

Université de Montréal

Caractérisation de l'infection naturelle à *Cryptosporidium* spp. chez le chien et
le chat vus en établissement vétérinaire

par

Géraldine Philippin

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Décembre 2010

© Géraldine Philippin, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation de l'infection naturelle à *Cryptosporidium* spp. chez le chien et le chat vus
en établissement vétérinaire

Présenté par :
Géraldine Philippin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvain Quessy, président-rapporteur
Alain Villeneuve, directeur de recherche
Caroline Côté, membre du jury

Résumé

Cryptosporidium spp. est un protozoaire parasite du système gastro-intestinal largement répandu chez les vertébrés et causant la cryptosporidiose, une zoonose occasionnant des troubles digestifs sévères pouvant entraîner la mort chez les individus immunodéficients. Au Canada, la déclaration de cette maladie est obligatoire depuis l'an 2000. Ainsi, il est pertinent de mieux comprendre l'infection chez les animaux de compagnie, puisqu'ils sont potentiellement un réservoir du parasite. Durant l'année 2008, des échantillons fécaux provenant de 1 202 chats ($n = 371$) et chiens ($n = 831$) de la province du Québec ont été analysés par comptage des ookystes de *Cryptosporidium* spp. au moyen de la technique de centrifugation en solution de sulfate de zinc. Dans cette étude, la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les chats (28/371 : 7,55 %) et chez les chiens (88/831 : 10,59 %) de compagnie confirme leur potentiel en tant que réservoir du parasite. Au Québec, de par leur nombre, les chats sont potentiellement un réservoir zoonotique du parasite plus important que celui des chiens, bien qu'il n'existe pas de différence significative entre la prévalence du parasite chez le chat et le chien pour l'année 2008. L'âge ($p = 0,0001$) et l'infection concomitante par *Giardia* spp. ($p = 0,0001$) se sont avérés être des facteurs associés avec la présence de *Cryptosporidium* spp. chez le chien. Parmi l'ensemble des variables testées chez le chat (l'âge, le sexe, la saison et l'infection concomitante par *Giardia* spp.), aucune n'a été associée de manière significative à la présence du parasite chez le chat. Ceci peut être dû au nombre limité d'individus testés pour cette espèce. Un suivi de l'excrétion des ookystes de *Cryptosporidium* spp. chez deux chats suggère que l'excrétion des ookystes peut se faire sur une période de sept mois et que le taux d'excrétion varie dans le temps. Le diagnostic moléculaire des espèces et génotypes de *Cryptosporidium* spp. isolés à partir des échantillons de matières fécales devait être réalisé par la technique de PCR emboîtée des fragments des gènes ARNr 18S et HSP70 et du séquençage des produits de PCR. Aucun résultat positif n'a toutefois été obtenu. Afin d'augmenter la puissance statistique des analyses épidémiologiques sur la prévalence de *Cryptosporidium* spp., il serait nécessaire à l'avenir de travailler sur un nombre d'animaux beaucoup plus important.

Mots-clés : *Cryptosporidium* spp., chat, chien, zoonose, ookyste, prévalence, facteurs de risque

Abstract

Cryptosporidium spp. is a protozoan parasite from the gastro-intestinal tract with a large range of vertebrate hosts causing cryptosporidiosis, a zoonotic disease which may lead to severe digestive troubles and sometimes death for immunocompromised people. It is a noticeable disease in Canada since 2000. It is thus relevant to study the infection in cats and dogs as they may represent an important zoonotic reservoir for the parasite. A total of 1,202 stool samples from cats (n = 371) and dogs (n = 831) from the province of Quebec were examined during the year 2008 for this research. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. was calculated using coprology tests using centrifugation in a zinc sulfate solution. The prevalence in cats (28/371: 7,55 %) and dogs (88/831: 10,59 %) corroborates that pets living in the province of Quebec may be a reservoir for *Cryptosporidium* spp. While we did not find a significant difference in the prevalence of *Cryptosporidium* spp. between cats and dogs, cats may represent a larger reservoir as they represent a larger population within the province. We identified age ($p = 0,0001$) and concomitant infection with *Giardia* spp ($p = 0,0001$) as risk factors for dogs. Among all the variables tested on cats (age, sex, season, concomitant infection with *Giardia* spp.), none were significantly associated with the presence of the parasite in cats. This may be caused in part by the small number that was analyzed. A follow-up study with two cats showed the excretion of oocysts can last for a minimum of seven months and varies in intensity through time. The molecular diagnostic of species and genotypes of *Cryptosporidium* spp. isolated from fecal samples should have been done by using the amplification of the gene fragments ARNr 18S and HSP70 nested PCR reactions and the sequencing of PCR products. Although this technique was attempted in this study, no positive result was obtained. It is recommended to work on larger animal populations to increase the statistical power of epidemiological analysis of the prevalence of *Cryptosporidium* spp.

