude suggère que la diarrhée qui accompagne l'infection à *Cryptosporidium* serait probablement due à l'accumulation de nutriments hypertoniques non-absorbés dans le lumen du gros intestin (107).

## 7- IMMUNOLOGIE

Chez les mammifères autres que l'humain, l'âge est un facteur important dans le développement clinique de la cryptosporidiose. Cette observation démontre que le système immunitaire jouerait un rôle lors de l'infection. Par exemple, chez l'homme et chez le bovin, des anticorps spécifiques à *Cryptosporidium* furent identifiés par ELISA. Les anticorps sériques identifiés étaient du type IgA, IgG et IgM chez le bovin alors que chez l'humain, des IgE étaient également présents (38,239). Il fut démontré que les sporozoïtes peuvent être neutralisés en présence de sérum immun. Toutefois, ces anticorps ne semblent pas protecteurs car la cryptosporidiose chronique est une infection courante chez les patients capables de produire des anticorps spécifiques à *Cryptosporidium* (199). Les études effectuées sur les autres coccidies ont démontré que l'immunité à la coccidiose est dépendante des cellules T (202). Ceci est probablement vrai pour *Cryptosporidium* également. Les cas fréquents de cryptosporidiose chez les patients sidéens confirme cette hypothèse (238). L'immunité à médiation cellulaire joue aussi un rôle important dans la résolution de l'infection (51).

Chez la souris, le phénomène d'immunité acquise ne semble pas exister en ce qui concerne *Cryptosporidium*. Les souris adultes, malgré une bonne immunité active conférée suite à l'inoculation intragastrique d'oocystes, n'ont pu protéger leur petits contre une infection expérimentale à *Cryptosporidium* (155). Cependant, l'usage de colostrum bovin hyperimmun s'est avéré efficace dans la résolution de l'infection chez des sujets



immunodéficients (230). Les facteurs responsables de cette immunité passive chez les veaux demeurent indéterminés. Une prophylaxie partielle fut également observée chez des veaux infectés expérimentalement (73).

## **8- ÉPIDÉMIOLOGIE**

### **8.1- Prévalence**

Chez le veau, plusieurs études de prévalence ont été effectuées (Tableau I). Les résultats sont difficilement comparables car les tests de diagnostic utilisés diffèrent d'une étude à l'autre. Aux Etats-Unis, 22% des veaux non-sevrés seraient infectés. La présence du parasite a été notée sur plus de 80% des fermes (79). Au Canada, une seule étude fut effectuée en ce qui concerne la prévalence de *Cryptosporidium*. Cette étude, effectuée au Manitoba, a révélé que 58% des 50 sujets étudiés avaient des anticorps spécifiques à *Cryptosporidium* (142).

### **8.2- Âge**

Au Danemark, une étude effectuée sur 4269 veaux et vaches, a révélé que l'âge où l'incidence de *Cryptosporidium* était la plus élevée se situait entre 4 et 30 jours avec un pic à 8 et 14 jours (99). Une autre étude effectuée sur deux fermes en Ohio a révélé la présence de *Cryptosporidium* chez des sujets plus âgés. Des 10 veaux infectés par ce parasite, 3 avaient 166-177 jours d'âge et un veau était âgé de 71 jours (248). Il ne faut donc pas éliminer la possibilité d'infection à *Cryptosporidium* chez les sujets âgés de plus de un mois.

### **8.3- Saison**

La cryptosporidiose est un problème qui peut être saisonnier, dépendant de la région étudiée. Dans l'état du Dakota et au Manitoba, les cas de cryptosporidiose sont plus souvent observés l'hiver et au printemps car ceci coïncide avec la saison de vêlage chez les animaux de ces régions (141,156). Ces observations contrastent avec les résultats des

Tableau I. Études de prévalence de *Cryptosporidium* sp. chez le bovin

Année	Endroit	Méthode diagnostic	Nbre veaux	Résultats
1982	Idaho	Flottation	284	38.7%
1983	Bangladesh	Coloration Giemsa	410	15.0%
1984	Maryland	Contraste de phase au microscope	136	26.5%
1986	Manitoba Canada	"Acid fast" de Kinyoun	182	25.0%
1987	Californie	Auromine-rhodamine	500	5.6%
1987	Hollande	Ziehl-Neelsen modifié	45	60.0%
1989	Washington	Coloration Carbofuschine	445	51.0%
1992	E.-U.	Anticorps monoclonaux	7369	22.4%

(Adapté de réf. 79)

autres études effectuées car on rapporte plus souvent des cas lors des saisons plus chaudes et humides (191,198). *Cryptosporidium* est un organisme très résistant dans l'environnement. Les oocystes demeurent infectieux pendant plusieurs mois lorsque le milieu est humide et frais (42).

#### **8.4- Mode de transmission**

La transmission féco-orale est la principale voie d'infection. La quantité d'oocystes nécessaire pour transmettre l'infection est minime. Une centaine d'oocystes suffisent pour provoquer la maladie chez le veau (95). Ce nombre peut se retrouver dans des quantités minimales de fèces puisque la quantité d'oocystes excrétée chez un veau infecté varie de  $10^6$  à  $10^7$  oocystes/g de fèces (98). La transmission des oocystes par inhalation est une autre voie possible. Ce mode de transmission est reconnu chez l'espèce aviaire mais est peu documenté chez les autres espèces animales (138). Les mouches sont considérées comme des vecteurs potentiels de l'infection. La présence d'antigènes de *Cryptosporidium* fut démontrée chez des mouches à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques (217).

#### **8.5- Sources de l'infection**

Chez le veau, la transmission d'individu à individu est le facteur épidémiologique le plus important car *Cryptosporidium* est isolé surtout chez les animaux de ce groupe d'âge. Les adultes excrètent rarement des oocystes (98). La transmission de vache à veau est donc moins importante. Néanmoins, il fut démontré qu'à la mise-bas une baisse d'immunité chez la mère peut favoriser l'excrétion d'oocystes chez celle-ci. Ce phénomène, déjà observé chez la brebis, est toujours possible chez la vache mais reste à démontrer (251). Les principales sources d'infection pour le veau sont l'enclos de mise-bas contaminé et l'enclos où sont gardés les jeunes animaux. Les rongeurs, tels que les souris, peuvent aussi contaminer l'environnement. Une étude a démontré que 30% des souris sont porteuses asymptomatiques et que leurs fèces peuvent être infectieuses pour les veaux (123). Les

chats et les chiens de ferme sont également des facteurs de risque à considérer pour les veaux (7).

### **8.6- Infections concomitantes**

La présence simultanée d'autres agents infectieux est fréquente chez les animaux. Une étude effectuée à l'université du Dakota du Sud a révélé que près de la moitié (49.3%) des 277 cas analysés de cryptosporidiose chez les veaux, était des infections mixtes. Le *Rotavirus* était l'agent le plus fréquemment isolé en conjonction avec *Cryptosporidium* (31.8% des cas) (156). *Giardia* ne fut pas rapporté souvent avec *Cryptosporidium* car on a longtemps cru que ces deux protozoaires impliquaient deux groupes d'âges différents de veaux. Cependant, une étude récente effectuée sur deux fermes en Ohio, a révélé que la prévalence de l'infection mixte *Giardia-Cryptosporidium* est très élevée, soit 72.2%. Six des 27 veaux infectés de *Giardia* étaient âgés entre 11-17 jours, âge auquel on retrouve beaucoup d'infection à *Cryptosporidium* chez le veau (248).

## **9- DIAGNOSTIC**

Plusieurs méthodes ont été employées en laboratoire pour le diagnostic de la cryptosporidiose. La technique utilisée de routine consiste à préparer un frottis à partir d'un échantillon de fèces et de le colorer pour faciliter la visualisation des oocystes (13). Au microscope, les oocystes sont ronds et le diamètre varie entre 4.8 et 5.0  $\mu\text{m}$  (40). Ils sont entourés d'une mince membrane cytoplasmique et ils possèdent un point noir proéminent au centre qui est possiblement intranucléaire. L'observation des oocystes se fait à un grossissement de 200X ou 400X.

Une étude a évalué l'efficacité des diverses méthodes utilisées pour le diagnostic de *Cryptosporidium*. La technique qui utilise le colorant auramine-rhodamine, la flottation au sucre et l'immunofluorescence indirecte se sont avérées les méthodes les plus efficaces avec des sensibilités respectives de 94.4%, 87% et 83.3%. Ces techniques possèdent

cependant des désavantages; le colorant auramine-rhodamine est cancérigène, l'immunofluorescence indirecte est une technique dispendieuse et les lames préparées par la méthode de flottation au sucre se lisent difficilement à cause des débris présents. Deux autres colorants furent étudiés également, soit le Ziehl-Neelsen modifié et le Giemsa. La sensibilité plus faible de ces techniques, soit 75.9% pour le Ziehl-Neelsen et 64.8% pour le Giemsa, limite l'intérêt de leur utilisation. Les auteurs de cette étude suggèrent de combiner les différentes techniques pour améliorer la sensibilité de détection des oocystes (139).

## **10- TRAITEMENTS**

L'efficacité de plus de 100 médicaments fut vérifiée contre *Cryptosporidium* mais aucun ne s'est avéré réellement efficace jusqu'à présent (Tableau II) (137). Des effets thérapeutiques ont été attribués à la spiramycine chez les humains mais aucune étude à grande échelle n'a été réalisée avec ce médicament. Douze des 37 patients immunocompétents traités à la spiramycine ont cessé d'excréter des oocystes alors que dans une autre étude, aucune différence ne fut notée entre l'effet de ce médicament et un placebo chez 39 enfants (159,241). Le lasalocide, un antibiotique polyéther ionophore utilisé comme promoteur de croissance chez les bovins, s'est avéré efficace chez 12 veaux infectés de façon expérimentale et 320 veaux infectés de façon naturelle. La dose utilisée était le double de celle suggérée par le fabricant pour promouvoir la croissance. Aucun effet toxique fut noté à cette posologie (85). Pour l'instant, un traitement symptomatique avec de l'hydratation orale ou parentérale selon la sévérité de la déshydratation, s'avère le traitement de choix (71).

## **11-PRÉVENTION**

### **11.1- Vaccin**

Un vaccin oral fut essayé chez des veaux et les résultats se sont avérés prometteurs. Ce vaccin fait à partir d'oocystes lyophilisés, a diminué de façon significative la durée de la

**Tableau II. Liste des médicaments utilisés contre les infections à *Cryptosporidium* sp.**

---

Alborixine <sup>b</sup>	Enterolyte N <sup>b</sup>	Octréotide <sup>a</sup>
Amikacine <sup>a</sup>	Erythromicine <sup>a</sup>	Oxytétracycline-Métronidazole <sup>b</sup>
Amphotéricine B <sup>a</sup>	Ethopabate <sup>b</sup>	Paromomycine <sup>a</sup>
Ampicilline <sup>a,b</sup>	Facteur de transfert bovin <sup>a,b</sup>	Pénicilline <sup>a</sup>
Amprolium <sup>a,b</sup>	Furaltadone <sup>b</sup>	Pentamidine <sup>a</sup>
Arprinocide <sup>b</sup>	Furazolidone <sup>a,b</sup>	Phenamidine <sup>a</sup>
Bléomycine <sup>b</sup>	Gamma globuline <sup>a</sup>	Pipérazine <sup>a</sup>
Carbénicilline <sup>a</sup>	Gentamicine <sup>b</sup>	Polymixine-Furazolidone <sup>b</sup>
Céfamandole <sup>a</sup>	Halofuginone <sup>b</sup>	Primaquine <sup>a</sup>
Chloramphénicol <sup>b</sup>	Indométacine <sup>a</sup>	Pyriméthamine <sup>a</sup>
Chloroquine <sup>a</sup>	Interleukine-2 <sup>a</sup>	Quinacrine <sup>a,b</sup>
Cholestyramine <sup>a</sup>	Iodoquinol <sup>a</sup>	Quinine <sup>a</sup>
Cimétidine <sup>a</sup>	Ipronidazole <sup>b</sup>	Quinine-Clindamycine <sup>a</sup>
Clindamycine <sup>a</sup>	Ivermectin <sup>b</sup>	Robénidine <sup>b</sup>
Clonidine <sup>a</sup>	Kaolin-pectine <sup>a,b</sup>	Salinomycine <sup>a,b</sup>
Clopidol <sup>b</sup>	Kétoconazole <sup>a</sup>	Septin <sup>a</sup>
Cloxacilline <sup>a</sup>	Lasalocide <sup>b</sup>	Somatostatine <sup>a</sup>
Colistine <sup>a,b</sup>	Lévamisole <sup>a</sup>	Spectinomycine <sup>b</sup>
Colostrum bovin <sup>a,b</sup>	Lincomycine <sup>b</sup>	Spiramycine <sup>a</sup>
Co-trimoxazole <sup>a</sup>	Lopéramide <sup>a</sup>	Steptomycine <sup>b</sup>
Cyclosporine A <sup>b</sup>	Maduramycine <sup>b</sup>	Sulfonamides <sup>a,b</sup>
Decoquinat <sup>b</sup>	Mébéndazole <sup>a</sup>	Teinture d'opium <sup>a</sup>
Diclazuril <sup>a</sup>	Mépacrine <sup>a</sup>	Tétracycline <sup>a</sup>
Diète pauvre en gluten <sup>a</sup>	Méthylbenzoquate <sup>b</sup>	Thiabendazole <sup>a</sup>

---

**Tableau II. Liste des médicaments utilisés contre les infections à  
*Cryptosporidium* sp. (suite...)**

---

Difluoro-méthylornithine <sup>a,b</sup>	Métronidazole <sup>a,b</sup>	Triméthoprime <sup>a,b</sup>
Diodohydroxy-equinoléine <sup>a,b</sup>	Monensin <sup>b</sup>	Triméthoprime-Sulfa <sup>a,b</sup>
Diloxanide furoate <sup>a</sup>	Morphine <sup>a</sup>	Trinamide <sup>b</sup>
Dimétridazole <sup>b</sup>	Naproxen <sup>a</sup>	Vancomycine <sup>a</sup>
Dinitolmide <sup>b</sup>	Néomycine <sup>b</sup>	Zidovudine <sup>a</sup>
Diphénoxylylate HCL <sup>a</sup>	Nicarbazin <sup>b</sup>	Zoaquin <sup>b</sup>
Doxycycline <sup>a</sup>	Nitrofurantoïne <sup>a</sup>	Salicylate de Bismuth <sup>a</sup>
Emtryl <sup>b</sup>	Nystatin <sup>a,b</sup>	

---

diarrhée (1.7 jours vs 4 jours) et la durée d'excrétion d'oocystes (2 jours vs 5.3 jours) chez des veaux vaccinés comparativement à un groupe de veaux témoins. Le mode d'action du vaccin est toutefois inconnu. Il est possible que le vaccin induise une immunité locale au niveau de l'intestin, ce qui contribuerait à la protection des veaux contre les infections subséquentes (95).

### **11.2- Désinfection de l'environnement**

Il y a peu de produits qui se sont avérés efficaces pour la désinfection de l'environnement. Cependant, les produits à base d'ammoniaque tels que l'hydroxyde d'ammonium et le peroxyde d'ammonium ainsi que deux désinfectants commerciaux appelés Alcide Exspor (dioxyde chlorée) et Antec Oo-cide (ammonium, agent mouillant, biocide) ont démontré une certaine efficacité (29). Ces deux derniers produits sont probablement les plus pratiques pour l'usage au niveau de la ferme car ils sont peu toxiques et sont peu coûteux (40).

### **11.3- Mesures préventives**

Les mesures préventives qui s'appliquent à l'intérieur d'un troupeau sont les suivantes: 1) une bonne régie du colostrum, 2) isoler les animaux malades du reste du troupeau, 3) prévenir l'accès de rongeurs et animaux de compagnie dans les bâtiments de la ferme et dans les aires où la nourriture du bétail est entreposée, 4) nettoyer et désinfecter entre les groupes de veaux en élevage tout plein-tout vide et 5) utiliser des règles strictes d'hygiène pour le personnel tels que l'usage de bain de pieds avant d'entrer dans les bâtiments. L'usage de gants et de masques de chirurgien sont à considérer pour les gens étant en contact avec les animaux infectieux afin de minimiser les risques de transmission. Le logement individuel des veaux permet de réduire la transmission de cette parasitose (13).



# CHAPITRE 1

## Morphological changes in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp.

N. Ruest, Y. Couture, G.M. Faubert, C. Girard

(Soumis à Veterinary Parasitology)

### Abstract

Giardiasis and cryptosporidiosis are frequently diagnosed in calves at the large animal clinic of the veterinary school. Few studies have been reported in the literature concerning the pathogeny caused by these two intestinal protozoa. The aims of this study were to follow the histological changes in the villi and crypts and the changes in the number of intraepithelial lymphocytes in the jejunum of naturally infected calves during the acute phase of infection. For this purpose, 29 calves 7 to 10 days of age were bought at a local auction. The animals were housed in individual pens to avoid cross-contamination. Fecal samples were analysed for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts three times per week for a period of 45 days. Six calves did not pass any cysts or oocysts and were used as controls. Fifteen of them passed *Giardia* cysts only, five passed both cysts and oocysts and three oocysts only. The villus to crypt ratio index was 1.76 in the control group and 1.08 in the *Giardia*-infected group. In the *Cryptosporidium*-infected calves, the ratio was 1.18 and calves infected with both parasites had an index of 1.37. The mean number of intraepithelial lymphocytes per millimeter of jejunum tissue was 21 in the

control group. This number was doubled in the calves infected with *Giardia*, but was slightly lower in the other infected groups. All of the infected calves had intermittent diarrhea and mucus was seen in many fecal samples.

*Keywords:* *Giardia* spp.; *Cryptosporidium* spp.; Cattle; Calf; Protozoa; Pathogeny.

## **1. Introduction**

Giardiasis is the most widespread intestinal protozoal disease of humans in the world. Not only is the infection diagnosed in developing countries, but it also occurs among people living in developed countries where public hygiene is good and water supplies are purified and piped. Today, epidemiological studies indicate that infections are spreading not only in humans, but also in farm animals (Xiao, 1994). The first case of giardiasis in cattle was reported by Fantham (1921). Since this first report, many studies on the incidence of giardiasis in cattle have been reported in the literature (Deshpande and Shastri, 1981; Taminelli and Eckert, 1989; Buret *et al.* 1990). However, the pathogeny of intestinal mucosal damage in cattle giardiasis has received little attention. After infecting calves in the laboratory with bovine *Giardia* isolates, Taminelli *et al.* (1989) studied cellular infiltration and villus atrophy in the jejunum of infected calves. After a pre-patent period of 8 days, all calves excreted cysts during a maximum period of 112 days. Intestinal blunting, flattening of the villi and cellular infiltration of the mucosa of the small intestine were present. They also observed that these changes also occurred when the intestine was densely populated by bacteria and viruses (Taminelli *et al.* 1989). In humans, the distribution of trophozoites is practically unknown since the small intestine is accessible only by invasive techniques involving intubation. However, trophozoites have been detected in the duodenum and proximal jejunum of infected patients (Ferguson *et al.* 1990). Using the gerbil-*Giardia lamblia* animal model, Campbell and Faubert (1994) found that trophozoites are distributed evenly in the small intestine. In humans and

laboratory animal models, it has been reported that *Giardia* trophozoites are capable of causing a decrease in the villus to crypt ratio (VCR) at the site of infection. For example, it has been reported that gerbils infected with  $2 \times 10^5$  *G. lamblia* trophozoites have a significant decrease in the villus to crypt ratio during the acute phase of the infection (Belosevic *et al.* 1989). Meanwhile, the presence of acute inflammatory cells in the epithelial layer was reported in clinical human giardiasis (Hoskins *et al.* 1967). Intraepithelial lymphocyte (IEL) counts, performed both in adults (Gillon, 1985) and children (Ferguson *et al.* 1976), showed high numbers at the time the patients released cysts in stool.

The aims of this study were to follow the histological changes occurring in the villi and crypts in the jejunum of calves naturally infected with *Giardia*, and to count the number of IEL during the various phases of the infection. We also wished to determine whether a concomitant infection with *Cryptosporidium* spp. increased the pathology observed in the jejunum of calves infected with *Giardia* trophozoites. For this purpose, we measured the villus to crypt ratio and counted the number of IEL in various sections of the jejunum using standard histological procedures. The presence of bacterial and viral pathogens of the small intestine were also determined. The morphometric measurements were compared and analysed by the Spearman rank correlation test in order to determine if there was a relation between the villus to crypt ratio and the number of IEL.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animals**

For this study, 29 Holstein calves 7 to 10 days of age were bought at a local auction. On arrival, they were housed in individual pens to avoid cross-contamination. The pens were elevated from the ground and had slatted floors. A commercial milk substitute (Lacvor® Nutrinor CAA, Chambord, Qc ) was the major diet until weaning at 8 weeks of age. No

antibiotics were added to the milk substitute. A standard calf diet was given at 2 weeks of age and remained the major food after weaning. Each calf was provided with a pail and water was available ad libitum. Six of the calves were housed in a different barn and were used as controls. They were kept in individual pens and received the same diet as the other calves.

### ***2.2 Fecal sampling and examination***

The day after arrival, fecal samples from all calves were taken and examined by microscopy. The samples were collected from the floor when the stools were freshly formed or from the rectum using disposable plastic gloves. They were stored in individual plastic fecal containers and refrigerated at 4°C until examination. The zinc sulfate concentration method was used to detect *Giardia* cysts and approximately 10 g of fecal materials were mixed thoroughly with 10 ml of tap water and stirred through a gauze into 15 ml centrifuge tubes. The filtrate was centrifuged for 2 minutes at 1500 rpm. The supernatant was discarded and the sediment resuspended in a zinc sulfate solution with a specific gravity of 1.18. The tubes were centrifuged again for 2 minutes at 1500 rpm. After centrifugation, the tubes were filled to the rim with zinc sulfate solution and covered with a coverslip touching the meniscus. After 2 minutes incubation at room temperature, the coverslip was placed on a glass slide and examined unstained with a microscope at 200x or 400x magnification for a period of 5 minutes. A direct examination technique was used to detect *Cryptosporidium* oocysts (Casemore *et al.*, 1985). Fecal samples were taken 3 times per week during a period of 6 weeks, and were examined within the first 36 hours after collection. All the fecal samples were graded according to the level of diarrhea: 0=normal; 1=partly-formed feces; 2=mostly watery content; and 3=watery diarrhea.

### ***2.3 Slaughter sending***

The calves were sent to the house slaughter at 6 or 8 weeks of age while the animals were

still being fed with milk substitute because we wanted to avoid any modifications at the intestinal level following weaning. At 6 weeks of age, 21 calves were sent to slaughter: 3 controls, 3 infected with *Cryptosporidium*, 5 infected with both parasites and 10 infected with *Giardia*. In order to determine the progression of the lesions in the intestine, 8 calves were sent to slaughter at 8 weeks of age (3 controls and 5 infected with *Giardia*). Calves were passing *Cryptosporidium* oocysts or *Giardia* cysts in their feces immediately before slaughter.

#### **2.4 Sample collection and examination**

Sections of abomasum, duodenum, proximal, mid and distal jejunum, ileum and spiraled colon were taken and fixed in 10% buffered-formalin. Tissue specimens varied in length from 2.5 to 10 cm. Tissues were embedded in paraffin, cut into 6  $\mu$ m sections and stained with haematoxylin, phloxin and saffron (HPS). All the specimens were examined by a pathologist. Inflammation was scored as + (light), ++ (moderate) or +++ (severe). At the histological examination, presence or absence of *Giardia*, *Cryptosporidium* trophozoites and *Eimeria* cells was also noted.

#### **2.5 Research of BVD, Rota and Corona viruses and Salmonella**

At autopsy, spleen and ileum tissues and rectal content of each calf were taken. The presence of BVD virus in the spleen and sections of the ileum (6 $\mu$ m) was done by direct immunofluorescence assay using a polyclonal antiserum of bovine origin (VMRD, Pullman, WA) which detects non-cytopathogenous strains of BVD in tissues. The presence of *Rota* and *Corona* viruses in the ileal sections was determined by indirect immunofluorescence assay using a rabbit antiserum against the antigens of these viruses (Armand-Frappier Inst., Laval, Qc.). Detection of *Salmonella* spp. in fecal samples was carried out by using tetrathionate broth (Difco, Detroit, Mi.) as enrichment medium. Tubes were incubated at 37°C and, after 24 hours they were poured on SS agar (Difco)

plates. The SS agar plates were incubated at 37°C for 18 hours. Suspect colonies were submitted to a biochemical identification according to the procedures used in the clinical bacteriology laboratory at the veterinary school and the Manual of Clinical Microbiology (Murray *et al.* 1995).

### ***2.5 Measurement of the villus to crypt ratio and IEL numbers***

The method of Roberts-Thomson *et al.* (1976) for the determination of villus to crypt ratio in murine giardiasis was used, except for the following modifications. The jejunum was removed, fixed in formalin and processed in paraffin for light microscopy. All histological specimens (HPS 6 µm) were examined at 100x with a morphometric analysis computer program called: "R and M biometric analysis volume morphometry" (R&M Biometrics Inc., Nashville, TN).

The method of Rosekrans *et al.* (1981) was used for the determination of the number of IEL per millimeter of surface epithelium, except for the following modification. The graphic tablet (Tektronix) used by Rosekrans *et al.* (1981) was replaced by the morphometric analysis computer program described above to determine the IEL in the jejunum in each calf. For both measurements, 10 representative specimens of infected and uninfected calves were used.

### ***2.6 Statistical analysis***

The Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by ranks and a multiple comparison test were used to determine differences between groups for the given parameters. The Kruskal-Wallis test was also used to evaluate the effect of the duration of infection with *Giardia* on the VCR and the IEL. The Spearman rank correlation was used to determine if there was a relation between the VCR and the IEL. The alpha chosen was 0.05.

### **3. Results**

#### ***3.1 Fecal examination and clinical symptoms***

The first faecal examination revealed that upon arrival, three calves were passing *Giardia* cysts and two were passing *Cryptosporidium* oocysts. None of the infected calves had a mixed infection. One week later, eight calves were passing *Giardia* cysts, 11 calves were passing *Cryptosporidium* oocysts and four had a mixed infection. Therefore, in less than a month, all the 23 calves in one barn had become infected with one or both parasites. The six calves raised separately did not get any infection. One month after arrival, the infection rates for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. were 87% and 34.8%, respectively. Five calves were infected with both parasites. All infected calves had intermittent diarrhea. The average length of the episodes of diarrhea was 2 to 3 days. Mucus was seen in feces of calves infected with *Giardia* spp. and to a lesser extent in the feces of calves infected with *Cryptosporidium* spp.. Subjectively, we did not observe any differences in food intake between the infected and non-infected calves. In spite of the presence of diarrhea, dehydration was not a clinical feature. No differences were noted in the duration and severity of the diarrhea between the three infected groups. Some calves had fever (40°C and over) for 1 to 6 days during their stay. The fever was attributed to respiratory bacterial infection and responded well to penicillin (22,000 UI/Kg, BID).

#### ***3.2 Histological examination***

##### ***Parasite findings***

*Giardia* trophozoites were observed at the base of the villi in 50% of the infected calves. Seven calves were infected in the proximal jejunum, five in the mid jejunum and four in the distal jejunum; one calf had trophozoites in all segments of the jejunum. Trophozoites were found in the duodenum of only one animal; none were found in the abomasum, the ileum or the colon. *Cryptosporidium* cells were found in the abomasum or the jejunum of

the calves. *Eimeria* was found in the jejunum of three calves infected with *Giardia*. In one animal the parasite was located in the ileum and in the colon. No parasites were observed in the control group.

### ***Histological findings***

A moderate to severe diffuse inflammation was seen in the jejunal chorion of all calves infected with *Giardia*. The cellular infiltration consists mainly of mononuclear cells; plasmocytes were predominant. Villus atrophy and distortion of the crypts were common findings in calves infected with *Giardia* (Fig. 1). Purulent cryptitis, varying from rare to multifocal, was observed in the proximal jejunum of 10 calves. The inflammation was less severe in the duodenum, ileum and colon.

The inflammation was more severe in the proximal jejunum than in other intestinal segments in calves infected with both parasites or with *Cryptosporidium* alone. In the control group, the inflammation was light to moderate in all intestinal segments. However, this inflammation could not be attributed to the presence of the two parasites under study since they were not seen at the histological examination and no cysts or oocysts were detected in feces. There was no distortion in the crypts, and the villi had no atrophy (Fig. 2). As reported by Barker *et al.* (1993), no pathological lesions compatible with a BVD virus infection were observed in the intestinal tract of these calves. No histological changes compatible with *Cryptosporidium muris* or *Eimeria* spp. infections were observed in the abomasum or in the large intestine of these animals, as reported previously by Angus (1990) and Barker *et al.* (1993).

### ***3.3 Viral and Bacterial examination***

The absence of *Rota*, *Corona* and BVD viruses in the ileum section and BVD in the spleen sections was confirmed by using the immunofluorescence assay. On the other hand, the



absence of *Salmonella* in the fecal samples was determined by the routine bacterial procedures used in our clinical bacteriology laboratory.

### **3.4 IEL Results**

The mean number of IEL per millimeter of tissue in the control group was 20.93 (Fig. 3). In the *Giardia*-infected group, the number of IEL per millimeter doubled (42.32) and reached a peak in the group infected with *Cryptosporidium*. It was interesting to note that the number of IEL/mm for the group of animals with the mixed infection was lower when compared with the group of calves infected with *Giardia* only. There was no correlation between the IEL and the duration of infection with *Giardia* ( $0.1 < P < 0.95$ ). However, a direct correlation existed between the number of IEL/mm and the intensity of the inflammation observed at histology ( $0.005 < P < 0.01$ ).

### **3.5 Villus and Crypt Measurements**

The villus to crypt ratio for *Giardia*-infected calves was significantly lower when compared to the control group (Fig. 4). However, no significant differences were observed between the control group and the *Cryptosporidium*-infected calves or the calves with the mixed infection. It is worth mentioning that the variation in the villus to crypt ratio for all the groups was rather large. There was no correlation between the villus to crypt ratio and the duration of infection with *Giardia* ( $0.1 < P < 0.95$ ).

## **4. Discussion**

Although there are many reports in the literature on the incidence of giardiasis in cattle (Taminelli and Eckert, 1989; Buret *et al.*, 1990), there are few studies on the pathogeny of the intestinal mucosal damage caused by this intestinal protozoan. Our study was undertaken to determine the histological changes in the villi and crypts located in the

jejunum of calves naturally infected with *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. or having a combined infection of the two parasites. The data obtained in this study show that only the group of calves infected with *Giardia* spp. had a reduced villus-to-crypt ratio. However, the number of IEL per millimeter of tissue increased significantly in the three groups of infected calves, when compared to the non-infected group. It appears that the morphological changes in the jejunum, together with the increase in the number of IEL, can be attributed to the presence of these two protozoans since the results of tests to detect the presence of pathogenic bacteria and viruses were negative. We observed an important variation in the villus-to-crypt ratio value and the number of IEL per millimeter of tissue. The low number of calves per group and the infective dose are likely to be important factors in this variation. Furthermore, the animals were naturally infected and we were not able to determine the intensity of the infection. On the other hand, the status of the immune system at the time of infection, together with the variation in virulence of different strains, are also important factors to consider in the variation of the pathogeny. We have ruled out these two parameters as explanations for the variation in our data. The calves were all of the same age and they were in excellent health. Furthermore, they were bought at an auction and the animals were all born in the same region. Therefore, it is unlikely that the immune system might have played an important role or that the animals were infected with different strains. From a clinical point of view, these results emphasize the difficulties in diagnosing these infectious diseases. Animals may be infected with a low number of parasites that are not detectable by routine stool examination or they may show very few symptoms or have no sign of pathogeny. However, they still remain an important source of contamination for the herd since they may harbor the parasites. In our study, all the infected calves had episodes of diarrhea lasting 2 to 3 days. Recently, it has been reported that lambs infected experimentally with *Giardia* also had abnormal feces (Olson *et al.*, 1995). The calves infected with *Cryptosporidium* spp. did not have a reduced villus-to-crypt ratio and we have attributed these results to the fact that *Cryptosporidium*'s habitat

is the ileum, not the jejunum (Barker *et al.*, 1993). On the other hand, villus atrophy and crypt hyperplasia in response to infection with *Giardia* are well known phenomena. The infection is more detrimental to the mucosal architecture of the upper portion of the small intestine. Buret *et al.* (1992) observed an increase in the numbers of immature enterocytes, which appears to be associated with crypt hyperplasia. In human giardiasis, it has been reported that malabsorption is associated with a low villus-to-crypt ratio and high number of IEL present in the jejunum. In our study, an elevated villus-to-crypt ratio was associated with a low number of IEL in the jejunum. It is worth mentioning that the mixed infection caused less morphological damage in the jejunum than when the calves were infected with a single parasite. These results are contrary to our hypothesis since we anticipated that a mixed infection would amplify the pathogeny and the clinical symptoms caused by a single parasite. It is possible that the low number of calves in the group with the two parasites (5) was not enough to observe differences. Another possibility would be that the parasites may have an antagonistic effect on each other rather than a synergistic effect. The housing of calves in individual pens did not prevent cross-contamination since, at the time of housing in the barn, there were only three calves infected with *Giardia* spp. and two calves infected with *Cryptosporidium* spp.. In less than a month, all the animals became infected. We believe that the common procedures of husbandry are responsible for the rapid spread of the infection amongst the herd.

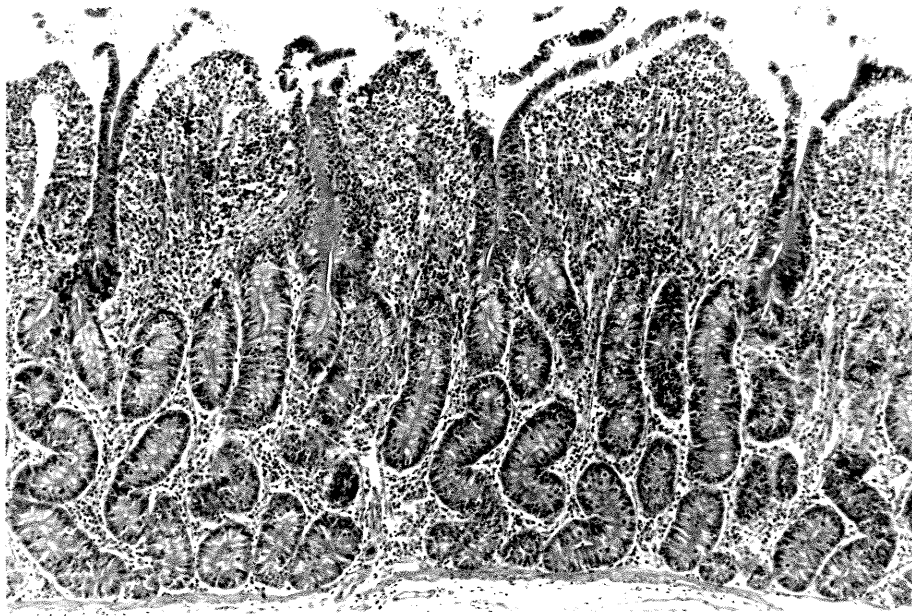
### **Acknowledgements**

The authors thank "Le Fonds du centenaire" of the faculté de médecine vétérinaire of l'Université de Montréal for their financial support; Dr. Alain Villeneuve and Dr. Béatrice Doizé for welcoming us and allowing us to work in their respective laboratories; Dr. Roger Prichard and Mr. Shawn Mohammed for critique of the manuscript. Dr. Faubert would like to acknowledge NSERC grant number OGP9374.