Keywords : *Cryptosporidium* spp., cat, dog, zoonosis, oocyst, prevalence, risk factors

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
Chapitre I : Recension de la littérature.....	3
<i>1 Entéroparasites du genre Cryptosporidium.....</i>	<i>3</i>
1.1 Historique.....	3
1.2 Taxonomie.....	4
1.2.1 Apicomplexes.....	4
1.2.2 Espèces du genre <i>Cryptosporidium</i>	8
1.2.3 Espèces retrouvées chez le chat, le chien et l'homme.....	12
1.3 Caractéristiques biologiques.....	13
1.4 Cycle de vie et mécanismes de l'infection.....	14
1.4.1 Développement dans l'hôte.....	14
1.4.2 Dispersion des ookystes dans l'environnement.....	17
1.5 Réaction du système immunitaire de l'hôte.....	18
1.6 Évolution des interactions hôtes-parasites.....	18
1.7 Décontamination et désinfectants utiles.....	19
1.8 Traitement.....	20
1.9 Prévention.....	21
1.9.1 Immunothérapie.....	21
1.9.2 Anticorps monoclonaux.....	22
2.1 Signes cliniques chez l'homme.....	23
2.2 Facteurs de risque.....	23
2.2.1 Immunodéficience.....	23

2.2.1 Présence d'animaux domestiques	24
2.3 Prévalence.....	25
2.4 Prévention	27
2.5 Dépistage et identification de <i>Cryptosporidium spp.</i>	28
2.5.1 Techniques de concentration.....	28
2.5.2 Techniques de coloration	29
2.5.3 Test de capture d'antigène (ELISA)	30
2.6 Diagnostic moléculaire	30
2.6.1 PCR multiplexe	31
2.6.2 PCR emboîtée	32
2.6.3. Marqueurs moléculaires	35
2.7 Prévalence et facteurs de risque chez le chien.....	37
2.7.1 Pathogénicité de <i>Cryptosporidium spp.</i> chez le chien	40
2.8 Prévalence et facteurs de risque chez le chat	40
2.8.1 Pathogénicité de <i>Cryptosporidium spp.</i> chez le chat	41
Chapitre II : <i>Cryptosporidium spp.</i> chez le chat et le chien au Québec	43
1 Hypothèses et objectifs	43
2 Méthodologie.....	44
2.1 Échantillons.....	44
2.2 Animaux testés.....	45
2.3 Dossiers	45
2.4 Centrifugation dans le sulfate de zinc	46
2.5 Traitement des données et tests statistiques	47
2.5.1 Test du Khi^2	48
2.5.2 Hypothèses posées	49
2.6 Extraction de l'ADN	51
2.7 Amplification de l'ADN	51
2.8 Migration sur gel d'électrophorèse et visualisation des fragments d'ADN.....	53
2.9 Caractérisation moléculaire à partir des séquences d'ADN.....	54

2.9.1 Relations phylogénétiques entre les différents génotypes	54
3 Résultats	55
3.1 Prévalence globale de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	55
3.2 Prévalence des autres entéroparasites	56
3.3 Variables explicatives	58
3.4 Durée d'excrétion des ookystes de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	61
3.5 Diagnostic moléculaire	63
4 Discussion	63
4.1 Prévalence	63
4.2 Espèce	64
4.3 Strates d'âge	66
4.4 Sexe	67
4.5 Saison	67
4.6 Infection par <i>Giardia</i> spp.....	69
4.7 Mise au point de la PCR.....	70
4.8 Conclusions	71
5 Investigations futures	72
Références	75
Annexe I : Formulaire de soumission du service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.	i
Annexe II : Alignement des amorces P1F, P2R, P3F et P4R et des séquences du gène ARNr 18S de 14 espèces différentes obtenues à partir de la base de données Genbank. L'accession Genbank suit le nom de l'espèce de <i>Cryptosporidium</i>	ii

Liste des tableaux

Chapitre I : Recension de la littérature

Tableau I : Mise à jour des noms et le statut attribué aux différentes espèces de <i>Cryptosporidium</i>	10
Tableau II : Désinfectants efficaces contre <i>Cryptosporidium</i> spp.....	20
Tableau III : Gènes utilisés pour le diagnostic moléculaire de <i>Cryptosporidium</i> spp chez le chien (<i>Canis lupus familiaris</i>), le chat (<i>Felis catus</i>) et l'homme (<i>Homo sapiens</i>).....	36
Tableau IV : Résumé des études de prévalence de <i>Cryptosporidium</i> spp. chez le chien	39

Chapitre II : *Cryptosporidium* spp. chez le chat et le chien au Québec

Tableau V : Liste des amorces utilisées pour l'amplification des fragments des gènes ARNr 18S et HSP70 par la méthode de PCR emboîtées.....	52
Tableau VI : Prévalence des animaux contaminés par <i>Cryptosporidium</i> spp. selon les variables étudiées (l'espèce hôte, la strate d'âge, le sexe, la saison et l'infection par <i>Giardia</i> spp.).....	60

Liste des figures

Chapitre I : Recension de la littérature

- Figure 1 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes faisant partie des alvéolés effectuées à partir des séquences complètes du gène ARNr 18S.....6
- Figure 2 : Arbre phylogénétique des genres du groupe des apicomplexes fait à partir des séquences complètes du gène ARNr 18S.....7
- Figure 3 : Cycle évolutif de *Cryptosporidium* spp. dans l'intestin grêle, démontrant les étapes intracellulaires et extracellulaires connues.....16
- Figure 4 : Schéma des différentes approches utilisées pour détecter et quantifier *Cryptosporidium* spp. issu d'échantillons de matières fécales ou d'échantillons d'eau33
- Figure 5 : Méthodes basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) afin d'effectuer le génotypage de *Cryptosporidium* spp.....34