## References

- Angus, K.W. 1990. Cryptosporidiosis in ruminants. In: J.P. Dubey, C.A. Speer and R. Fayer (Editors), Cryptosporidiosis of man and animals. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 83-103.
- Barker, I.D., van Dreumer, A.A. and Palmer, N., 1993. The alimentary system. In: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer (Editors), Pathology of domestic animals, Fourth edition, vol.2. Academic Press, San Diego, California, pp. 149-315.
- Belosevic, M., Faubert and G.M., Maclean, J.D., 1989. Dissacharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. Gut 30:1213-1219.
- Buret, A., den Hollander, N., Wallis, P.M., Befus, D. and Olson, M.E., 1990. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. J. Inf. Dis., 162:231-237.
- Buret, A., Hardin, J.A., Olson, M.E. and Gall, D.G., 1992. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. Gastroenterology 103:506-513.
- Campbell, D. and Faubert, G.M., 1994. Comparative studies on *Giardia lamblia* encystation in vitro and in vivo. J. Parasitol., 80:36-44.
- Casemore, D.P., Armstrong, M. and Sands, R.L., 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. J. Clin. Pathol., 38:1337-1341.
- Deshpande, P.D. and Shastri, U.V., 1981. Incidence of *Giardia* infection in calves in Maharashtra state, India. Trop. Anim. Hlth. Prod., 13:34.
- Fantham, H.B., 1921. Some parasitic protozoa found in South Africa. S. Afr. J. Sc., 18:164-170.
- Ferguson, A., McLure, J.P. and Townley, R.R.W., 1976. Intraepithelial lymphocyte counts in small intestinal biopsies from children with diarrhea. Acta Paedia. Scand., 65:541-546.
- Ferguson, A., Gillon, J. and Munro, G., 1990. Pathology and pathogenesis of intestinal

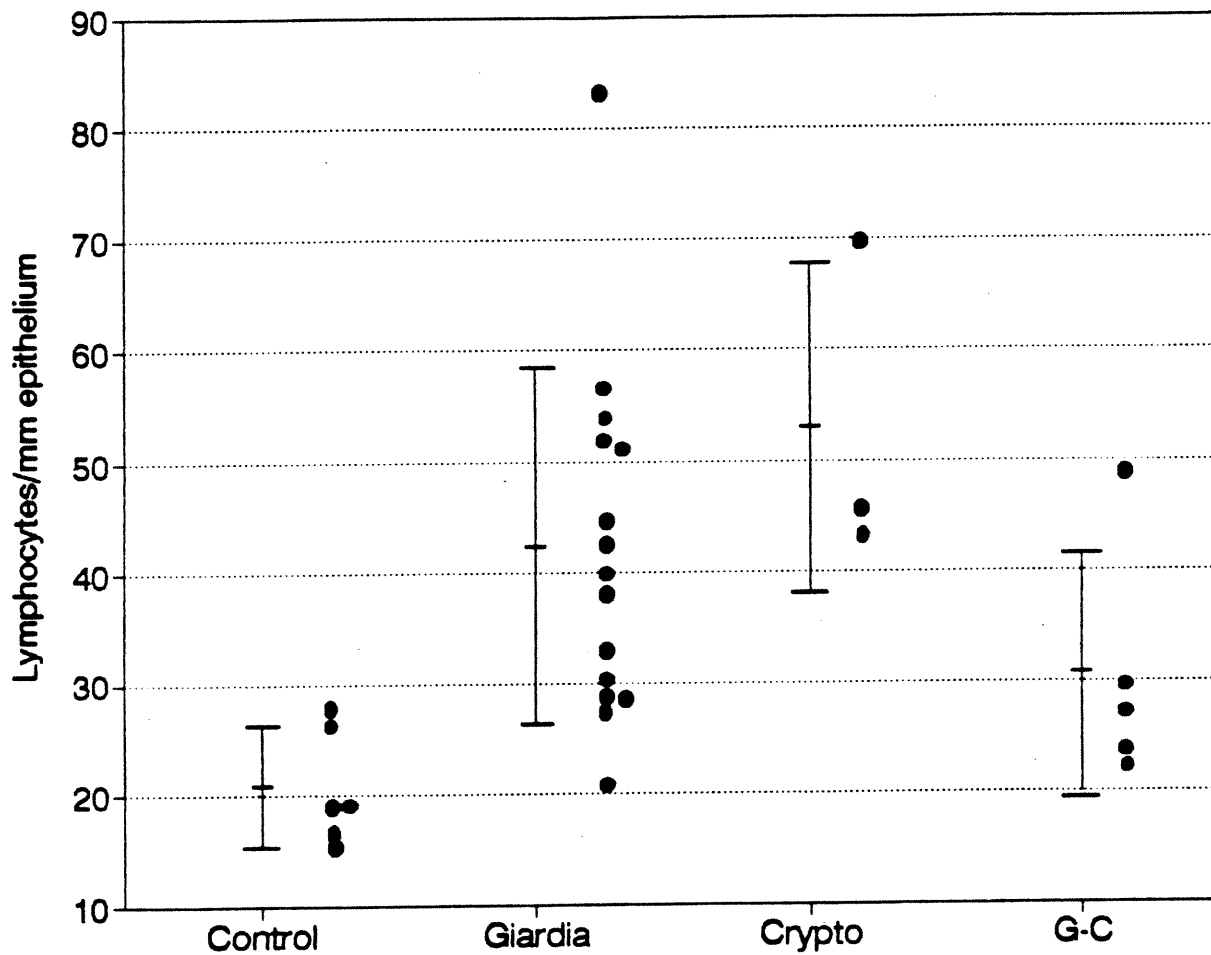
- mucosa damage in giardiasis. In: E.A. Meyer (Editor), *Giardiasis*. Elsevier, Amsterdam, pp. 153-174.
- Gillon, J., 1985. Clinical studies in adults presenting with giardiasis to a gastro-intestinal unit. *Scott. Med.* 30:89-95.
- Hoskins, L.C., Winawer, S.J., Britman, S.A., Gottheb, L.S. and Zemcheck, N., 1967. Clinical giardiasis and intestinal malabsorption. *Gastroenterology* 53:265-279.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. (Editors), 1995. *Manual of Clinical Microbiology Sixth Edition*. ASM Press, Washington, D.C., 1482 pp.
- Olson, M.E., McAllister, T.A., Deselliers, L., Morck, D.W., Cheng, K.-J., Buret, A.G. and Ceri, H., 1995. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am. J. Vet. Res.*, 56:1470-1474.
- Roberts-Thomson, I.C., Stevens, D.P., Mahmoud, A.A.F. and Warren, K., 1976. Giardiasis in the mouse; an animal model. *Gastroenterology* 71:57-61.
- Rosekrans, P.C.M., Lindeman, J. and Meyer, C.J.L., 1981. Quantitative histological and immunohistochemical findings in jejunal biopsy specimens in giardiasis. *Virchows Archiv Pathol. Anat.*, 393:145-151.
- Taminelli, V. and Eckert, J., 1989. Häufigkeit und geographische Verbreitung des *Giardia* Befalls bei Wiederkäuern in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 131:251-258.
- Taminelli, V., Eckert, J., Sydler, T., Gottstein, B., Corboz, L. and Hofmann, M., 1989. Experimentelle Infektion von Kälbern und Schafen mit bovinen *Giardia*-isolaten. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 131:551-564.
- Xiao, L., 1994. *Giardia* infections in farm animal. *Parasitology Today* 10:436-438.



**Fig.1:** Cross-section of the proximal jejunum of a calf infected with *Giardia* (100X). The villi and the space between crypts are filled with inflammatory cells. Villi are atrophied and crypt distortion is noted.

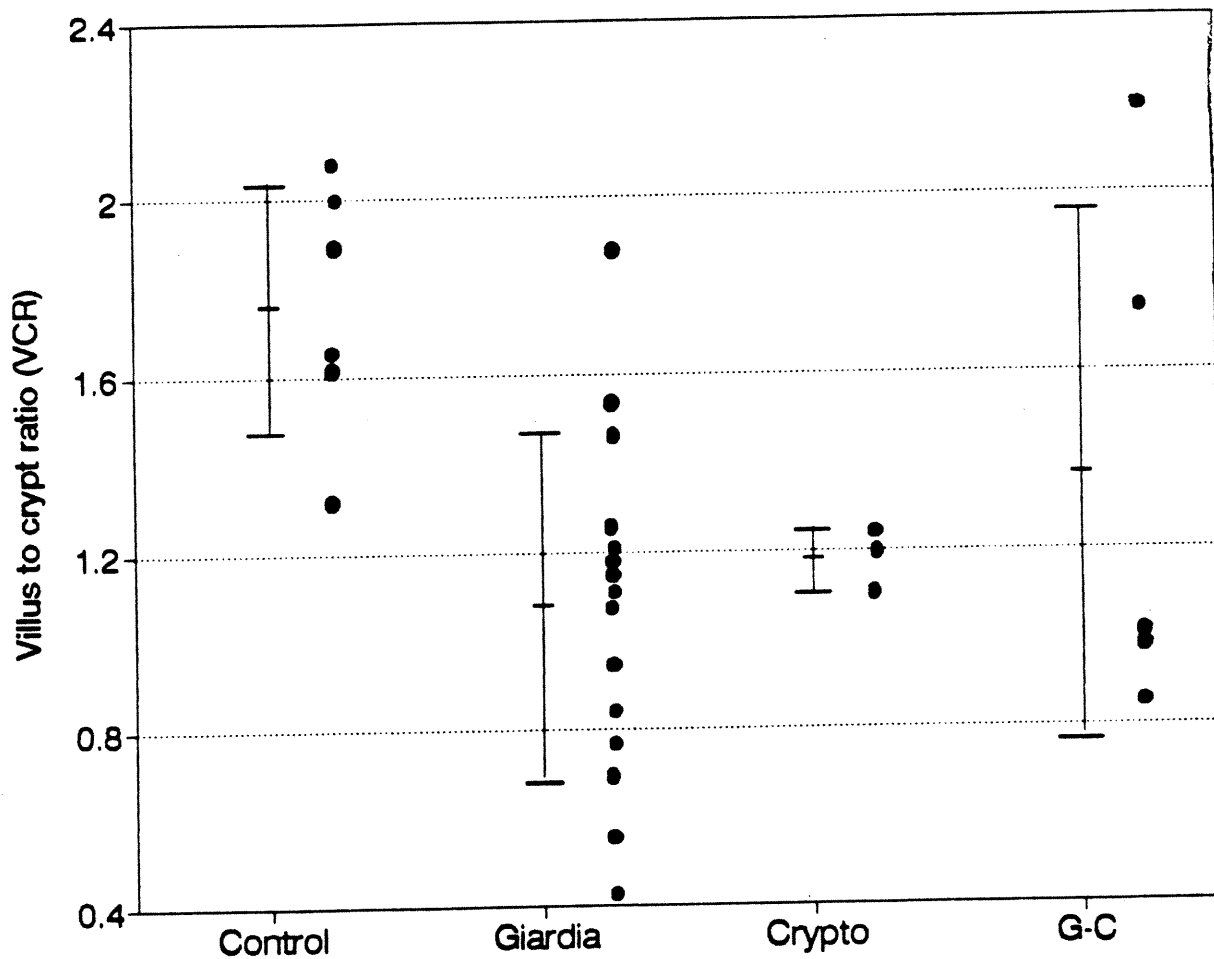


**Fig.2:** Cross-section of the proximal jejunum of a calf used as a control (100x). Cellular infiltration by mononuclear cells is light. The villi are long and no distortion of the crypts are seen.



**Fig.3:** Number of intraepithelial lymphocytes per millimeter of jejunum tissue (IEL) for each group of calves. Each dot represents one calf. The mean number of IEL for each group, together with S.D., is presented.





**Fig.4:** Villus to crypt ratio (VCR) for each group of calves. The VCR was measured at 100X (magnification) with a morphometric analysis computer program. The height of the villi and crypts was determined on 10 specimens. Each dot represents one calf. The mean of the villus to crypt ratio for each group, together with S.D., is presented.

## CHAPITRE 2

### **Rapid spreading of giardiosis and cryptosporidiosis in calves housed in individual pens**

**Nicole Ruest, G.M. Faubert, Y. Couture**

(Sera soumis à Veterinary Parasitology)

#### **Abstract**

Thirty-five seven to 10 days old calves were bought at a local auction to study the pathology of giardiosis after experimental infection. However, a fecal specimen taken upon their arrival revealed that three animals were already passing *Giardia* cysts and two of them were passing *Cryptosporidium* oocysts. Dimetridazole was given to calves infected with *Giardia* to prevent transmission of the infection to other calves in the herd. In spite of the treatment, new cases of giardiosis appeared afterwards. Therefore, we decided to study the spreading of the natural infections in the herd by taking stool samples from all calves three times per week for the next month. Within a month, all calves were passing cysts or oocysts in their stool. The cumulative infection rates for *Giardia* and *Cryptosporidium* were 89% and 60% respectively. Two of the three calves who were treated with dimetridazole at the beginning of the trial, became infected again three to four weeks later. Diarrhea was a common clinical symptom observed in the infected calves. Four of the eight calves that were followed for 4½ months excreted cysts daily for a period of 33 to 77 days while the others excreted cysts intermittently. The mean number of *Giardia* cysts passed was  $9.9 \times 10^3$  cysts per gram of feces.

*Keywords: Giardia sp.; Cryptosporidium sp.; Calves-Spreading-Natural infection*

## **1. Introduction**

*Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. are two intestinal parasites frequently seen in feces of calves. Prevalence studies suggest that these intestinal protozoa in cattle have a worldwide distribution (Xiao, 1994; Angus, 1990). *Giardia* sp. infections have been reported in North America, Europe, Africa and India (reviewed by Xiao, 1994). Prevalences varying from 1 to 100% have been found in those countries (Xiao, 1994). Occurrence of the infection appears to be lower in adults (Xiao, 1994).

Calves may become infected with *Giardia* within four days of birth (Xiao and Herd, 1994). A prepatent period of eight days was reported for giardiasis in cattle when non-infected calves were mixed with infected ones (Pavlásek, 1984) or when they were infected with  $1 \times 10^6$  cysts or less (Taminelli et al., 1989). Willson (1982) reported a prepatent period of only one day after feeding a 41 days old calf with milk contaminated with *Giardia* cysts. It is worth mentioning that at least three factors can contribute to the variation in length of the latent period in giardiasis: the genetic differences among *Giardia* spp., the host resistance to the infection and the number of cysts ingested.

Similar incubation periods were found in calves infected with *Cryptosporidium* sp. and the infection also appears soon after birth. Anderson (1981) followed the pattern of *Cryptosporidium* oocyst release in calves immediately after birth. He observed that calves excrete oocysts five to 12 days after birth. These results were confirmed by Pavlásek (1982) who reported the presence of *Cryptosporidium* oocysts in four days old calves.

Mixed infections with *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. in calves have been reported

under natural conditions (Xiao and Herd, 1994). Shedding of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts peaked in calves at one and two weeks of age respectively. High number of *Giardia* cysts were passed in the calves feces until weaning at seven weeks. Most calves continued to pass low numbers of *Giardia* cysts after weaning. Shedding of *Cryptosporidium* oocysts was low in three weeks old calves and were released sporadically afterwards. Calves as old as 20 weeks were still passing *Cryptosporidium* oocysts.

In this study, we describe the rapid spreading of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in calves housed in individual pens. In order to follow the propagation of these two intestinal parasites in the herd, stool samples from each calf were taken three times a week. The samples were prepared by concentration methods in order to increase our chances of detecting both parasites and the specimens were examined under the microscope.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animals**

Thirty-five holstein calves between seven to 10 days of age were bought at a local auction. The weight of these animals ranged between 53.6 and 61.8 kg (average weight: 57.3 kg). They were kept in individual pens in a premise which had never been occupied by calves before. The premise had been used to house pigs a month before, but thorough cleaning and disinfection was done. The pens were lathed and elevated from the ground. Limited contact was possible between calves. The animals were fed a commercial milk replacer before weaning the animals at eight weeks of age. A standard calf diet was given first at two weeks of age and was the major food after weaning. Water was available ad libitum. Each calf had its own pail.

## ***2.2 Samples collection and examination***

Upon arrival, rectal stool samples from all calves were taken and examined by microscopy. The zinc sulfate concentration technique was used to increase the chances of detecting *Giardia* cysts and the sugar flotation technique was used as a concentration technique to detect *Cryptosporidium* oocysts. Cysts and oocysts were first observed at 200x magnification and their identification was confirmed at 400x magnification.

To follow the spreading of the infection, stool specimens were collected three times a week for one month. Faecal specimens were kept at 4°C until preparation for the concentration method. All samples were examined within 36 hours after collection. The fecal samples were graded according to their physical appearance; 0=normal, 1=partly formed feces, 2=mostly watery content and 3=watery diarrhea.

## ***2.3 Treatment of Giardia infected calves***

The three calves who were passing *Giardia* cysts at the beginning of the trial received 50mg/kg of dimetridazole (Emtryl; Rhône-Poulenc) orally with a syringe once a day for five consecutive days. Treatment began three days after arrival.

## ***2.4 Giardia cyst quantification***

Stool specimens from eight of the 35 calves were taken for a period of 4½ months. Five grams of feces taken from the calves rectum was put in a container containing 20 ml of a sodium acetate (1.5%), acetic acid (2%) and formaldehyde (4%) (SAF) solution that was used as a preservative. The zinc sulfate concentration method was used to increase the detection sensitivity. The number of cysts present was determined using an hemocytometer chamber.

The stool specimens were filtered through one layer of cheesecloth. Twelve ml of the fecal

suspension was transferred in a 15 ml centrifuge tube. The suspension was centrifuged at 1,500 X *g* for 10 min. The supernatant was decanted, and the pellet was dissolved in 7 ml of zinc sulfate and a second centrifugation at 1,500 X *g* for 10 min was done. The supernatant was transferred to another 15 ml centrifuge tube. Tap water was added to fill the centrifuge tube to the brim and it was centrifuged at 1,500 X *g* for 5 min. The supernatant was again removed, and the pellet was dissolved in 1 ml of saline 0.85%. The reconstituted specimen was used to determine the number of cysts per gram of feces. Cyst numbers are expressed as log<sub>10</sub> per gram of feces.

## ***2.5 Statistical analysis***

Pearson's chi-square statistic was used to test the hypotheses of no difference in numbers of diarrheic stool found in *Giardia* infected calves between day one to 16 of cyst excretion and day 17 to 32. The Mann-Whitney test was used to test the hypotheses of no difference in intensity of the diarrhea in *Giardia* infected calves between day one to 16 of cyst excretion and day 17 to 32. The Krukall-Wallis one way analysis by ranks was used to test the hypotheses of no association between the intensity of cyst excretion and the severity of the diarrhea in the eight calves which we have followed the cyst excretion for 4½ months. For all the statistical analysis, a level of 0.05 or lower was considered as significant.

## **3. Results**

### ***3.1 Spreading of the infection***

The first examination performed upon arrival (day 0) revealed that three of the 35 calves (9%) were passing *Giardia* cysts (Fig.1). These calves were treated with dimetridazole (Emtryl; Rhône-Poulenc) and on day seven after arrival, no cysts were detected in their feces. However, eight calves were found shedding *Giardia* cysts that day. Therefore, at

day seven after arrival, the cumulative infection rate was 31% (11/35). On day 13, these eight calves were still passing cysts and 10 new cases of giardiasis were diagnosed. Two days later (day 15), two new cases of *Giardia* were observed. Afterwards, some calves were passing cysts intermittently. On day 17, two calves previously found infected with *Giardia* sp., did not pass cysts. Therefore, only 18 of the 20 calves previously diagnosed were still passing cysts at day 17. Four new cases of giardiasis were found also. On day 20, three calves previously diagnosed positive did not pass cysts and two more calves were found positive. On day 21, nine of the 35 calves were sent to slaughter. Six of them were infected with *Giardia* sp.. The last two cases of giardiasis were diagnosed on day 24 and 29 respectively. Interestingly, two of the three calves who were treated at the beginning of the trial began to shed cysts again on day 24 and 29. The cumulative infection rate for *Giardia* after 29 days was 89% (31/35) (Fig.1).

Oocysts of *Cryptosporidium* were observed in the feces of two of the 35 calves (6%) upon arrival (day 0) (Fig.2). One week later (day 7), 12 new cases of cryptosporidiosis were diagnosed. One of the two calves found positive upon arrival was still passing oocysts. On day 13, five more cases were observed. Meanwhile, nine of the 14 calves previously diagnosed were still shedding oocysts. At that time, the cumulative infection rate was 54% (19/35) (Fig.2). After day 13, the number of calves passing *Cryptosporidium* oocysts began to decrease. On days 15, 17 and 20 after arrival, oocysts were found in the feces of 11, five and three calves respectively. On day 21, nine of the 35 calves were sent to slaughter. Four of them were infected with *Cryptosporidium* sp.. The last two cases of cryptosporidiosis were diagnosed on day 27 and 29. Only one calf previously diagnosed on day 13 was still shedding oocysts on day 29. The cumulative cumulative infection rate for *Cryptosporidium* after 29 days was 60% (21/35) (Fig.2).

### 3.2 Clinical symptom

All calves infected with *Giardia* or *Cryptosporidium* had diarrhea during the period of observation. The intensity of the diarrhea was similar with both parasites. Appetite remained good in these calves despite the fact that diarrhea was present. Diarrhea was a feature more common during the first 16 days of cyst excretion than during the following days. Thirty-seven per cent (55/150) of the stool samples collected from calves infected with *Giardia* between day one to 16 of cyst excretion were diarrhoeic compare to 28% (28/101) between day 17 to 32 (Table 1). However, this difference is not statistically significant ( $P=0.14$ ). The intensity of the diarrhea was also slightly higher in calves infected with *Giardia* between day one to 16 of cyst excretion compared to day 17 to 32 but the difference was again not statistically significant ( $\alpha=0.05$ ). The mean diarrhea intensity was 1.43 during the first 16 days of cyst excretion versus 1.35 in the next 16 ones (Table 1). Among the calves whom we followed the cyst excretion for 4½ months, three had diarrhea until day 106 after arrival. One calf had diarrhea until day 129. Using the Kruskal-Wallis one-way analysis by ranks ( $\alpha=0.05$ ), no significant statistical relation was observed between the number of cyst excreted and the intensity of the diarrhea.

### 3.3 Excretion patterns of *Giardia* cysts

The shedding of *Giardia* cysts lasted for a mean period of  $105 \pm 19$  days for the eight calves whom cyst excretion was followed. One calf (#7) was still excreting cysts at day 129 when it was sent to the house slaughter (Fig.3). On the other hand, calves #2 and #16 excreted cysts for less than 80 days. Two patterns of cyst-release were observed. Four calves (#2,#18,#29,#30) passed cysts constantly for a period of 33 to 77 days and thereafter the excretion became intermittent. On the other hand, calves #5,#7,#16 and #26 passed cysts intermittently as soon as the infection began (Fig.3). The number of cyst released was higher at the beginning of infection. For example, the mean  $\log_{10}$  of cyst number per gram of feces was 4.07 for the first 15 days of infection. Afterwards, the



number of cysts dropped to  $3.0 \log_{10}$  and was maintained at this level until day 79. Eighty days after the beginning of excretion, the mean  $\log_{10}$  of cyst number per gram was 2.07 and was maintained at this level until day 114. After day 115, the number of cyst released was very low (1.01). The average number of cyst passed by these calves during the entire period was  $9.9 \times 10^3$  cysts per gram of feces ( $4.00 \log_{10}$ ). The highest number of cysts counted in one faecal specimen reached  $1.6 \times 10^6$  ( $6.2 \log_{10}$ ) cysts per gram of feces on day 3 (calf #2).

#### 4. Discussion

High prevalences of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in calves have already been reported in herds (Xiao and Herd, 1994). However, the propagation of these infections in calves housed in an uncontaminated area has never been reported. Calves in this study, were raised in individual pens in a premise which has been thoroughly disinfected and where no calves were kept before. In spite of limited physical contacts between the calves in the premise, all calves became infected with one or both parasites.

Incubation periods of four to eight days and five to 12 days were reported for *Giardia* and *Cryptosporidium* respectively (Anderson, 1981; Pavlásek, 1984; Taminelli et al., 1989; Xiao and Herd, 1994)). In this case, it is likely that some of these calves have acquired the infection at their birth place or at the local auction. The calves stayed together in a small pen for about 10 hours at the local auction. This short period of time where physical contacts occurred, may had been sufficient to allow the transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium* between the calves. However, the cases of giardiasis and cryptosporidiosis that appeared two or more weeks after arrival in our premises were likely infections which transmission occurred in our facilities. Because no physical contacts were allowed between the calves, the cysts or oocysts were probably accidentally carried from pen to pen by the employees and/or veterinarians nursing the calves. It is also possible that

the cysts and oocysts were spread when the floor was hosed with water. The possible transmission of oocysts by aerosol was ruled out since this mode of transmission usually occurs in poultry which are infected with a different specie of *Cryptosporidium* (Lindsay et al., 1986).

*Giardia* cysts appears more contagious than *Cryptosporidium* oocysts since the infection rates were 89% and 60% respectively. Moreover, *Giardia* infections lasted longer than *Cryptosporidium* infections. Some calves passed cysts for more than four months. Long lasting excretion of *Giardia* cysts has been also reported by Taminelli et al.(1989) and Xiao and Herd (1994) in calves infected experimentally or naturally. All calves infected with *Giardia* presented intermittent diarrhea. This clinical observation was also reported in both natural and experimental infections (St-Jean et al., 1987; Xiao et al., 1993; Taminelli et al., 1989). Diarrhea was more severe in the first two weeks of infection and it corresponded with a higher cysts excretion rate. This may explain the intensity of the diarrhea.

Two types of cyst excretion pattern were observed with *Giardia*. Some calves excreted cysts constantly and others intermittently. Using the gerbil-*Giardia* model, Faubert and Belosevic (1990) observed similar variations in the mode of cyst release after infecting the animals with different human isolates. In this case, it is unlikely that the variations observed in the mode of cyst release are due to different strains of *Giardia* since calves were purchased in the same region. Factors such as the host's immunity and the ability to mount a good immunologic response against *Giardia* have to be considered. Belosevic et al. (1984) have shown that different strains of mice have different ability to recognize or process *G. muris* antigen, thus affecting the immunological response against the parasite at the gut level which resulted in increased establishment of the trophozoites and a higher rate of cyst production. This may be the case in these calves since some excreted cysts for

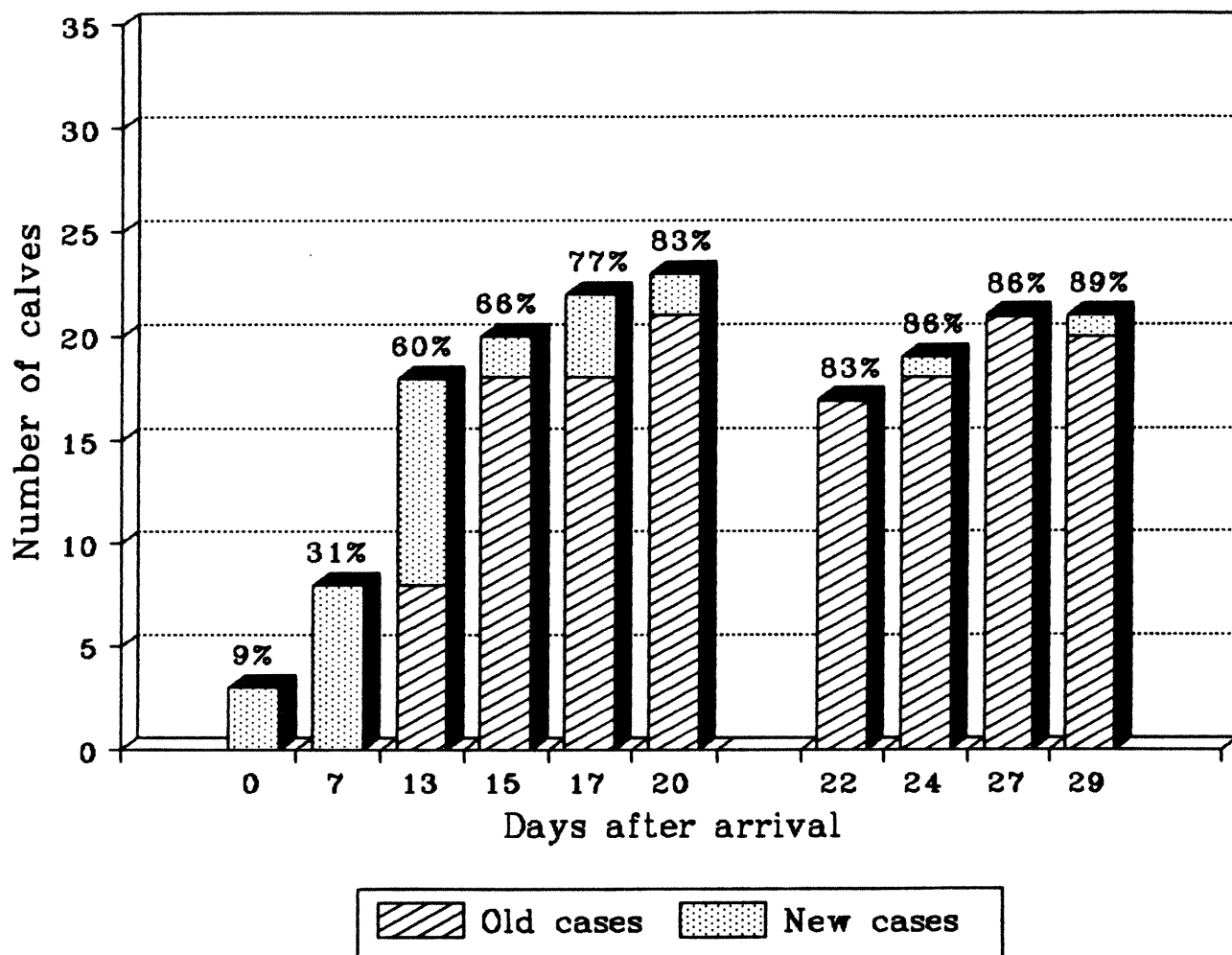
long lasting periods while others cleared the infection quite rapidly. However, the immune status of these animals was not evaluated. Therefore, it is difficult to draw any conclusion on this finding.

Considering the high excretion rates of *Giardia* in calves and the contagiousness of *Giardia* and *Cryptosporidium* in this specie, calves have to be considered an important source of contamination for the environment. These parasites are easily transmitted between calves even in an environment lightly contaminated. The efficacy of the anti giardial products used for treatment of infected calves seems only transient. Reinfection after treatment was observed in two of the three calves treated with dimetridazole at the beginning of the trial. Treated calves may not have had the time to mount an efficacious immunity against *Giardia* so reinfection was possible. The development of an anti giardial product that could be mixed with the animal feed is necessary if giardiasis wants to be controlled in the bovine specie.

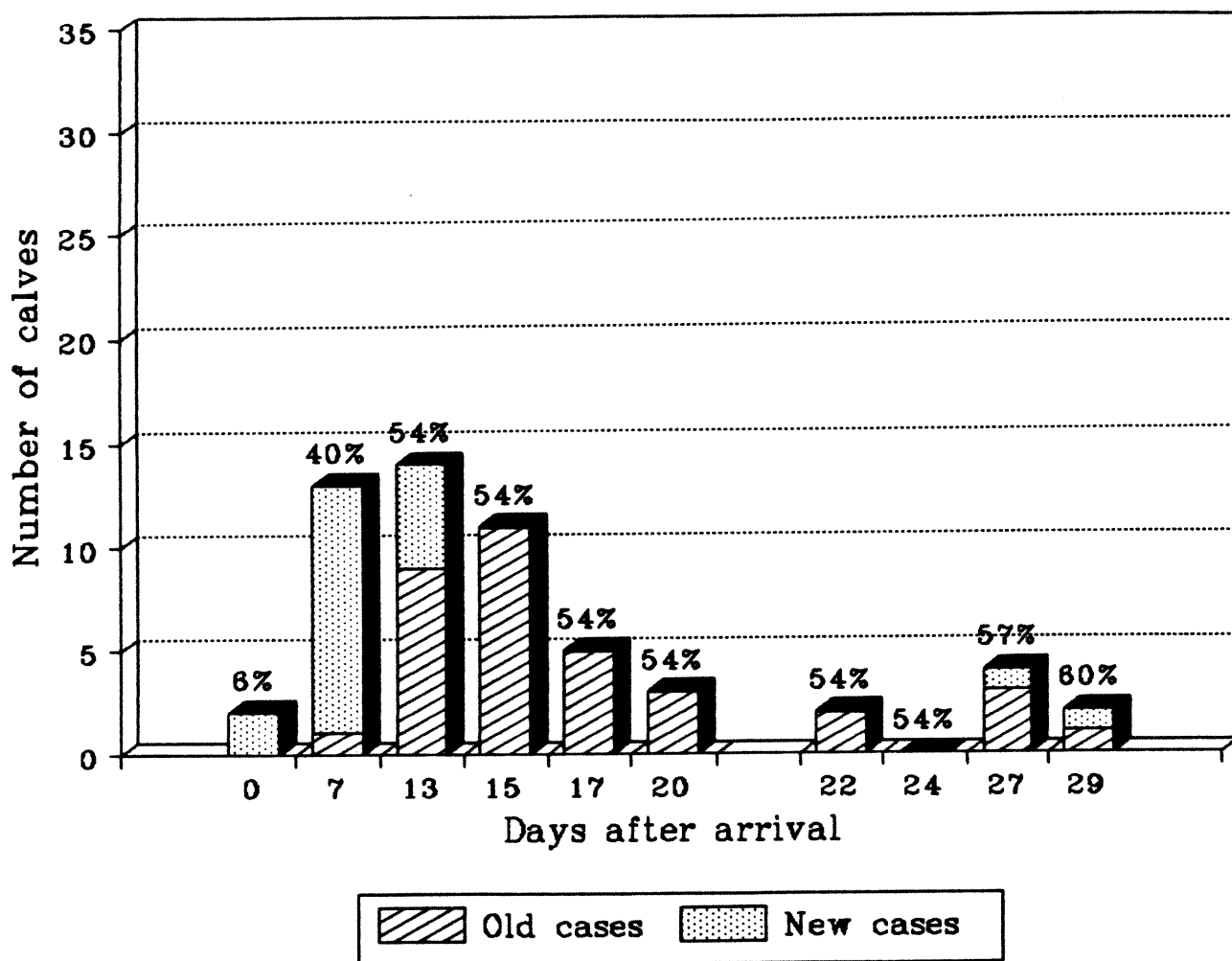
## References

- Anderson, B.C., 1981. Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. JAVMA, 178:982-983.
- Angus, K.W., 1990. Cryptosporidiosis in ruminants. In: J.P. Dubey, C.A. Speer and R. Fayer (Editors), Cryptosporidiosis of Man and Animals. Boca Raton, Florida, pp. 83-103.
- Belosevic, M., Faubert, G.M., Skamene, E., MacLean, J.D., 1984. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Giardia muris*. Infect. Immun., 44:282-286.
- Faubert, G.M. and Belosevic M., 1990. Animal models for *Giardia duodenalis* type organisms. In: E.A. Meyer (Editor), Giardiasis. Elsevier, Amsterdam, pp. 78-90.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Sundermann, C.A., Hoerr, F.J. and Ernest, J.A., 1986. Experimental *Cryptosporidium* infections in chickens: Oocyst structure and tissue specificity. J. Am. Vet. Res., 47:876.

- Pavlásek, I., 1982. Dynamics of the release of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in spontaneously infected calves. *Folia Parasitol.*, 29:295-296.
- Pavlásek, I., 1984. First record of *Giardia* sp. in calves in Czechoslovakia. *Folia Parasitol.*, 31:225-226.
- St-Jean, G., Couture, Y., Dubreuil, P. and Fréchette, J.L., 1987. Diagnosis of *Giardia* infection in 14 calves. *JAVMA*, 191:831-832.
- Taminelli, V., Eckert, J., Sydler, T., Gottstein, B., Corboz, L. and Hofmann, M., 1989. Experimentelle infektion von kälbern und schafen mit bovinen *Giardia*-isolaten. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 131:551-564.
- Willson, P.J., 1982. Giardiasis in two calves. *Can. vet. J.*, 23:83.
- Xiao, L., 1994. *Giardia* infection in farm animals. *Parasitology Today*, 10:436-438.
- Xiao, L. and Herd, R.P., 1994. Infections patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet. Parasitol.*, 55:257-262.
- Xiao, L., Herd, R.P. and Rings, D.M., 1993. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. *Vet. Parasitol.*, 51:41-48.



**Fig.1:** Spreading of giardiosis amongst 35 calves housed in individual pens. Dotted columns represent the number of calves which are passing *Giardia* cysts in their feces for the first time. Cross-bar columns indicate the number of calves who were previously diagnosed positive and are passing cysts that day. The percentage above the columns represents the cumulative infection rate for *Giardia* for each day.



**Fig.2:** Spreading of cryptosporidiosis amongst 35 calves housed in individual pens. Dotted columns represent the number of calves which are passing *Cryptosporidium* oocysts in their feces for the first time. Cross-bar columns indicate the number of calves who were previously diagnosed positive and are passing oocysts that day. The percentage above the columns represents the cumulative infection rate for *Cryptosporidium* for each day.