Chapitre II : *Cryptosporidium* spp. chez le chat et le chien au Québec

- Figure 6 : Distribution géographique de la provenance des 831 échantillons fécaux de chiens et des 371 échantillons fécaux de chats analysés durant l'année 2008 par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.....44
- Figure 7 : Identification microscopique de *Cryptosporidium* spp. à l'aide de la méthode de centrifugation dans le sulfate de zinc.....47
- Figure 8 : Proportion des chats et des chiens dont les analyses coproscopiques effectuées par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal en 2008 ont révélé la présence d'ookystes de *Cryptosporidium* spp. dans leurs matières fécales (en bleu), par rapport aux animaux exempts d'ookystes (en rouge).....56
- Figure 9 : Prévalence (en pourcentage) des autres entéroparasites chez les chats (n = 371) testés par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal durant l'année 2008.....57

Figure 10 : Prévalence (en pourcentage) des autres entéroparasites chez les chiens (n = 831) testés par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal durant l'année 2008.....57

Figure 11 : Suivi dans le temps de l'excrétion de l'entéroparasite *Cryptosporidium* spp. chez deux chats (A et B).....62

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARNr 18 : Sous-unité de l'acide ribonucléique ribosomique

aGP25-200 : α -1-glycoprotéine acide

aP23 : Phosphatase alcaline

BALB/c : Souche de souris albinos de laboratoire

AMVQ : Association des médecins vétérinaires du Québec

BSA : Bovin serum albumin (albumine de sérum bovin)

° C : Degré Celsius

CD4: Glycoprotéine exprimée à la surface des cellules T CD4+, des cellules régulatrices T, des monocytes, des macrophages et de certaines cellules dendritiques.

CHUV: Centre hospitalier universitaire vétérinaire

COWP : Protéines de la membrane de l'ookyste

CP12 : Protéine de surface

CP21 : Protéine de surface

CpA135 : Cellule présentatrice d'antigène

CSL : Glycoprotein Circumsporozoite Like

DDBJ : DNA Data Bank of Japan

DI₅₀ : Dose infectieuse suffisante pour infecter 50% des individus d'une étude

DNTPs : Mélange de 4 désoxyribonucléotides

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay (Dosage d'immunosorption liée à enzyme)

EMBL : European Molecular Biology Laboratory

É-U : États-Unis

FAE : Formaline-acétate d'éthyl

FE : Formaline-éther 1

g : Gramme

Gal: Galactosamine

GalNAc : *N*-Acetylgalactosamine

GPS: Géo-Positionnement par Satellite

GRO α : Chimiokine de la famille alpha

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HSP 70 : Protéines chaperonnes *Heat shock protein*

i.e. : Expression latine signifiant « c'est-à-dire »

IMS : Séparation immunomagnétique

IL-8 : Interleukine 8

IRDA : Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement

ITS : Séquence des espaces de transcription

KDa : kilodalton

Khi² : Test statistique

L : Litre

mAmps : Milliampère

ml : Millilitre

mM : Millimolaire

NaCl : Chlorure de sodium

NF- κ B : Protéine de la super-famille des facteurs de transcription impliquée dans la réponse immunitaire

P : Probabilité

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

pH : Potentiel d'hydrogène

pmol : Picomole

p.p.m: Partie par million

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Rpm : Tours par minute

Spp : Espèces

T CD4⁺ : Cellules T auxiliaires, parfois cytotoxiques

T CD8⁺ : Cellules T cytotoxiques

TBE 1X : Tris, Borate, EDTA (solution tampon)

μ m : Micromètre

UV : Ultraviolet

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VS : Versus

ZnSO₄ : Sulfate de zinc

*À tous ceux qui m'ont encouragée,
particulièrement la Titi.*

Remerciements

Je remercie de tout cœur mes parents, Gérard et Claude, pour leur énorme support ainsi que mon amie Marie Claude Bernard, pour ses encouragements et pour avoir eu le courage de lire ce papier. J'aimerais également remercier mon bien-aimé, Simon Laurin-Lemay, pour sa patience et ses précieux conseils. Je vous aime.

Introduction

Les organismes du genre *Cryptosporidium* Tyzzer 1907 (Apicomplexa) sont des protozoaires entéroparasites ayant la capacité de parasiter un grand nombre de vertébrés appartenant aux classes des poissons, reptiles, oiseaux et mammifères, dont l'homme (O'Donoghue, 1995, Lindsay et al, 2000). Ces parasites ont été détectés lors d'infections naturelles chez 170 espèces vertébrées, et cela dans plus de 50 pays différents situés en zones tropicales tout comme en zones tempérées (O'Donoghue, 1995). Parmi les principales espèces du genre *Cryptosporidium*, on compte *C. parvum* (Tyzzer, 1912), *C. hominis* (Morgan-Ryan et al, 2002), *C. baileyi* (Current et al, 1986), *C. canis* (Fayer et al, 2001), *C. felis* (Iseki, 1979), *C. meleagridis* (Slavin, 1955), et *C. muris* (Tyzzer, 1907).

C. parvum, une espèce commune et peu spécifique a longtemps été considérée comme l'unique espèce responsable de la cryptosporidiose chez l'homme et chez les autres mammifères (Fayer et Xiao, 2008). Or, on sait aujourd'hui qu'il existe plusieurs espèces différentes voire génotypes pouvant engendrer la pathologie chez l'homme. La cryptosporidiose cause principalement des problèmes diarrhéiques pouvant entraîner la mort chez des hôtes généralement immunodéficients.