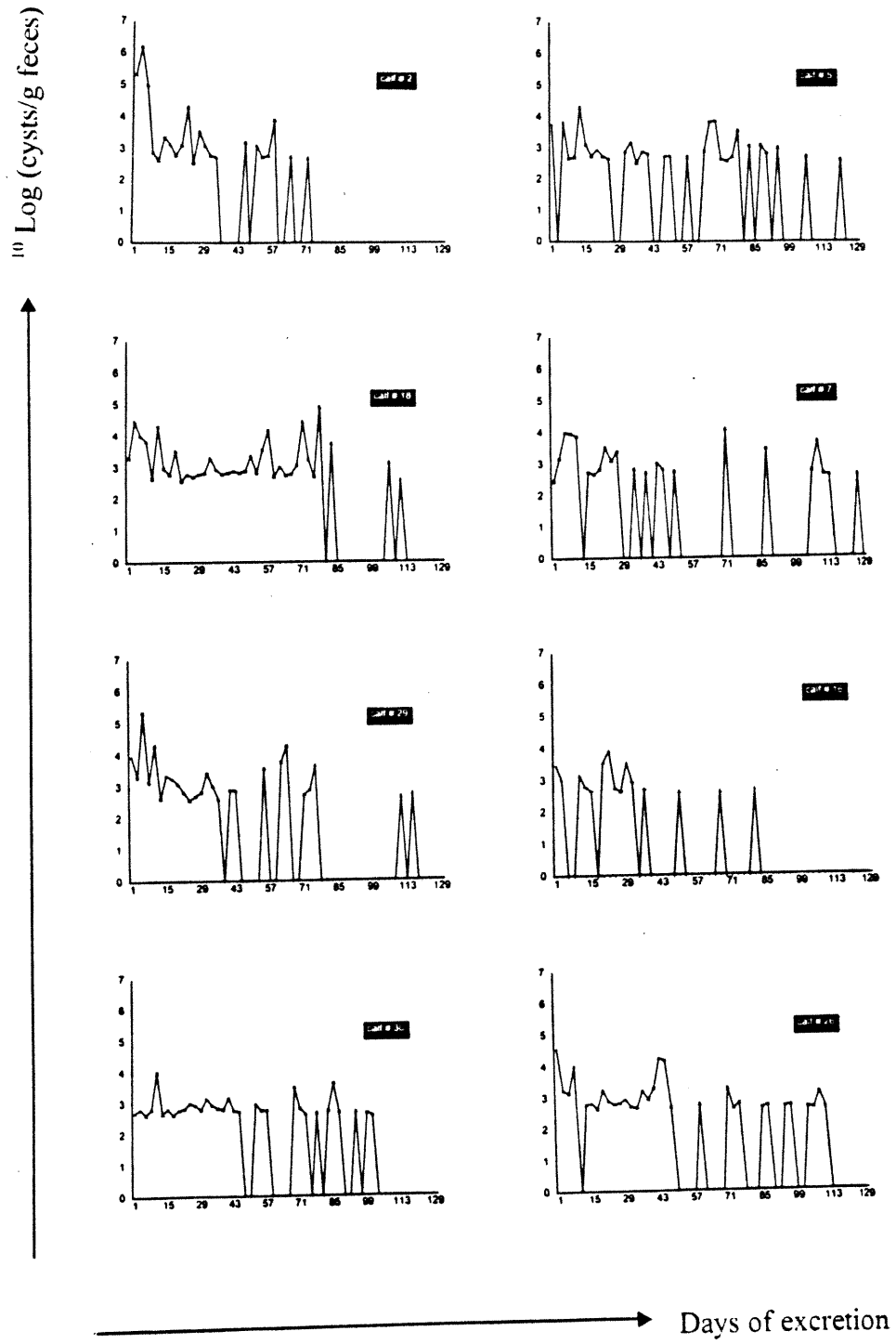


Fig.3: Patterns of *Giardia* cyst release in eight calves infected naturally. Faecal samples from each calf were collected three times per week for 4½ months

**Table 1.** Incidence and intensity of diarrhea in calves infected with *Giardia* sp.

Excretion (days)	No. of specimens <i>Giardia</i> positive	No. of abnormal feces (%)	Mean Intensity diarrhea <sup>a</sup>
1-4	42	17 (40.5)	1.29
5-8	38	16 (42.1)	1.44
9-12	37	14 (37.8)	1.36
13-16	33	8 (24.2)	1.63
Total	150	55 (36.7) <sup>b</sup>	1.43 <sup>c</sup>
17-20	29	11 (37.9)	1.36
21-24	29	4 (13.8)	1.75
25-28	21	3 (14.3)	1.00
29-32	22	10 (45.5)	1.30
Total	101	28 (27.7) <sup>b</sup>	1.35 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Fecal samples were scored 0=normal, 1=partly formed, 2=mostly watery, 3=watery.

<sup>b</sup> Pearson's chi-square test of association revealed no statistical significant difference between day 0 to 16 and day 17 to 32 for the total percentage of diarrheic stools ( $p=0.14$ ).

<sup>c</sup> The Mann-Whitney test revealed no statistical significant difference between day 0 to 16 and day 17 to 32 for the mean diarrhea intensity ( $\alpha=0.05$ ).



## CHAPITRE 3

### **Prevalence and geographical distribution of *Giardia* sp. in bovine dairy farms in Québec**

Nicole Ruest, Gaetan M. Faubert and Y. Couture

(Sera soumis à la Revue Vétérinaire Canadienne)

Giardiosis is a parasitic disease of bovine, human and a wide range of other vertebrates (1), and transmission of the infection occurs via the fecal-oral route (1). In cattle, infection occurs through the contamination of surroundings by infected animals. Calves excrete high numbers of *Giardia* cysts and these young immunologically immature animals are considered to be the most important source of contamination for the bovine specie (2,3). There are reports in the litterature suggesting that giardiosis may be a zoonosis and possibly a zoonothroponosis (4,5). Water supplies receiving agricultural effluent have a higher concentration of *Giardia* cysts than protected watersheds (6). It has been reported that cattle may be an important source or reservoir of *Giardia* for humans (4,6).

Prevalence studies done in humans suggest that *Giardia* is the most common cause of intestinal parasitism (1). Studies done in cattle have reported high prevalence of *Giardia* infections in many parts of the world. Large-scale prevalence studies have been done in Cuba (n=506), Italy (n=274), Switzerland (n=815), the former Soviet Union (n=417), India (n=157) and Costa Rica (n=101). The highest infection rate was observed in India

(51,6%)(7) and the lowest in Costa Rica (1%)(8). Prevalences of 34.3%, 29.8%, 19.3% and 11% were observed in the Soviet Union (9), Switzerland (10), Italy (11) and Cuba (12) respectively. In Canada, the results of only one prevalence study has been reported. Six different farms located in southern Alberta were tested for giardiasis. An overall infection rate of 10.4% was found. No adults (n=26) were positive for *Giardia* cysts, whereas 22.7% of the calves tested (n=23) had cysts in their feces (4). In Québec, concerns about *Giardia* in cattle have risen after finding that 23% of the calves presented at the "Hôpital des grands animaux" of the faculté de médecine vétérinaire between January 1991 and August 1993 were infected by the parasite.

In order to evaluate the prevalence of *Giardia* infection for the bovine species in Québec, 600 dairy farms were randomly selected for sampling. This number was determined so that approximately 5% of the dairy farms of the province were included in the study. Fifty farms in each of the 12 agricultural regions were tested and collection of the samples was done by veterinarians established in each region. Veterinary clinics taking part in the study were selected in regard to their geographical location within the region. Samples were thus taken equally throughout the entire region. The 5 clinics chosen in each region had to select, at random, 10 dairy farms in their practice and on each of the farms, 5 calves 2 to 16 weeks of age were randomly sampled. We decided to sample 5 animals per farm in order to increase our chances of finding *Giardia* since it is recognized that calves shed cysts intermittently (2). On each farm a composite sample made up of 1 to 2 g of fecal material from each of the 5 calves was prepared in a screw-cap container. Twenty ml of sodium acetate (1.5%), acetic acid (2%) and formaldehyde (4%) (SAF) solution was added to each container to preserve *Giardia* cysts. Samples were sent to the parasitology laboratory of the Faculté de médecine vétérinaire of St-Hyacinthe where the zinc sulfate concentration technic was used to search for *Giardia* cysts. Veterinarians who sent the samples had to note the number of calves 0 to 6 months of age present on each farm and

the type of floor used (bedding, elevated pens or exterior). They had to enquire also if diarrhea was a problem in 0 to 6 months old calves on the farm.

Univariate analysis of variance was used to test the hypothesis of no difference in *Giardia*'s prevalence rate between regions as well as to test the hypothesis of no difference between *Giardia* positive and *Giardia* negative farms in respect to the calf population, the type of floor and the severity of the diarrhea. Pearson's chi-square statistic was used to test the hypothesis of no difference in *Giardia*'s prevalence rate between regions and between the region with the lowest and the region with the highest prevalence rate. Pearson's chi-square statistic was used also to test the hypothesis of no association between *Giardia* infection and diarrhea. The T test was used to test the hypothesis of no association between *Giardia* infection and the calf population on the farms or in the regions studied and between *Giardia* infection and the number of farms in the region. The exact 2-tailed probability of Fisher was used to test the hypothesis of no association between *Giardia* infection and the type of floor used. Multivariate logistic regression analysis was used to estimate the probability of a farm being contaminated with *Giardia* after considering effects of calf population, the type of floor used and diarrhea. The region was considered as a potential confounding factor that might modulate the association between *Giardia* infection and the variables examined. All statistical analysis were performed using a statistical computer program (BMPD Statistical Software, Version PC90, Los Angeles, California). Two sided tests and a level of significance of 0.10 were used for all analysis.

Samples were taken between May 1995 and February 1996. We had a good response from veterinarians chosen for the project with 89.5% of the clinics selected sending us some samples and a total of 505 farms were verified for the presence of *Giardia* sp. A total of 45.7% (231/505) of the farms were found infected with the protozoan. *Giardia* sp. infections were observed in all 12 agricultural regions of Québec. The Nord-de-Montréal

region had the highest infection rate (54%) and the Abitibi-Témiscamingue region the lowest (30.4%) (Figure 1). The difference between the prevalence rates of these 2 regions was considered significant ( $p=0.061$ ). No difference was detected between *Giardia* positive and *Giardia* negative farms with respect to the calf population, the type of floor used or the severity of the diarrhea. The mean number of calves for *Giardia* positive farms was  $13.4 \pm 6.8$  and for *Giardia* negative farms,  $13.6 \pm 7.2$  ( $P=0.82$ ) (Table 1). The multivariate analysis, adjusted for region, indicated that *Giardia* negative farms was significantly associated ( $P=0.1$ ) with the fact that calves were kept outside of the barn. The odd ratio (OR) of being infected with *Giardia* for a calf kept inside compared to a calf kept outside was 3.04 (95% CI 0.79 to 11.6). No other variable was associated with *Giardia* infection.

The prevalence rates obtained for each region are most likely an underestimation of the true prevalence of *Giardia* infection in those regions. Infected animal shed cysts intermittently and only one fecal sample was collected from each animal. Perhaps some of the calves sampled were infected but not shedding cysts the day of collection. The significant difference in the prevalence rates noted between the Nord-de-Montréal region and the Abitibi-Témiscamingue region is difficult to explain. Even if samples from the Northern region were taken during winter and those from the Nord-de-Montréal in the fall, we do not think that the climate had an effect on the results obtained because the calves are all kept inside in those regions, the environmental factor probably does not influence the results. Less samples were taken from the Abitibi region (23 versus 50) which may explain the difference observed. No relation was noted between *Giardia* infection and diarrhea. Since many factors or organisms other than *Giardia* that can cause diarrhea in calves were not verified in this study, this last finding is inconclusive. Other studies have shown that *Giardia* infection can cause diarrhea and impair weight gain in calves (3,7,13,14).

Our results suggest that one way of lowering the infection rate of *Giardia* would be to keep calves outdoors. Cysts shed outside are confronted to environmental changes. In hot and dry conditions, cyst dessication is possible and when temperatures are below the freezing point, cysts do not survive (15). The overcrowding usually seen when calves are kept inside the barn, is not a problem when calves are kept outside in hutches, thus decreasing the microbial pressure. However, no relation could be established between the presence of *Giardia* and the number of calves kept on the farm. Informations concerning the population density and lodging space would have been necessary to interpret this finding. St-Jean *et al.* suggested that using calf hutches reduces *Giardia* transmission (13). A thorough cleaning of the hutches between calves and relocating these hutches before their next utilization is necessary to maximize the efficacy of this preventive method. Desinfection of the premises with a 2 to 5% phenol or lysol solution has been suggested to destroy *Giardia* cysts (13). Our past experience in the college's large animal clinic with *Giardia* and disinfectants has shown that flame sterilization of the premises is the only totally effective way to eliminate this protozoan.

### **Acknowledgements**

Financial support for this project was provided by " Le Fonds du centenaire" of the Faculté de médecine vétérinaire of l'Université de Montréal.

The authors sincerely thank all the veterinary clinics, their staff and practitioners who helped us collect the data. We thank also Dr. Alain Villeneuve for welcoming us and allowing us to work in his laboratory and Dr. Julie Paré for statistical analysis.

### **References**

1. Adam RD. The biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev 1991; 706-732.
2. Xiao L, Herd RP. Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves.

- Vet Parasitol 1994; 55:257-262.
3. Xiao L, Herd RP, Rings DM. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. Vet Parasitol 1993; 51:41- 48.
  4. Buret A, denHollander N, Wallis PM, Befus D, Olson ME. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. J Inf Dis 1990; 162:231-237.
  5. Faubert GM, Bemrick WJ, Erlandsen SL. Is giardiasis a true zoonosis? Parasitol Today 1988; 4:66-71.
  6. LeChevallier MW, Norton WD, Lee RG. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. Appl Environ Microbiol 1991; 57:2610-2616.
  7. Deshpande PD, Shastri UV. Incidence of *Giardia* infection in calves in Maharashtra State, India. Trop Anim Health Prod 1981; 13:34.
  8. Oviedo MT, Araya LN, Hernández F. Agentes bacterianos, parasitarios y virales involucrados en la etiología de la diarrea de terneros en Costa Rica. Ciencias Vet Costa Rica 1987; 9:29-34.
  9. Nikitin VF, Taichinov UG, Pavlásek I, Kopacka, M. Prevalence of *Giardia* protozoa in calves. Veterinariya (Moskva) 1991; 6:33-34.
  10. Taminelli V, Eckert J. Häufigkeit und geographische verbreitung des *Giardia*-befalles bei wiederkäuern in der Schweiz. Schweiz Arch Tierheilk 1989; 131:251-258.
  11. Canestri-Trotti G, Pomilio F, Visconti S. Indagine parassitologica sulla fauna protozoaria intestinale di vitelli allevati in provincia di Chieti. Atti della Soc Ital di Buiatria 1986; 18:473-479.
  12. Alonso M, Blandino T, Gomez C. Protozoos intestinales en terneros: Extensión de invasión en heces fecales. Rev Salud Anim 1986; 8:313-315.
  13. St-Jean G, Couture Y, Dubreuil P, Fréchette JL. Diagnosis of *Giardia* infection in 14 calves. J Am Vet Med Assoc 1987; 191:831-832.

14. Willson PJ. Giardiasis in two calves. *Can Vet J* 1982; 23:83.
15. Bingham AK, Jarroll EL, Meyer EA et al. *Giardia* sp.: Physical factors of excystation *in vitro* and excystation vs. eosin exclusion as determinants of viability. *Exp Parasitol* 1979; 47:284-291.

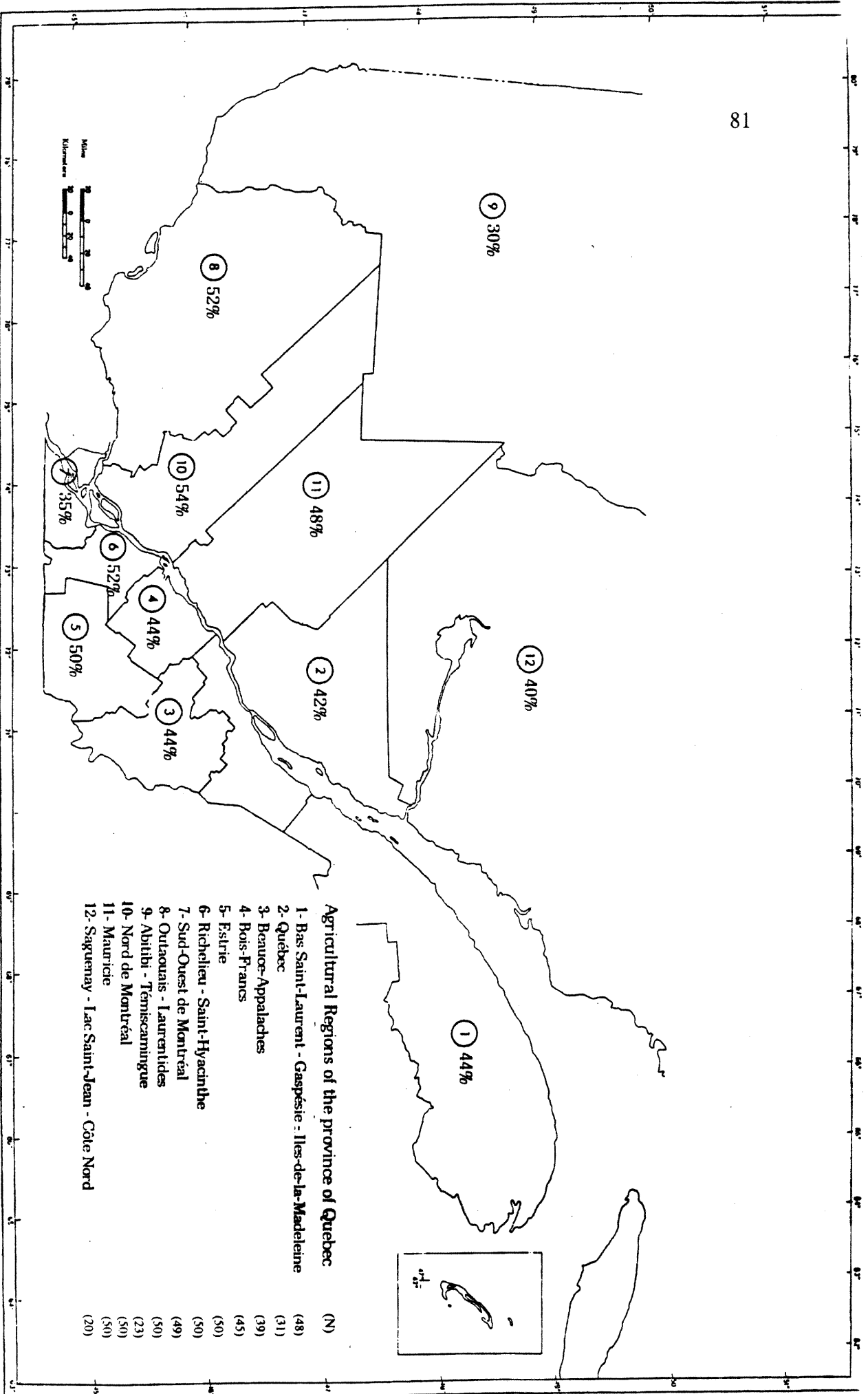


Figure 1. Prevalence and geographical distribution of *Giardia* in dairy farms in the province of Quebec.



**Table 1.** Mean number of calves, presence of diarrhea and type of floor used in *Giardia* positive farms and negative farms.

	Farm		<i>P</i> value
	<i>Giardia</i> (+)	<i>Giardia</i> (-)	
Mean number of calves	13.42±6.75	13.57±7.23	0.82
Diarrhea (+)	61 (226)*	78 (261)	0.48
Floor: Litter	217 (227)	249 (265) }	0.34
Elevated pens	7 (227)	7 (265) }	
Exterior	3 (227)	9 (265) }	

\* Number of samples

## DISCUSSION

L'existence de *Giardia* sp. est reconnue chez l'espèce bovine depuis près d'un siècle (64). Cependant, la relation entre le protozoaire et le bovin ne fut pas étudiée de façon approfondie. Dans la littérature, le potentiel pathogène de *Giardia* sp. chez le bovin fut suggéré par la présence de signes cliniques chez l'animal infecté (171,178,215,240,249). Toutefois, personne n'a pu confirmer ce rôle pathogène chez le bovin ni si les signes cliniques observés pouvaient lui être attribués.

### 1. Pathologie intestinale

L'examen histopathologique a révélé la présence d'inflammation et d'atrophie villositaire dans le jéjunum proximal des veaux infectés à *Giardia* sp.. Ces lésions sont, sans équivoque, attribuables au protozoaire car aucun autre agent pathogène intestinal ne fut isolé chez ces veaux. De plus, la présence de *Giardia* sp. fut notée dans le jéjunum de plusieurs veaux et des lésions similaires avaient déjà été observées chez l'humain lors de giardiose (77,203,245). Le mécanisme exact par lequel *Giardia* sp. cause de l'atrophie villositaire demeure cependant inconnu. Certains ont proposé l'existence d'une exotoxine sécrétée par le parasite, capable d'endommager les entérocytes (94,177); et d'autres ont plutôt proposé qu'une lectine accélérerait le taux de remplacement des entérocytes (129). Ces hypothèses restent à vérifier. Le degré d'atrophie des villosités dans le jéjunum des veaux infectés à *Giardia* sp. s'est avéré relié au degré d'inflammation. En présence d'inflammation sévère, l'atrophie villositaire était marquée; lorsque l'infiltration cellulaire était légère, peu ou pas d'atrophie était notée dans le jéjunum. Cette relation fut constatée également chez des patients humains atteints de giardiose (203). La malabsorption observée chez l'humain en présence de lésions intestinales sévères (58,203,245) ne fut toutefois pas rapportée chez les veaux car ce syndrome clinique ne fut pas évalué.

L'analyse morphométrique réalisée sur le jéjunum proximal des veaux infectés à *C. parvum* a révélé une réaction inflammatoire modérée à sévère et aucune atrophie villositaire. Le site de prédilection du parasite étant la partie distale du jéjunum et l'iléon (157), il est possible que les lésions se situaient à ces endroits plutôt qu'au jéjunum proximal où l'étude morphométrique a eu lieu. Aucune atrophie n'était présente également dans le jéjunum des veaux infectés à la fois à *Giardia* sp. et à *C. parvum*. De plus, l'infiltration cellulaire était très peu marquée, voire similaire à celle présente dans le jéjunum des veaux du groupe témoin. L'existence d'une compétition antagoniste entre les deux protozoaires est une hypothèse intéressante pour expliquer cette non-différence. Toutefois, celle-ci s'avère peu probable car le site de prédilection de ces protozoaires diffère dans le petit intestin. Le faible nombre de veaux dans le groupe d'infection mixte (n=5) pourrait expliquer sa non démarcation face au groupe témoin en regard des critères étudiés.

## **2. Nature infectieuse de *Giardia* sp. et de *Cryptosporidium* sp.**

La giardiose et la cryptosporidiose se sont révélées des infections très contagieuses. L'élevage des veaux dans des cages individuelles s'est révélé insuffisant pour éviter la contamination croisée de *Giardia* sp. et de *Cryptosporidium* sp. entre les veaux. Le premier examen coprologique effectué à l'arrivée a révélé que trois veaux étaient infectés à *Giardia* sp. et deux veaux à *Cryptosporidium* sp.. Malgré l'élevage en cages individuelles, huit nouveaux cas de giardiose et 12 nouveaux cas de cryptosporidiose furent identifiés une semaine après l'arrivée. En moins d'un mois, tous les veaux étaient infectés avec l'un ou l'autre des parasites. Considérant les périodes d'incubation de *Giardia* sp. (4-8 jours) (178,219) et de *Cryptosporidium* sp. (5-12 jours) (6) chez le veau, il est possible que les premiers cas observés soient des veaux qui aient acquis l'infection à leur ferme d'origine ou à l'encan. Cependant, les cas qui sont apparus deux semaines après l'arrivée ne peuvent s'être infectés ailleurs que dans le local où a eu lieu l'étude. Puisque le contact

était très limité entre les veaux, la contamination des animaux s'est probablement produite lors du nettoyage des lieux au boyau ou lors des manipulations. La transmission de *Cryptosporidium* sp. par aérosol fut rapportée chez les poulets mais non chez le veau (138).

La plupart des infections se sont produites lors des deux premières semaines suite à l'arrivée. Le stress relié au transport, au changement de milieu et à la nouvelle alimentation peut avoir favorisé la transmission des infections en diminuant les mécanismes de défense des veaux. Quatre-vingt-neuf pourcent des veaux ont acquis l'infection à *Giardia* sp. alors que 60% des veaux ont acquis l'infection à *Cryptosporidium* sp. dans le local d'étude. Les animaux infectés à *Giardia* sp. ont excrété des kystes pendant plusieurs semaines, voire des mois alors que ceux infectés à *Cryptosporidium* sp. ont excrété des oocystes pendant moins de 11 jours. Plusieurs chercheurs ont rapporté des durées d'excrétion similaire lors d'infection expérimentale et naturelle à *Giardia* sp. et à *Cryptosporidium* sp. (6,178,219). Tous les veaux infectés avec l'un ou l'autre des parasites ont présenté de la diarrhée ce qui est caractéristique de ces infections (9,49,156,215,219,249). Cette diarrhée était plus marquée en début d'infection chez les veaux infectés à *Giardia* sp.. Vu que l'excrétion de kystes était très marquée lors de cette période, la charge parasitaire était probablement aussi très importante dans l'intestin, ce qui peut expliquer ce phénomène.

Deux schémas d'excrétion furent observés avec *Giardia* sp.. Certains veaux ont excrétés des kystes de façon constante et d'autres de façon intermittente dès le début de l'infection. Chez la gerboise, des schémas similaires furent observés après infection avec divers isolats d'origine humaine (70). Les auteurs de cette recherche avaient émis l'hypothèse que le schéma d'excrétion était déterminé par le protozoaire (70). Dans ce cas-ci, il est peu probable que les variations observées soient dues à la présence de souches diverses de

*Giardia* sp. car les veaux provenaient tous de la même région. Belosevic et ses collaborateurs ont démontré que des souris de lignées différentes ont une capacité variable de reconnaître l'antigène de *G. muris*, d'où une réponse immunologique plus ou moins efficace dans l'intestin, et une période et une intensité d'excrétion de kystes variables (20). Cette capacité variable de reconnaître le trophozoïte dans l'intestin est possible également chez les veaux. Cependant, il nous est difficile de tirer des conclusions à ce sujet car l'immunité des veaux ne fut pas évaluée.

La quantité moyenne de kystes excrétée fut de  $9.9 \times 10^3$  par gramme de fèces. Des taux d'excrétion similaires furent rapportés chez le veau lors d'infection expérimentale (219). Une étude récente rapporte des niveaux d'excrétion plus élevés (247). Ces chercheurs ont utilisé une technique d'immunofluorescence directe pour la recherche des kystes, méthode plus sensible que la technique de concentration dans le sulfate de zinc que nous avons utilisée (247).

### **3. Prévalence de *Giardia* sp. dans les troupeaux de bovins laitiers du Québec**

L'étude épidémiologique effectuée à la grandeur de la province a révélé que près de la moitié (45.7%) des fermes bovines laitières sont contaminées par *Giardia* sp.. La prévalence la plus élevée fut observée dans la région du Nord-de-Montréal (54%) et la plus faible en Abitibi-Témiscamingue (30.4%). Statistiquement, cette différence fut jugée significative. La différence de climat n'est pas un facteur qui fut considéré car tous les veaux de ces régions étaient gardés à l'intérieur. Selon nous, cette différence était plutôt attribuable au fait que le nombre d'échantillons prélevés dans la région de l'Abitibi était insuffisant.

Aucune relation n'a pu être établie entre le fait de retrouver des animaux en diarrhée sur la ferme et la présence du parasite. Ce résultat était attendu car les autres causes de diarrhée ne furent pas éliminées lors de l'étude. Nos résultats suggèrent que le fait de garder les veaux à l'extérieur diminue le taux d'infection. Lorsque les kystes sont excrétés dans l'environnement, les changements de température menacent leur survie. De plus, la pression microbienne est beaucoup moins importante à l'extérieur car les veaux sont habituellement moins entassés ou ils sont élevés dans des huches séparées, sans contact entre eux. La relation entre le nombre d'animaux sur la ferme et la présence du parasite n'a pu être établie. La densité de population serait un meilleur critère d'évaluation de la surpopulation animale comme facteur de risque à *Giardia* sp..

## CONCLUSION

L'ensemble des données de l'étude nous a permis de constater que *Giardia* sp. et *Cryptosporidium parvum* sont réellement pathogènes pour l'espèce bovine. Tous deux sont capables de causer des dommages intestinaux suffisamment sévères pour que des signes cliniques soient observés chez l'animal. En présence de *Giardia* sp., une inflammation modérée à sévère ainsi que de l'atrophie villositaire furent notées dans le jéjunum proximal des veaux et en présence de *Cryptosporidium* sp., de l'inflammation fut observée. Ces lésions sont, selon nous, intimement liées à la présence des parasites car la recherche des autres pathogènes intestinaux s'est révélée infructueuse.

La contagiosité de ces infections est étonnante. Ces deux protozoaires peuvent être aisément transmis à l'intérieur d'un groupe de veaux malgré qu'il soient gardés de façon individuelle dans des entre-deux et que le contact entre les animaux soit très restreint.

La giardiose est une infection qui persiste beaucoup plus longtemps que la cryptosporidiose. Les veaux peuvent excréter des kystes de *Giardia* pendant plusieurs mois alors que l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* est plutôt courte, soit moins que 11 jours. Deux schémas d'excrétion furent observés avec *Giardia* sp. chez le veau. L'excrétion fut soit constante dès le début d'infection et intermittente par la suite ou intermittente dès le début de l'infection.

*Giardia* sp. est présent dans les fermes laitières du Québec: près d'un élevage sur deux est affecté par le parasite (45.7%). Considérant la quantité énorme de kystes produits par les veaux lors de giardiose, le bovin doit être considéré comme une source importante de contamination pour l'environnement.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Acha, P.N., B. Szyfres. 1987. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Pan American Health Organization, Washington, Scientific Publication No. 503.
2. Adam, R.D. 1991. The biology of *Giardia* spp. Microbiological Review 55:706-732.
3. Addis, D.G., H.M. Mathews, J.M. Stewart, S.P. Wahlquist, R.M. Williams, R.J. Finton, H.C. Spencer, D.D. Juranek. 1991. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. Journal of Clinical Microbiology 29:1137-1142.
4. Aggarwal, A., J.W. Merritt, T.E. Nash. 1989. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. Molecular and Biochemical Parasitology 32:39-47.
5. Ament, M.E., C.E. Rubin. 1972. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. Gastroenterology 62:216-226.
6. Anderson, B.C. 1984. Location of cryptosporidia: Review of the literature and experimental infections in calves. American Journal of Veterinary Research 45:1474.
7. Anderson, B.C. 1986. Effect of drying on the infectivity of cryptosporidia-laden calf feces for 3- to 7- day-old mice. American Journal of Veterinary Research 47:2272.
8. Anderson, B.C. 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. Veterinary Pathology 24:235.
9. Anderson, B.C., M.S. Bulgin. 1991. Enteritis caused by *Cryptosporidium* in calves. Veterinary Medicine 86:865.
10. Andrews, J.S., Jr., E.L. Hewlett. 1981. Protection against infection with *Giardia*



- muris* by milk containing antibody to *Giardia*. Journal of Infectious Diseases 143:242-246.
11. Andrews, R.H., M. Adams, P.F.L. Boreham, G. Mayrhofer, B.P. Meloni. 1989. *Giardia intestinalis*: Electrophoretic evidence for a species complex. International Journal for Parasitology 19:183-190.
  12. Angus, K.W. 1987. Cryptosporidiosis in domestic animals and man. In Practice 9:47.
  13. Angus, K.W. 1990. Cryptosporidiosis in ruminants. In "Cryptosporidiosis of Man and Animals" (J.P. Dubey, C.A. Speer and R. Fayer, eds.), pp. 83-103. CRC Press, Boca Raton, Florida.
  14. Angus, K.W., S. Tzipori, E.W. Gray. 1982. Intestinal lesions in specific pathogen-free lambs associated with a *Cryptosporidium* from calves with diarrhoea. Veterinary Pathology 19:67.
  15. Barlough, J.E. 1979. Canine giardiasis: A review. Journal of Small Animal Practice 20:613-623.
  16. Barnard, R.J., G.J. Jackson. 1984. *Giardia lamblia*. The transfer of human infections by food. In "*Giardia* and Giardiasis" (S.L. Erlandsen and E.A. Meyer, eds), pp. 365-378. Plenum Press, New York.
  17. Barr, S.C., D.D. Bowman. 1994. Giardiasis in dogs and cats. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 16:603-610.
  18. Barr, S.C., D.D. Bowman, H.N. Erb. 1992. Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs. American Journal of Veterinary Research 53:2028-2031.
  19. Beal, C.B., P. Viens, R.G.L. Grant, J.M. Hughes. 1970. A new technique for sampling duodenal contents-demonstration of upper small-bowel pathogens. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 19:349-352.
  20. Belosevic, M., Faubert, G.M., Skamene, E., MacLean, J.D., 1984. Susceptibility

- and resistance of inbred mice to *Giardia muris*. *Infection and Immunity* 44:282-286.
21. Belosevic, M., G.M. Faubert, J.D. Maclean. 1989. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. *Gut* 30:1213-1219.
  22. Bemrick, W.J. 1968. Giardiasis in North American horses. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* 63:163-165.
  23. Bemrick, W.J., S.L. Erlandsen. 1988. Giardiasis - is it really a zoonosis? *Parasitology Today* 4:69-71.
  24. Berg, I.E., A.C. Peterson, T.P. Freeman. 1978. Ovine cryptosporidiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173:1586.
  25. Bingham, A.K., E.A. Meyer. 1979. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature (London)* 277:301.
  26. Binz, N., R.C.A. Thompson, A.J. Lymbery, R.P. Hobbs. 1992. Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *Giardia duodenalis in vitro*. *International Journal for Parasitology* 22:195-202.
  27. Bird, R.G., M.D. Smith. 1980. Cryptosporidiosis in man: Parasite life cycle and fine structural pathology. *Journal of Pathology* 132:217.
  28. Black, R.E., A.C. Dykes, S.P. Sinclair, J.G. Wells. 1977. Giardiasis in day-care centers: Evidence of person-to-person transmission. *Pediatrics* 60:486-491.
  29. Blewett, D.A. 1989. Disinfection and oocysts. In "Proceedings of the First International Workshop on Cryptosporidiosis, Edinburgh, 7-8 September, 1988" (K.W. Angus and D.A. Blewett, eds.). P. 107. Edinburgh, Moredun Research Institute.
  30. Botoro, D. 1986. Nematode infections of man: Intestinal infections. In: "Chemotherapy of Parasitic Diseases" (W.C. Campbell and R.S. Rew, eds), pp. 267-276. Plenum Press, New York.

31. Boucher, S.E.M., F.D. Gillin. 1990. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infection and Immunity* 58:3516-3522.
32. Brightman, A.H., G.F. Slonka. 1976. A review of five clinical cases of giardiasis in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 12:492-497.
33. Brown, W.R., D. Butterfield, D. Savage, T. Tada. 1972. Clinical, microbiological, and immunological studies in patients with immunoglobulin deficiencies and gastrointestinal disorders. *Gut* 13:44-49.
34. Buret, A., N. den Hollander, P.M. Wallis, D. Befus, M.E. Olson. 1990. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. *Journal of Infectious Diseases* 162:231-237.
35. Buret, A., J.A. Hardin, M.E. Olsen, D.G. Gall. 1990. Pathophysiology of jejunal malabsorption during acute *Giardia lamblia* infection. *Gastroenterology* 98:A652.
36. Campbell, S.R., H. van Keulen, S.L. Erlandsen, J.B. Senturia, E.L. Jarroll. 1990. *Giardia* sp.: Comparison of electrophoretic karyotypes. *Experimental Parasitology* 71:470-482.
37. Campbell, W.C., R.S. Rew. 1986. *Chemotherapy of parasitic diseases*. 655 pp. Plenum Press, New York.
38. Casemore, D.P. 1987. The antibody response to *Cryptosporidium*: Development of a serological test and its use in a study of immunologically normal persons. *Journal Infect.* 14:125.
39. Chavez, B., R. Cedillo-Rivera, A. Martinez-Palomo. 1992. *Giardia lamblia*: Ultrastructural study of the *in vitro* effect of benzimidazoles. *Journal of Protozoology* 39:510-515.
40. Chermette, R., S. Boufassa-Ouzrout. 1988. *Cryptosporidiosis: A cosmopolitan disease in animals and man*. Technical Serie no.5, 2nd edition. 127 pp. Office international des épizooties. Paris, France.
41. Clyne, C.A., G.M. Eliopoulos. 1989. Fever and urticaria in acute giardiasis.