Le rôle des animaux domestiques au Québec en tant que réservoir potentiel de *Cryptosporidium* spp. est mal connu. Parmi les différentes espèces que l'ont retrouve chez le chat, *Felis catus* (Mammalia : Felidae), figurent *C. felis* et *C. muris* (Tableau I). Chez le chien, *Canis lupus familiaris* (Mammalia : Canidae), figurent *C. canis*, *C. parvum* et *C. muris* (Tableau I), (Pedraza-Diaz et al, 2001). Ces mêmes espèces ont été retrouvées chez des humains en santé autant que chez des humains immunodéficients (Tableau I).

En 2006, un sondage Léger Marketing (2008) effectué conjointement avec l'ADMVQ, portant sur les animaux de compagnie constate qu'au Québec, il y aurait approximativement 1 325 000 chats, soit 1,6 chats par foyer et environ 840 000 chiens, soit 1,2 chiens par foyer québécois. Il est à noter que les animaux errants et en attente dans les

animaleries n'ont pas été pris en compte dans ce sondage. De par leur grand nombre et leur proximité avec les humains, les animaux domestiques sont potentiellement un réservoir zoonotique pour ces protozoaires entéroparasites. Ainsi, comprendre le rôle des animaux domestiques dans l'épidémiologie et l'infectiosité des parasites du genre *Cryptosporidium* est d'autant plus important qu'aux États-Unis d'Amérique, il y aurait une augmentation significative du nombre de cas entre les années 2003 et 2005 selon le rapport de surveillance de la cryptosporidiose chez l'homme. En effet, le nombre de personnes infectées est passé de 3 505 cas en 2003, à 3 911 en 2004, puis 8 269 en 2005 (Yoder et Beach, 2007).

Au cours des cinq dernières années, le laboratoire de diagnostic du Centre hospitalier universitaire vétérinaire (CHUV) de l'Université de Montréal a remarqué une augmentation des cas d'infection à *Cryptosporidium* spp. chez les chiens et les chats domestiques en provenance de la province de Québec (Alain Villeneuve, communication personnelle). L'infection et la transmission zoonotique de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux malades ou porteurs sains sont mal connues. Étant donné le manque d'information sur la biologie de ce protozoaire, l'augmentation des cas diagnostiqués chez les animaux de compagnie, et compte tenu du fait qu'il n'existe toujours pas de thérapie efficace contre *Cryptosporidium* spp. chez les chats et les chiens, il est pertinent d'étudier de plus près cet agent pathogène zoonotique. Il est également nécessaire de connaître sa prévalence au Québec afin d'identifier les facteurs de risque liés à l'infection chez le chat et le chien. Cette étude a pour but d'étudier l'infection naturelle à *Cryptosporidium* spp. chez le chien et le chat vus en établissement vétérinaire, en testant l'association de variables explicatives à la présence de ce parasite.

Chapitre I : Recension de la littérature

1 Entéroparasites du genre Cryptosporidium

1.1 Historique

Le parasite a été observé pour la première fois dans les glandes gastriques d'une souris, *Mus musculus*, de laboratoire en 1907 par Tyzzer, qui lui donna le nom de *Cryptosporidium muris*. Ce même chercheur observa à nouveau ce protozoaire dans le petit intestin de la souris en 1912, mais comme il était plus petit que le premier, il le considéra comme une espèce différente et le nomma *C. parvum*. Plusieurs années s'écoulèrent avant que Slavin (1955) décrive une nouvelle infection à *C. meleagridis* dans le système digestif de la dinde, *Meleagris gallopavo*. Puis, c'est dans les années 70 que plusieurs rapports d'études vétérinaires montrent un lien entre *Cryptosporidium* spp. et des cas de diarrhée chronique chez le bétail (O'Donoghue, 1995).

La première infection due à *Cryptosporidium* spp. chez l'homme est diagnostiquée en 1976 chez un enfant de trois ans immunocompétent, mais atteint d'une entéocolite aiguë (Nime et al, 1976). En 1982, quelques personnes en bonne santé œuvrant auprès de bétail sont infectées par des entéroparasites du genre *Cryptosporidium* (Current et al, 1983). Depuis ce temps, l'infection est associée à des signes cliniques pouvant être sévères, autant chez les personnes immunodéficientes que chez les personnes saines.

L'épidémie la plus connue est celle de 1993 à Milwaukee (États-Unis d'Amérique). Elle aurait touché plus de 400 000 personnes ayant bu de l'eau du robinet contaminée (Mac Kenzie et al, 1994). La source d'approvisionnement en eau potable de la ville de Milwaukee aurait été contaminée par l'eau de ruissellement ayant transporté des ookystes de *Cryptosporidium* spp. excrétés par le bétail paissant près des rivières du bassin versant du lac Michigan. D'autres sources potentielles de contamination ont été identifiées, telles

que les eaux usées municipales et les abattoirs situés près de ces rivières (Mac Kenzie et al, 1994). D'ailleurs, les personnes travaillant avec des animaux, principalement le bétail, sont plus à risque de se faire parasiter par *Cryptosporidium* spp. (O'Donoghue, 1995).