- Archives of Internal Medicine 149:939-940.
42. Corwin, R.M. 1992. Cryptosporidiosis: a coccidiosis of calves. The Compendium Food Animal pp.1005-1007.
  43. Craft, J.C. 1982. Experimental infection with *Giardia lamblia* in rats. Journal of Infectious Diseases 145:495-498.
  44. Craft, J.C., J.D. Nelson. 1982. Diagnosis of giardiasis by counterimmuno-electrophoresis of feces. The Journal of Infectious Diseases 145:499-504.
  45. Craft, J.C., T. Murphy, J.D. Nelson. 1981. Furazolidone and quinacrine. American Journal of Diseases of Children 135:164-166.
  46. Craun, G.F. 1990. Water-borne giardiasis. In "Giardiasis" (E.A. Meyer, ed.), pp. 267-293. Elsevier, Amsterdam.
  47. Crossley, R., D.V. Holberton. 1983. Characterization of the proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Journal of Cell Science 59:81-103.
  48. Crouch, A.A., W.K. Seow, L.M. Whitman, Y.H. Thong. 1991. Effect of human milk and infant milk formulae on adherence of *Giardia intestinalis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 85:617-619.
  49. Current, W.L. 1985. Cryptosporidiosis. Journal of the American Veterinary Medical Association 187:1334.
  50. Current, W.L., N.C. Reese. 1986. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. Journal of Protozoology 33:98.
  51. Current, W.L., P.H. Bick. 1989. The immunobiology of *Cryptosporidium* spp. Pathol. Immun. Pathol. Research 8:141.
  52. Current, W.L., S.J. Upton, T.B. Haynes. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n.sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. Journal of Protozoology 33:289.
  53. Daniels, C.W., M. Belosevic. 1992. Dissacharidase activity in the small intestine of susceptible and resistant mice after primary and challenge infection with *Giardia*

- muris*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 46:382-390.
54. Davies, R.B., C.P. Hibler. 1979. Animal reservoirs and cross species transmission of *Giardia*. In "Waterborne transmission of giardiasis" (W. Jakubowski and J.C. Hoff, eds), pp. 104-126. US Environmental Protection Agency, EPA-600/7-79-01, Cincinnati, Ohio.
  55. De Carneri, I., F. Trane, V. Mandelli. 1977. *Giardia muris*: Oral infection with one trophozoite and generation time in mice. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 71:438.
  56. Den Hollander, N., D.Riley, D. Befus. 1988. Immunology of giardiasis. Parasitology Today 4:124-131.
  57. Dobell, C. 1920. The discovery of the intestinal protozoa of man. Proceedings of the Royal Society of Medicine 13:1-15.
  58. Duncombe, V.M., T.D. Bolin, A.E. Davis, A.G. Cummins, R.L. Crouch. 1978. Histopathology in giardiasis: A correlation with diarrhea. Australia and New Zealand Journal of Medicine 8:392-396.
  59. Erlandsen, S.L., D.E. Freely. 1983. Trophozoite motility and the mechanism of attachment. In "*Giardia* and Giardiasis" (S.L. Erlandsen and E.A. Meyer, eds.), pp. 33-63. Plenum Publishers, New York.
  60. Erlandsen, S.L., W.J. Bemrick. 1987. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. Journal of Parasitology 73:623-629.
  61. Erlandsen, S.L., L.A. Sherlock, M. Januschka, D.G. Schupp, F.W.III Schaefer, W. Jakubowski, W.J. Bemrick. 1988. Cross-species transmission of *Giardia* spp.: Inoculation of beavers and muskrats with cysts of human, beaver, mouse and muskrat origin. Applied and Environmental Microbiology 54:2777-2785.
  62. Erlandsen, S.L., W.J. Bemrick, C.L. Wells, D.E. Feely, L. Knudsen, S.R. Campbell, H. van Keulen, E.L. Jarroll. 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). Journal of

- Parasitology 76:717-724.
63. Erlich, J.H., R.F. Anders, I.C. Roberts-Thomson, J.W. Schrader, G.F. Mitchell. 1983. An examination of differences in serum antibody specificities and hypersensitivity reactions as contributing factors to chronic infection with the intestinal protozoan parasite. *Giardia muris*, in mice. Australian Journal of Experimental Biology and Medicine Science 61:599.
  64. Fantham, H.B. 1921. Some parasitic protozoa found in South Africa. IV. South African Journal of Science 18:164-170.
  65. Farthing, M.J.G. 1994. Giardiasis as a disease. In "*Giardia*: From molecules to disease" (R.C.A. Thompson, J.A. Reynoldson, A.J. Lymbery, eds.), pp. 15-37. Wallingford, UK.
  66. Farthing, M.J.G., L.J. Mata, J.J. Urrutia, R.A. Kronmal. 1986. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. American Journal of Clinical Nutrition 43:395-405.
  67. Farthing, M.J.G., L.J. Mata, J.J. Urrutia, R.A. Kronmal. 1986. Giardiasis: Impact on child growth. In "Diarrhoea and Malnutrition in Childhood" (J.A. Walker-Smith and A.S. McNeish, eds.), pp. 68-78. Butterworths, London.
  68. Farthing, M.J.G., M.E.A. Pereira, G.T. Keusch. 1986. Description and characterisation of a surface lectin from *Giardia lamblia*. Infection and Immunity 51:661-667.
  69. Faubert, G.M., W.J. Bemrick, S.L. Erlandsen. 1988. Is giardiasis a true zoonosis? Parasitology Today 4:66-71.
  70. Faubert, G.M., M. Belosevic. 1990. Animal models for *Giardia duodenalis* type organisms. In "Giardiasis" (E.A. Meyer, ed.), pp.78-90. Elsevier, Amsterdam.
  71. Fayer, R., B.L.P. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. Microbiological Review 50:458.
  72. Fayer, R., J.V. Ernst, R.G. Miller. 1985. Factors contributing to clinical illness

- in calves experimentally infected with a bovine isolate of *Cryptosporidium*. Proceedings of the Helminthology Society of Washington 52:64.
73. Fayer, R., C. Andrews, B.L.P. Ungar, B. Blagburn. 1989. Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. Journal of Parasitology 75:393.
  74. Fayer R., C.A. Speer, J.P. Dubey. 1990. General biology of *Cryptosporidium*. In "Cryptosporidiosis of Man and Animals" (J.P. Dubey, C.A. Speer and R. Fayer, eds.), pp. 1-30. CRC Press, Boca Raton, Florida.
  75. Feely, D.E., M.D. Gardner, E.L. Hardin. 1991. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: Localisation of acid phosphatase. Journal of Parasitology 77:441-448.
  76. Ferguson, A. 1977. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. Gut 18:921.
  77. Ferguson, A., J. Gillon, G. Munro. 1990. Pathology and pathogenesis of intestinal mucosal damage in giardiasis. In "Giardiasis" (E.A. Meyer, ed.), pp.153-174. Elsevier Science Publ. B.V. (Biomedical Div.), Amsterdam.
  78. Filice, F.P. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from a laboratory rat. University of California Publication in Zoology 57:53-146.
  79. Garber, L. 1993. *Cryptosporidium parvum* literature review. (USDA:APHIS:VS unpublished data). Animal Health Insight Fall:3
  80. Gillin, F.D., L.S. Diamond. 1981. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. Experimental Parasitology 52:9.
  81. Gillin, F.D., D.S. Reiner, S.E. Boucher. 1988. Small intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. Infection and Immunity 56:705-707.
  82. Gillin, F.D., D.S. Reiner, M. McCaffery. 1991. Organelles of protein transport in *Giardia lamblia*. Parasitology Today 7:113-116.
  83. Gillon, J., D.A. Thamery, A. Ferguson. 1982. Features of small intestinal

- pathology (epithelial cell kinetics, intraepithelial lymphocytes, disaccharidases) in a primary *Giardia muris* infection. Gut 23:498-506.
84. Gilman, R.H., K.H. Brown, G.S. Visvesvara, G. Mondal, B. Greenberg, R.B. Sack, F. Brandt, M.U. Khan. 1985. Epidemiology and serology of *Giardia lamblia* in a developing country: Bangladesh. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 79:469-473.
  85. Göbel, E. 1987. Diagnose und therapie der akuten Kryptosporidiose beim kalb. Tierärztl. Umsch 42:863.
  86. Goka, A.K.J., V.I. Mathan, D.D. Rolston, M.J. Farthing. 1986. Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. Lancet i:184-185.
  87. Goka, A.K.J., D.D.K. Rolston, V.I. Mathan, M.J.G. Farthing. 1990. The relative merits of faecal and duodenal juice microscopy in the diagnosis of giardiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 84:66-67.
  88. Gonzalez-Castro, J., M.T. Bermejo-Vicedo, F. Palacios-Gonzalez. 1986. Desenquistamiento y cultivo de *Giardia muris*. Revista Iberica Parasitologia 46:21-25.
  89. Gottstein, B., G.R. Harriman, J.T. Conrad, T.E. Nash. 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: Cellular and humoral response in a mouse model. Parasite Immunology 12:659-673.
  90. Gottstein, B., N.I. Stocks, G.M. Shearer, T.E. Nash. 1991. Human cellular immune response to *Giardia lamblia*. Infection 19:421-426.
  91. Govinda, S., G.S. Visvesvara, P.D. Smith, G.R. Healy, W.R. Brown. 1980. An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *Giardia lamblia*. Annals of Internal Medicine 93:802-805.
  92. Griffith, A. 1992. *In vitro* evaluations of chemotherapeutic agents for *Giardia lamblia*. Personal communication (non published).



93. Hall, E.J., H.C. Rutgers, R.M. Batt. 1988. Evaluation of the peroral string test in the diagnosis of canine giardiasis. *Journal of Small Animal Practice* 29:177-183.
94. Hare, D.F., E.L. Jarroll, D.G. Lindmark. 1989. *Giardia lamblia*: Characterisation of proteinase activity in trophozoites. *Experimental Parasitology* 68:168-175.
95. Harp, J.A., J.P. Goff. 1995. Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Parasitology* 81:1.
96. Hausser, C., J.L. Virelizer, D. Buroit. 1983. Common variable hypogammaglobulinemia in children. Clinical and immunological observations in 30 patients. *American Journal of Diseases of Children* 137:833-937.
97. Heine, J., J.F.L. Pohlenz, H.W. Moon, G. Woode. 1984. Enteric lesions and diarrhoea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *Journal of Infectious Diseases* 150:768.
98. Henriksen, S.A. 1988. Epidemiology of cryptosporidiosis in calves. In "Cryptosporidiosis: Proceedings of the First International Workshop, Edinburgh, 8-9 September, 1988" (K.W. Angus and D.A. Blewett, eds.), pp. 79-83. Edinburgh, Moredun Research Institute.
99. Henriksen, S.A., H.V. Krogh. 1985. Bovine cryptosporidiosis in Denmark. Prevalence, age distribution and seasonal variation. *Nordisk Veterinaermedicin* 37:38.
100. Heyworth, M.F., R.L. Owen. 1985. Gastrointestinal aspects of the acquired immunodeficiency syndrome. *Surv. Digestive Diseases* 3:197.
101. Heyworth, M.F., J.R. Carlson, T.H. Ermak. 1987. Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 165:1743.
102. Heyworth, M.F., J.E. Kung, E.C. Eriksson. 1987. Clearance of *Giardia muris* infection in mice deficient in natural killer cells. *Infection and Immunity* 54:903.
103. Hewlett, E.L., J.S. Andrews, J. Ruffier, F.W. Schaefer. 1982. Experimental

- infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites. *Journal of Infectious Diseases* 145:89-93.
104. Hill, D. 1990. Lymphocyte proliferation in Peyer's patches of *Giardia muris*-infected mice. *Infection and Immunity* 58:2683-2685.
  105. Hill, D.R., R.L. Guerrant, R.D. Pearson, E.L. Hewlett. 1983. *Giardia lamblia* infection of suckling mice. *Journal of Infectious Diseases* 147:217-221.
  106. Hill, D.R., J.J. Burge, R.D. Pearson. 1984. Susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to the lethal effect of human serum. *Immunology* 132:2046-2052.
  107. Holland, R.E., T.H. Herdt, K.R. Refsal. 1989. Pulmonary excretion of H<sub>2</sub> in calves with *Cryptosporidium*-induced malabsorption. *Dig. Dis. Sci.* 34:1399.
  108. Hoover, D.M., F.J. Hoerr, W.W. Carlton, E.J. Hinsman, H.W. Ferguson. 1981. Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Bloch and Schneider. *Journal of Fish Diseases* 4:425.
  109. Hopkins, R.S., P. Shillam, G.B. Gaspard. 1985. Waterborne disease in Colorado: Three years' surveillance and 18 outbreaks. *American Journal of Public Health* 75:254-257.
  110. Hopkins, R.M., P. Deplazes, B.P. Meloni, J.A. Reynoldson, R.C.A. Thompson. 1993. A field and laboratory evaluation of a commercial ELISA for the detection of *Giardia* copro-antigens in humans and dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87:39-41.
  111. Hoyne, G., P. Boreham, P. Parsons, C. Ward, B. Biggs. 1989. The effect of drugs on the cell cycle of *Giardia intestinalis*. *Parasitology* 99:333-339.
  112. Isaac-Renton, J.L. 1991. Immunological methods of diagnosis in giardiasis: An overview. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 21:116-122.
  113. Islam, A., B.J. Stoll, I. Ljungström, J. Biswas, H. Nazrul, G. Huldt. 1983. *Giardia lamblia* infections in a cohort of Bangladeshi mothers and infants followed for one year. *Journal of Pediatrics* 103:996-1000.

114. Jokipii, A.M.M., L. Jokipii. 1977. Prepatency of giardiasis. *Lancet* ii:1095-1097.
115. Kabnick, K.S., D.A. Peattie. 1991. *Giardia* as a missing link between prokaryotes and eukaryotes. *American Scientist* 79:34-43.
116. Kaplan, B.S., S. Uni, M. Aikawa, A.A.F. Mahmoud. 1985. Effector mechanism of host resistance in murine giardiasis: specific IgG and IgA cell-mediated toxicity. *Journal of Immunology* 134:1975.
117. Kasprzak, W., Z. Pawlowski. 1989. Zoonotic aspects of giardiasis: A review. *Veterinary Parasitology* 32:101-108.
118. Kattenbach, W.M., P.F.P. Pimenta, W. de Souza, P. Pinto da Silva. 1991. *Giardia duodenalis*: A freeze-fracture, fracture-flip and cytochemistry study. *Parasitology Research* 77:651-658.
119. Keister, D.B. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77:487-488.
120. Kilian, M., J. Mestecky, M.W. Russell. 1988. Defense mechanisms involving Fc-dependant functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiologic Reviews* 52:296-303.
121. Kiorpes, A.L., C.E. Kirkpatrick, D.D. Bowman. 1987. Isolation of *Giardia* from a llama and from sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research* 51:277-280.
122. Kirkpatrick, C.E. 1989. Giardiasis in large animals. *The Compendium of Continuing Education* 11:80-84.
123. Klesius, P.H., T.B. Haynes, L.K. Malo. 1986. Infectivity of *Cryptosporidium* sp. isolated from wild mice for calves and mice. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189:192.
124. Kreutner, A.K., V.E. Del Bene, M.S. Amstey. 1981. Giardiasis in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology* 140:895-901.
125. Kulda, J., E. Nohynkova. 1978. Flagellates of the human intestine and of the

- intestines of other species. In "Parasitic Protozoa" (J.P. Kreier, ed.), vol.2, p.1. Academic Press, Inc., New York.
126. Lambl, W. 1859. Mikroskopische Untersuchungen der Darmexcrete. Vierteljahrsschr. Prakst. Heikunde (Prague) 61:1-58.
  127. Landsverk, T. 1987. Cryptosporidiosis and the follicle-associated epithelium over the ileal Peyer's patch in calves. Research in Veterinary Science 42:299.
  128. Leitch, G.J., G.S. Visvesvara, S.P. Wahlquist, C.T. Harmon. 1989. Dietary fiber and giardiasis: Dietary fiber reduces rate of intestinal infection by *Giardia lamblia* in the gerbil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 41:512.
  129. Lev, B., H. Ward, G.T. Keusch, M.E.A. Pereira. 1986. Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: A novel host-parasite interaction. Science 232:71-73.
  130. Levine, N.D. 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. Journal of Parasitology 66:830.
  131. Levine, N.D., J.O. Corliss, F.E.G. Cox, G. Deroux, J. Grain, B.M. Honigberg, G.F. Leedale, A.R. Loeblich III, J. Lom, D. Lynn, E.G. Merinfeld, F.C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra, F.G. Wallace. 1980. A newly revised classification of the protozoa. Journal of Protozoology 27:37-58.
  132. Levine, W.C., W.T. Stephenson, G.F. Craun. 1990. Water-borne disease outbreaks, 1986-1988. Morbidity and Mortality Weekly Report 39:1-13.
  133. Lewis, D.J.M., A.R. Freedman. 1992. *Giardia lamblia* as an intestinal pathogen. Digestive Diseases 10:102-111.
  134. Lewis, P.D. Jr., M. Belosevic, G.M. Faubert, L. Curthoys, J.D. MacLean. 1987. Cortisone-induced recrudescence of *Giardia lamblia* infections in gerbils. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 36:33.
  135. Lindmark, D.G. 1980. Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. Molecular and Biochemical Parasitology 1:1-12.

136. Lindmark, D.G., M. Muller. 1976. Antitrichromonal action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrobiological Agents and Chemotherapy* 10:476.
137. Lindsay, D.S., B.L. Blagburn. 1991. *Cryptosporidium parvum* infections of swine. *Compendium of Continuing Education for Practicing Veterinarian* 13:5.
138. Lindsay, D.S., B.L. Blagburn, C.A. Sundermann, F.J. Hoerr, J.A. Ernest. 1986. Experimental *Cryptosporidium* infections in chickens: Oocyst structure and tissue specificity. *Journal of the American Veterinary Research* 47:876.
139. MacPherson, D.W., R. McQueen. 1993. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2.
140. Mahbubani, M.G., A.K. Bej, M.G. Perlin, F.W. Schaefer, W. Jakubowski, R.M. Atlas. 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *Journal of Clinical Microbiology* 30:74-78.
141. Mann, E.D., L.H. Sekla, G.P.S. Nayer. 1986. Infection with *Cryptosporidium* spp. in humans and cattle in Manitoba. *Canadian Journal of Veterinary Research* 50:174.
142. Mann, E.D., L.H. Sekla, G. Eibisch. 1987. *Cryptosporidium* antibodies in Manitoba cattle: A pilot study using an indirect fluorescent antibody procedure. *Canadian Veterinary Journal* 28:3.
143. Mason, P.R., B.A. Patterson. 1987. Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: Cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37:277-282.
144. Mata, L.J. 1978. *The children of Santa Maria Cauque: A prospective field study of health and growth.* MIT Press, Cambridge, Mass.
145. McGhee, J.R., K. Mestecky. 1990. In defense of mucosal surfaces - development of novel vaccines for IgA responses protective at the portals of entry of microbial

- pathogens. In "Infectious disease clinics of North America (R.C. Moellering Jr. and W. Schaffner, eds.), pp. 315-341. The W.B. Saunders Co., Harcourt Brace Jovahovich, Inc., Philadelphia.
146. Medical Letter. 1992. Drugs for parasitic infections. The Medical Letter, NY Vol.34 (Issue 865).
  147. Meisel, J.L., D.R. Perera, C. Meligro, C.E. Rubin. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 70:1156.
  148. Meloni, B.P., A.J. Lymbery, R.C.A. Thompson. 1988. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 38:65-73.
  149. Meloni, B.P., A.J. Lymbery, R.C.A. Thompson. 1989. Characterisation of *Giardia* isolates using a non-radiolabelled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40:629-637.
  150. Meloni, B.P., R.C.A. Thompson, A.M. Strandén, P. Kohler, J. Eckert. 1992. Critical comparison of *Giardia duodenalis* from Australia and Switzerland using isoenzyme electrophoresis. *Acta Tropica* 50: 115-124.
  151. Meyer, E.A. 1985. The epidemiology of giardiasis. *Parasitology Today* 1:101-105.
  152. Meyer, E.A., E.L. Jarroll. 1980. Giardiasis. *American Journal of Epidemiology* 111:1-12.
  153. Miotti, P.G., R.H. Gilman, L.K. Pickering, G. Ruiz-Palacios, H.S. Park, R.H. Yolken. 1985. Prevalence of serum and milk antibodies to *Giardia lamblia* in different populations of lactating women. *Journal of Infectious Diseases* 152:1025-1031.
  154. Miyazaki, Y., M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, C. Hirose, J. Hagatsu. 1974. Salinomycin, a new polyether antibiotic. *Journal of Antibiotics* 23:814-821.