1.2 Taxonomie

1.2.1 Apicomplexes

Les organismes du genre *Cryptosporidium* sont des eucaryotes unicellulaires appartenant au groupe monophylétique des alvéolés (Morrison, 2009). Les alvéolés, dont la plupart appartiennent au sous-groupe des ciliés, dinophytes et apicomplexes, possèdent tous des vésicules sous-membranaires appelées alvéoles (Gould et al. 2008). Ils ont des modes de nutrition très divers, allant de la photoautotrophie, à la prédation, au parasitisme intracellulaire et à la mixotrophie (Gould et al. 2008). En effet, les apicomplexes, dont font partie les différentes espèces de *Cryptosporidium* spp., comprennent des parasites obligatoires pour la plupart des cellules animales (Gould et al. 2008). Plusieurs apicomplexes sont pathogènes pour les humains et leurs animaux domestiques, engendrant par exemple la malaria, la toxoplasmose et la coccidiose (Adl et al. 2005).

Étant donné la difficulté à différencier les apicomplexes sur la base de leur morphologie, ces derniers ont été définis en quatre groupes distincts (i.e. coccidies, grégarine, haemosporidiens et piroplamides), à partir de caractéristiques phénotypiques telles que l'association à leurs hôtes ou vecteurs et leurs sites d'infection. Aujourd'hui, cette classification utilitaire n'est plus considérée représentative des relations évolutives existant entre les différents organismes du groupe des apicomplexes (Morrison, 2009). Plus de 300 genres dans plus d'une soixantaine de familles ont été reconnus sur la base d'analyses phylogénétiques faites principalement à partir des séquences de nucléotides du gène ARNr 18S (Morrison, 2009). Il n'existe toujours pas de phylogénie intégrant à la fois les caractères phénotypiques et génotypiques (Morrison, 2009).

Auparavant, *Cryptosporidium* était classé parmi les coccidies, alors qu'aujourd'hui, les nouvelles études phylogéniques démontrent que ce groupe partagerait un ancêtre commun avec les grégarines (Figure 1 et 2), ce qui expliquerait l'inefficacité des traitements anti-coccidies (Morrison, 2009). Le genre *Cryptosporidium* est donc actuellement considéré comme un groupe sœur aux grégarines (Morrison, 2009). Les deux groupes présentent des similitudes telles que leur cycle de vie monoxème (cycle direct avec un seul hôte), leurs ookystes contenant quatre sporozoïtes et leur comportement de préhension alimentaire par une organelle multi-membraneuse, nommée rhoptrie, permettant de percer la membrane cellulaire de l'hôte et d'en ingérer le contenu cellulaire (Barta et Thompson, 2006). Ce mode trophique se nomme myzocytose.

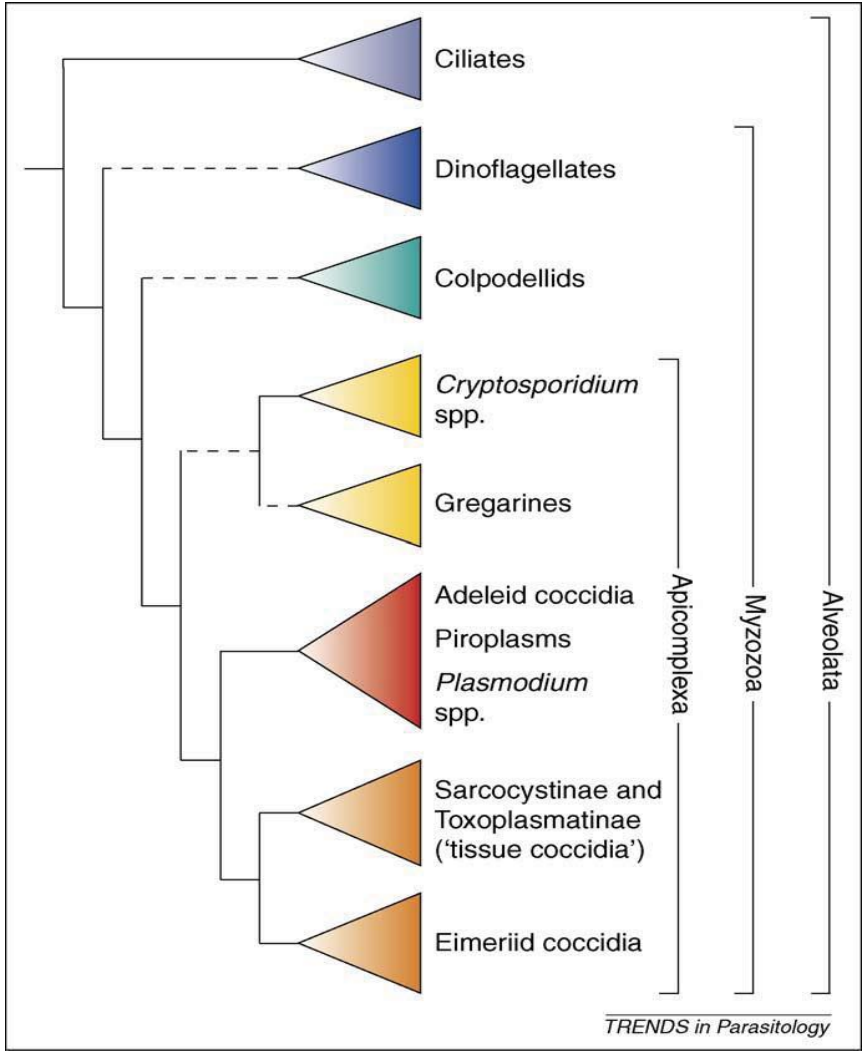


Figure 1 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes faisant partie des alvéolés effectuées à partir des séquences complètes du gène ARNr 18S (d'après : Barta et Thompson, 2006).