155. Moon, H.W., D.B. Woodmansee, J.A. Harp, S. Abel, B.L.P. Ungar. 1988. Lactal immunity to enteric cryptosporidiosis in mice: Immune dams do not protect their suckling pups. *Infection and Immunity* 56:649.
156. Moore, D.A., D.H. Zeman. 1991. Cryptosporidiosis in neonatal calves: 277 cases (1986-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198:11.
157. Morin, M., S. Larivière, R. Lallier. 1976. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhoea. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 40:228.
158. Morrow, A.L., R.R. Reves, M.S. West, M.L. Guerrero, G.M. Ruiz-Palacios, L. Pickering. 1992. Protection against infection with *Giardia lamblia* by breast-feeding in a cohort of Mexican infants. *Journal of Pediatrics* 121:363-370.
159. Moskovitz, B.L., T.L. Stanton, J.J.E. Kusmierck. 1988. Spiramycin therapy for cryptosporidial diarrhoea in immunocompromised patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy Suppl. B.* 22:189.
160. Naik, S.R., L. Kumor. 1979. Immunological studies in giardiasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 73:291-292.
161. Namgung, R., J.-S. Ryu, K.-T. Lee, C.-T. Soh. 1985. The effect of metronidazole and quinacrine on the morphology and the excystation of *Giardia lamblia*. *Yonsei Reports in Tropical Medicine* 16:28-44.
162. Nash, T.E., D.B. Keister. 1985. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *Journal of Infectious Diseases* 152:1166.
163. Nash, T.E., F.D. Gillin, P.D. Smith. 1983. Excretory-secretory products of *Giardia lamblia*. *Journal of Immunology* 131:2004.
164. Nash, T.E., D.A. Herrington, M.M. Levine. 1987. Usefulness of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia* antigen in feces. *Journal of Clinical Microbiology* 25:1169-1171.

165. Nash, T.E., A. Aggarwal, R.D. Adam, J.T. Conrad, J.W. Merritt Jr. 1988. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Journal of Immunology* 141:636.
166. Nash, T.E., S.M. Banks, D.W. Allin, J.W. Merritt, J.T. Conrad. 1990. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology* 71:415-442.
167. Nash, T.E., J.T. Conrad, J.W. Merritt Jr. 1990. Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Molecular Biochemistry and Parasitology* 42:125.
168. Nash, T.E., D.A. Herrington, M.M. Levine, J.I. Conrad, J.W. Jr Merritt. 1990. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *Journal of Immunology* 144:4362-4369.
169. Nash, T.E., J.W. Merritt Jr., J.T. Conrad. 1991. Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infection and Immunity* 59:1334.
170. Nayak, N., N.K. Ganguly, B.N.S. Walia, V. Wahi, S.S. Kanwar, R.C. Mahajan. 1987. Specific secretory IgA in the milk of *Giardia lamblia*-infected and uninfected women. *Journal of Infectious Diseases* 155:724-727.
171. Nesvadba, J., B. Hörning, J. Jr. Nesvadba, Z. Nesvadba. 1982. *Giardia* infection in cattle. In "Proceedings of the XIIth World Congress on Diseases of Cattle, the Netherlands", vol.1, pp.237-241. World Association of Buiatrics, Utrecht, Netherlands.
172. Nime, F.A., J.D. Burek, D.L. Page, M.A. Holscher, J.H. Yardley. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70:592.
173. Osterholm, M.T., J.C. Forfang, T.L. Ristinen, A.G. Dean, J.W. Washburn, J.R. Godes, R.A. Rude, J.G. McCullough. 1981. An outbreak of foodborne giardiasis. *New England Journal of Medicine* 304:24-28.
174. Owen, R.L. 1984. Direct fecal-oral transmission of giardiasis. In "*Giardia* and



- Giardiasis" (S.L. Erlandsen and E.A. Meyer, eds.), pp. 329-339. Plenum Press, New York.
175. Owen, R.L., P.C. Nemanic, D.P. Stevens. 1979. Ultrastructural observations on giardiasis in a murine model. I. Intestinal distribution, attachment, and relationship to the immune system of *Giardia muris*. *Gastroenterology* 76:757-769.
  176. Panciera, R.J., R.W. Thomassen, F.M. Garner. 1971. Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology* 8:479.
  177. Parenti, D.M. 1989. Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *Journal of Infectious Diseases* 160:1076-1080.
  178. Pavlášek, I. 1984. First record of *Giardia* sp. in calves in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica (Praha)* 31:225-226.
  179. Pearson, G.R., E.F. Logan. 1982. Scanning and transmission electron microscopic observations on the host-parasite relationship in intestinal cryptosporidiosis of neonatal calves. *Research in Veterinary Science* 33:149-154.
  180. Peattie, D.A. 1990. The giardins of *Giardia lamblia*: Genes and proteins with promise. *Parasitology Today* 6:52-56.
  181. Peters, C.S., R. Sable, W.M. Janda, A.L. Chittom, F.E. Kocka. 1986. Prevalence of enteric parasites in homosexual patients attending an outpatient clinic. *Journal of Clinical Microbiology* 24:684-685.
  182. Petersen, L.R., M.L. Carter, J.L. Hadler. 1988. A food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *Journal of Infectious Diseases* 157:846-848.
  183. Phillips, S.C., D. Mildvan, D.C. Williams, A.M. Gelb, M.C. White. 1981. Sexual transmission of enteric protozoa and helminths in a venereal-disease clinic population. *New England Journal of Medicine* 305:603-606.
  184. Pimenta, P.F.P., P. Pinto da Silva, T. Nash. 1991. Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick cell coat: Thin section and label fracture immunocytochemistry survey. *Infection and Immunity* 59:3989-

- 3996.
185. Pitts, R.P., D.C. Twedt, K.A. Mallie. 1983. Comparison of duodenal aspiration with fecal flotation for diagnosis of giardiasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 182:1210-1211.
  186. Pohjola, S., L.A. Lindberg. 1986. Experimental cryptosporidiosis in mice, calves and chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica* 27:91.
  187. Pohlenz, J., H.W. Moon, N.F. Cheville. 1978. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172:452.
  188. Popovic, O., B. Pendic, A. Paljm. 1974. Giardiasis, local immune defense and response. *European Journal of Clinical Investigation* 4:380.
  189. Rabbani, G.H., A. Islam. 1994. Giardiasis in humans: Populations most at risk and prospects for control. In "*Giardia: From molecules to Disease*" ( R.C.A. Thompson, J.A. Reynoldson, A.J. Lymbery, eds.), pp. 217-249. Wallingford, UK.
  190. Radulescu, S., L. Iancu, O. Simionescu, E.A. Meyer. 1976. Serum antibodies in giardiasis. *Journal of Clinical Pathology* 29:863.
  191. Rahaman, A.S.M.H., S.C. Sanyal, K.A. Al-Mahmud, A. Sobhan, K.S. Hossain, B.C. Anderson. 1984. Cryptosporidiosis in calves and their handlers in Bangladesh. *Lancet* ii:221.
  192. Reduker, D.W., C.A. Speer. 1985. Factors influencing the excystation of *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *Journal of Parasitology* 71:112.
  193. Reiner, D.S., C.-S. Wang, F.D. Gillin. 1986. Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. *Journal of Infectious Diseases* 154:825-832.
  194. Reiner, D.S., M. McCafferty, F.D. Gillin. 1990. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *European Journal of Cell Biology* 53:142-153.

195. Rendtorff, R. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. American Journal of Hygiene 59:209-220.
196. Renner, M., C. Field. 1988. Evaluation of the Merifluor indirect immunofluorescent procedure for the detection of *Giardia lamblia* in preserved fecal specimens. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology 88:115.
197. Ridley, M.J., D.S. Ridley. 1976. Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. Journal of Clinical Pathology 29:30.
198. Ridley, R.K., R.M. Olsen. 1991. Rapid diagnosis of bovine cryptosporidiosis with a modified commercial acid-fast staining procedure. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 3:182.
199. Riggs, M.W., T.C. McGuire, P.H. Mason, L.E. Perryman. 1989. Neutralization-sensitive epitopes are exposed on the surface of infectious *Cryptosporidium parvum* sporozoites. Journal of Immunology 143:1340.
200. Roberts-Thompson, I.C., G.F. Mitchell. 1978. Giardiasis in mice. I. Prolonged infections in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice. Gastroenterology 75:42-46.
201. Roberts-Thompson, I.C., R.F. Anders. 1981. Serum antibodies in adults with giardiasis. Gastroenterology 80:1262.
202. Rose, M.E., D. Wakelin, H.S. Joysey, P. Hesketh. 1989. Immunity to coccidiosis: T-cell control of infection with *Eimeria vermiformis* in mice does not require cooperation with inflammatory cells. Parasite Immunology 11:231.
203. Rosekrans, P.C.M., J. Lindeman, C.J.L. Meijer. 1981. Quantitative histological and immunohistochemical findings in jejunal biopsy specimens in giardiasis. Virchows Archiv A: Pathological Anatomy and histopathology 393:145-151.
204. Rosenkranz, H.S., W.T. Speck. 1975. Mutagenicity of metronidazole: Activation

- by mammalian liver microsomes. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 66:520.
205. Rosenthal, P., W.M. Liebman. 1980. Comparative study of stool examinations, duodenal aspiration, and pediatric Entero-Test for giardiasis in children. *Journal of Pediatrics* 96:278-279.
206. Rosoff, J.D., C.A. Sanders, S.S. Sonnad, P.R. De Lay, W.K. Hadley, F.F. Vincenzi, D.M. Yajko, P.D. O'Hanley. 1989. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65). *Journal of Clinical Microbiology* 27:1997-2002.
207. Ruest, N., Y. Couture, G.M. Faubert. 1995. Pathogenic potential of *Giardia* infection in cattle. *Parasitology Today* 11:184.
208. Rustia, M., P. Shubik. 1979. Experimental induction of hepatomas, mammary tumors and other tumors with metronidazole in non-inbred Sas:MRC(WI)BR rats. *Journal of the National Cancer Institute* 63:863.
209. Schantz, P.M. 1991. Parasitic zoonoses in perspective. *International Journal for Parasitology* 21:161-170.
210. Shaw, R.A., M.B. Stevens. 1987. The reactive arthritis of giardiasis. *Journal of the American Medical Association* 258:2734-2735.
211. Shetty, N., M. Narasimha, T.S. Raghuveer, E. Elliott, M.J.G. Farthing, R. Macaden. 1990. Intestinal amoebiasis and giardiasis in southern Indian infants and children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84:382-384.
212. Slavin, D. 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology* 65:262.
213. Smith, P.D., F.D. Gillin, W.R. Brown, T.E. Nash. 1981. IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Gastroenterology* 80:1476-1480.

214. Sogin, M.L., J.H. Gunderson, H.J. Elwood, R.A. Alonso, D.A. Peattie. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: An unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243:75-77.
215. St-Jean, G., Y. Couture, P. Dubreuil, J.L. Fréchette. 1987. Diagnosis of *Giardia* infection in 14 calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191:831-832.
216. Steele, R.W., S. McDermott. 1977. Diagnosis of giardiasis. *The Medical Journal of Australia* 2:876-877.
217. Sterling, C.R., M.J. Arrowood, M.M. Marshall, L.D. Stetszenbach. 1987. The detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from water sources using monoclonal antibodies. *Proceedings of the American Water Works Association of Water Quality Technical Conference* 15:271.
218. Taminelli, V., J. Eckert. 1989. Häufigkeit und geographische Verbreitung des *Giardia* Befalls bei Wiederkäuern in der Schweiz. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 131:251-258.
219. Taminelli, V., J. Eckert, T. Sydler, B. Gottstein, L. Corboz, M. Hofmann. 1989. Experimentelle Infektion von Kälbern und Schafen mit bovinen *Giardia*-Isolaten. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 131:551-564.
220. Theodorides, V.J., I.H. Daly. 1989. Human safety studies with albendazole. *Proceedings of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* 13:S 8-10.
221. Thompson, A., R. Roland, R. Hecker, G.E. Gibson, D.P. Reid. 1977. Immunoglobulin-bearing cells in giardiasis. *Journal of Clinical Pathology* 30:292-294.
222. Thompson, R.C.A., A.J. Lymbery, B.P. Meloni. 1990. Genetic variation in *Giardia* Kunstler, 1882: Taxonomic and epidemiological significance. *Protozoological Abstracts* 14, 1-28.

223. Thompson, R.C.A., J.A. Reynoldson, A.H.W. Mendis. 1993. *Giardia* and Giardiasis. In "Advances in parasitology vol.32" (P.M. Wallis and B.R. Hammond, eds.), pp. 71-160. Academic Press Limited, Murdoch, Australia.
224. Tibayrenc, M., F. Kjellberg, F.J. Ayala. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 87:2414-2418.
225. Tyzzer, E.E. 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 5:12.
226. Tyzzer, E.E. 1910. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. Journal of Medical Research 23:487.
227. Tyzzer, E.E. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Archiv für Protistenkunde 26:394.
228. Tzipori, S., M. Smith, T. Makin, C. Halpin. 1982. Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces. Veterinary Parasitology 11:121.
229. Tzipori, S., M. Smith, C. Halpin, K.W. Angus, D. Sherwood, I. Campbell. 1983. Experimental cryptosporidiosis in calves: Clinical manifestations and pathological findings. Veterinary Records 112:116.
230. Tzipori, S., D. Robertson, D.A. Cooper, L. White. 1987. Chronic cryptosporidial diarrhoea and hyperimmune cow colostrum. Lancet ii:344.
231. Udezulu, I.A., G.A. Visvesvara, D.M. Moss, G.J. Leitch. 1992. Isolation of two *Giardia lamblia* (WB strain) clones with distinct surface protein and antigenic profiles and differing infectivity and virulence. Infection and Immunity 60:2274-2280.
232. US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service: Health

- Hints for International Travel. 1979. DHEW Publication No. CDC 79-8280. Atlanta, Georgia.
233. Van Keulen, H., S.R. Campbell, S.L. Erlandsen, E.L. Jarroll. 1991. Cloning and restriction enzyme mapping of ribosomal DNA of *Giardia duodenalis*, *Giardia ardeae* and *Giardia muris*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 46:275-284.
234. Van Keulen, H., S. Horvat, S.L. Erlandsen, E.L. Jarroll. 1991. Nucleotide sequence of the 5.8S and large subunit rRNA genes and the internal transcribed spacer and part of the external spacer from *Giardia ardeae*. *Nucleic Acids Research* 19:6050.
235. Vinayak, V.K., K. Kum, R. Khanna, M. Khuller. 1992. Systemic oral immunization with 56 kDa of *Giardia lamblia* affords protection in experimental mice. *Vaccine* 10:21-27.
236. Visvesvara, G.S., J.W. Dickerson, G.R. Healy. 1988. Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts for mongolian gerbils (*Meriones ungyiculatus*). *Journal of Clinical Microbiology* 26:837-841.
237. Webster, A.D.B. 1980. Giardiasis and immunodeficiency diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74:440-448.
238. Whiteside, M.E., J.S. Borkin, R.G. May, S.D. Weiss, M.A. Fischl, C.L. MacLeod. 1984. Enteric coccidiosis among patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33:1065.
239. Williams, R.O. 1987. Measurement of class specific antibody against *Cryptosporidium* in serum and faeces from experimentally infected calves. *Research in Veterinary Science* 43:264.
240. Wilson, P.J. 1982. Giardiasis in two calves. *The Canadian Veterinary Journal* 23:83.
241. Wittenberg, D.F., N.M. Miller, J. Van den Ende. 1989. Spiramycin is not

- effective in treating *Cryptosporidium* diarrhea in infants: Results of a double-blind randomized trial. *Journal of Infectious Diseases* 159:131.
242. Wolfe, M.S. 1990. Clinical symptoms and diagnosis by traditional methods. In "Giardiasis" (E.A. Meyer, ed.), pp. 175-185. Elsevier, Amsterdam.
243. Wolfe, M.S. 1992. Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 5:93-100.
244. Woo, P.K. 1984. Evidence for animal reservoirs and transmission of *Giardia* infections between animal species. In "*Giardia* and giardiasis" (S.L. Erlandsen and E.A. Meyer, eds.), pp.341-363. Plenum Publishing Corp, New York.
245. Wright, S.G., A.M. Tomkins. 1977. Quantification of the lymphocytic infiltrate in jejunal epithelium in giardiasis. *Clinical and Experimental Immunology* 29:408-412.
246. Xiao, L. 1994. *Giardia* infection in farm animals. *Parasitology Today* 10:436-438.
247. Xiao, L., R.P. Herd. 1993. Quantification of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2944-2946.
248. Xiao, L., R.P. Herd. 1994. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Veterinary Journal* 26:14-17.
249. Xiao, L., R.P. Herd, D.M. Rings. 1993. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. *Veterinary Parasitology* 51:41-48.
250. Xiao, L., R.P. Herd, G.L. Bowman. 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections on two Ohio pig farms with different management systems. *Veterinary Parasitology* 52:331-336.
251. Xiao, L., R.P. Herd, K.E. McClure. 1994. Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. *The Journal of Parasitology* 80:55-59.
252. Zimmer, J.F., D.B. Burrington. 1986. Comparison of four techniques of fecal



- examination for detecting canine giardiasis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 22:161-167.
253. Zimmer, J.F., J. Miller, G. Lindmark. 1988. Evaluation of the efficacy of selected commercial disinfectants in inactivating *Giardia muris* cysts. *Journal of the American Animal Hospital Association* 24:379-385.
254. Zinneman, H.H., A.P. Kaplan. 1972. The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *American Journal of Digestive Diseases* 17:793-797.