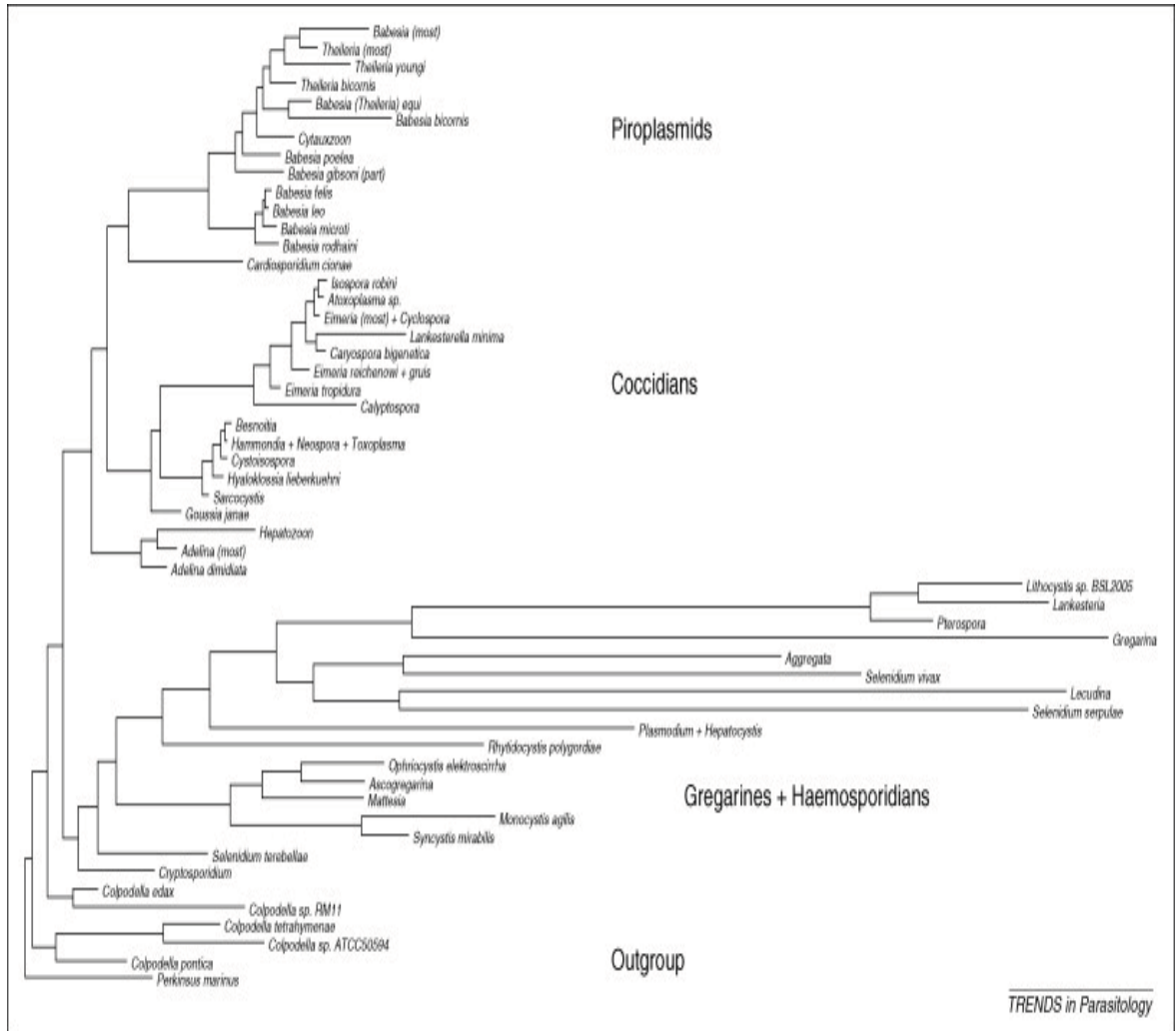


Figure 2 : Arbre phylogénétique des genres du groupe des apicomplexes fait à partir des séquences complètes du gène ARNr 18S (tiré de Morrison 2009).

1.2.2 Espèces du genre *Cryptosporidium*

Cryptosporidium est le seul genre de la famille des Cryptosporidiidées et il est constitué de plusieurs espèces. Traditionnellement, les nouvelles espèces de *Cryptosporidium* étaient identifiées et nommées selon l'hôte dans lequel le parasite avait été identifié la première fois, la localisation des stades de développement endogènes, la morphologie et la localisation des stades de développement exogènes (Slapeta, 2009). Ainsi, les noms des hôtes de *Cryptosporidium* spp. ont souvent été utilisés pour désigner une nouvelle espèce (Fayer, 2010). *C. felis* en est un exemple (Iseki, 1979). Depuis la première description d'une espèce appartenant au genre *Cryptosporidium* (1907), 37 noms d'espèces ont été introduits (Slapeta, 2009). De ces noms, quatre étaient des *nomina nuda* et cinq ont dû être retirés, car ces organismes n'appartenaient pas au genre *Cryptosporidium* (Slapeta, 2009). Des 28 noms d'espèces étudiés par Slapeta en 2009, seulement 21 espèces seraient valides, puisque cinq espèces doivent être mieux décrites afin d'obtenir ce statut et que deux noms sont synonymes (Tableau I). Encore aujourd'hui, le statut des espèces de *Cryptosporidium* n'est pas toujours clair. En effet, une étude de Fayer (2010) accepte *C. macropodum* (Power et Ryan, 2009), *C. fragile* (Jirku et al, 2008), *C. fayeri* (Ryan et al, 2008) et *C. Ryanae* (Fayer et Xiao, 2008), quatre nouvelles espèces non discutées dans l'étude taxonomique de Slapeta effectuée en 2009, alors que les espèces *C. nasoris*, *C. cichlidis*, *C. reichenbachklinkei*, *C. scophthalmi*, *C. pestis* et *C. cuniculus*, acceptées par Slapeta (2009) n'ont pas été discutées par Fayer (2010). Si l'on se fie à ces deux études récentes, il existerait 25 espèces de *Cryptosporidium* valides.

La taxonomie des espèces de *Cryptosporidium* est particulièrement complexe étant donné qu'il existe très rarement de culture *in vitro* (Slapeta, 2009) et de spécimens de référence dans les collections, ce qui est le cas des protistes en général (Morrison, 2009). De plus, bien que l'approche moléculaire se révèle puissante pour différencier les espèces de ce genre, les bases de données publiques de référence telles que DDBJ/EMBL/GenBank ne possèdent pas tous les génotypes correspondant à l'ensemble des espèces décrites de *Cryptosporidium*. De plus, l'information disponible dans ces bases de données est souvent

limitée quant à l'information relative à l'hôte et au lieu d'infection, ce qui restreint la capacité de tirer des conclusions quant à l'adaptation et la spécificité de ces organismes à un hôte (Slapeta, 2009). Les espèces les plus importantes sont *C. parvum*, *C. hominis*, *C. canis*, *C. felis* et *C. muris*. Elles ont été décrites pour une première fois chez leurs différents hôtes, soit le bétail, l'homme, le chien, le chat et la souris respectivement. Il a longtemps été considéré que les parasites étaient spécifiques à l'espèce chez laquelle ils ont été isolés et décrits pour une première fois (Slapeta, 2009). Cependant, l'hypothèse de spécificité de l'hôte a été rejetée suite à des expériences de transmissions croisées (O'Donoghue, 1995; Tzipori et Griffiths, 1998). De nos jours, il est possible d'identifier des génotypes à partir de séquences d'ADN. Ainsi, 61 génotypes ont été caractérisés au moyen d'outils moléculaires; ces derniers n'ont cependant pas le statut d'espèce puisqu'il n'existe pas suffisamment d'information quant à leur biologie et ne répondent donc pas aux normes de la Commission Internationale de Nomenclature Zoologique. Lors du sixième congrès *Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Disease*, qui eut lieu à Paris en 2002, il a été établi que pour obtenir le statut d'espèce, un parasite doit (1) être caractérisé morphologiquement sur la base de ses ookystes, (2) être caractérisé génétiquement, (3) avoir démontré de façon naturelle et expérimentale (si possible) sa spécificité avec son hôte et (4) être conforme aux règles de la Commission Internationale de Nomenclature Zoologique (Fayer et Xiao, 2008; Plutzer et Karanis, 2009).

Tableau I : Mise à jour des noms et le statut attribué aux différentes espèces de *Cryptosporidium* (D'après Slapeta, 2009 et Fayer, 2010)

Nom	Auteur	Statut du nom d'espèce	Homo	Felis	Canis
<i>C. muris</i>	Tyzzler, 1907	valide	oui	oui	oui
<i>C. parvum</i>	Tyzer, 1912	valide	oui	oui	oui
<i>C. crotali</i>	Triffit, 1925	retiré du genre			
<i>C. vulpis</i>	Wetzel, 1938	retiré du genre			
<i>C. baikalika</i>	Matschoulsky, 1947	retiré du genre			
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1955	valide	oui		
<i>C. tyzzleri</i>	Levine, 1961	synonyme (<i>C. meleagridis</i>)			
<i>C. lampropeltis</i>	Anderson et al, 1968	retiré du genre			
<i>C. ctenosauris</i>	Duszynski, 1968	retiré du genre			
<i>C. ameivae</i>	Arcay et Bastardo, 1969	nomina nuda			
<i>C. wrairi</i>	Vetterling et al, 1971	valide			
<i>C. agni</i>	Barker et Carbonell, 1974	nomen dubium			
<i>C. anserinum</i>	Proctor et Kemp, 1974	nomen dubium			
<i>C. bovis</i>	Barker et carbonell, 1974; Fayer et al, 2005	valide			
<i>C. cuniculus</i>	Inman et Takeuchi, 1979	valide			
<i>C. felis</i>	Iseki, 1979	valide	oui	oui	
<i>C. rhesi</i>	Levine, 1980	nomen dubium			
<i>C. serpentis</i>	Levine, 1980	valide			
<i>C. garnhami</i>	Bird, 1980	nomen dubium			
<i>C. natoris</i>	Hoover et al, 1981	valide			
<i>C. enteritidis</i>	Payne et al, 1983	nomina nuda			
<i>C. baileyi</i>	Current et al, 1986	valide			
<i>C. curyi</i>	Ogassawara et al, 1986	nomen dubium			
<i>C. varanii</i>	Pavlassek et al, 1995	valide			
<i>C. villithaecum</i>	Paperna et Vilenkin, 1996	nomina nuda			
<i>C. cichlidis</i>	Paperna et Vilenkin, 1996	valide			
<i>C. reichenbachklinkei</i>	Paperna et Vilenkin, 1996	valide			
<i>C. saurophilum</i>	Koudela et Modry, 1998	synonyme (<i>C. varanii</i>)			
<i>C. galli</i>	Pavlassek, 1999	valide			
<i>C. andersoni</i>	Lindsay et al, 2000	valide	oui		
<i>C. canis</i>	Fayer et al, 2001	valide	oui		oui
<i>C. blagburni</i>	Morgan et al, 2001	nomina nuda			
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan et al, 2002	valide	oui		
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla, 2002	valide			
<i>C. scophtalmi</i>	Alvarez-Pellitero et al, 2004	valide			
<i>C. pestis</i>	Slapeta, 2006	valide	oui		
<i>C. fragile</i>	Jirku et al, 2008	valide			

<i>C. ryanae</i>	Fayer et al, 2008	valide	
<i>C. fayeri</i>	Ryan et al, 2008	valide	
<i>C. macropodum</i>	Power et Ryan, 2009	valide	
<i>C. suis</i>	Ryan et al, 2009	valide	oui

1.2.3 Espèces retrouvées chez le chat, le chien et l'homme

Au début des années 80, il a été démontré de façon expérimentale que *C. parvum* pouvait parasiter le chien. Des anticorps associés au parasite ont été trouvés dans 80% des échantillons sérologiques testés (Tzipori et Campbell, 1981). Jusqu'en 2001, on supposait que les infections à *Cryptosporidium* spp. chez le chien étaient causées par *C. parvum*. Or, le génotype *C. canis* a été découvert en Australie en 2001 à partir d'une séquence d'un fragment du gène ARNr 18S obtenue à partir d'un isolat de biopsie et de coprologie effectués sur un chiot de moins de six mois et atteint du parvovirus (Denholm et al, 2001). En 2001, Fayer et collaborateurs ont montré que le génotype canin possède des patrons d'enzymes de restrictions différents de l'espèce *C. parvum*, ce qui lui conféra le statut d'espèce (*C. canis*). Puis, en 2003, lors d'un examen post-mortem d'un yorkshire de huit semaines, on découvre pour la première fois *Cryptosporidium canis* dans l'estomac d'un chien par l'amplification du fragment du gène actin extrait de la muqueuse intestinale et gastrique (Miller et al, 2003). Bien qu'on la retrouve presque exclusivement chez les canidés, l'espèce *C. canis* infecte également l'homme et le bétail (Abe et al, 2002; Fayer et Xiao, 2008). *C. canis* est incapable de contaminer la souris, même naissante et/ou immunodéficente (Fayer et al, 2001). Les chiens sont susceptibles d'être contaminés par deux espèces soit *C. parvum* et *C. canis* (Fayer et al, 2001).

L'espèce *Cryptosporidium felis* a été identifiée par microscopie et par l'amplification d'un fragment du gène ARNr 18S pour la première fois en 1998 (Sargent et al, 1998). L'analyse de la morphologie des ookystes soulignait une taille inférieure à celles des ookystes trouvés dans les selles d'êtres humains. La taille moyenne d'un ookyste du génotype félin est de 4,6 par 4,0 μm , alors que les ookystes caractéristiques de *C. hominis* ont une taille moyenne de 5,0 par 4,5 μm . Les analyses phylogéniques du gène ARNr 18S ont placé ces séquences provenant d'isolats félins dans un groupe distinct suggérant ainsi le statut d'espèce (Sargent et al, 1998).

1.3 Caractéristiques biologiques

Les espèces du genre *Cryptosporidium* se développent dans le lumen du petit intestin des hôtes vertébrés, à la surface apicale des cellules épithéliales. Des coupes histologiques révèlent un corps basophile attaché à la surface de la cellule lui donnant un aspect granuleux avec des microvillosités. Ces protozoaires sont de forme sphérique ou elliptique et mesurent entre 2 et 6 μm de diamètre. Toutes les espèces du genre *Cryptosporidium* sont munies d'une organelle située à la base de chaque vacuole parasitaire. Cette organelle permet au protozoaire de se nourrir aux dépens de la cellule de l'hôte. Les ookystes matures contiennent quatre sporozoïtes non enveloppés. La taille des ookystes varie entre 4,5 et 7,9 μm de longueur et 4,2 et 6,5 μm de largeur, selon l'espèce. Le complexe apical de ce protozoaire est rudimentaire; il consiste en un anneau double ou triple formant un collier électro-dense (O'Donoghue, 1995).

Contrairement à d'autres apicomplexes parasites d'importance médicale et vétérinaire tels que *Plasmodium falciparum* ou *Toxoplasma gondii*, les espèces du genre *Cryptosporidium* ne possèdent ni génome extranucléaire, ni génome mitochondrial. Le génome de *Cryptosporidium parvum* a été séquencé en 2004 (Abrahamsen et al, 2004). Le génome nucléaire de dix mégabases code pour environ 3 800 gènes dont 4% serviraient aux fonctions enzymatiques. Le génome nucléaire de *Cryptosporidium* spp. est relativement de petite taille si on le compare à d'autres membres des apicomplexes. Ceci serait dû à son faible nombre d'introns et à l'absence de certains gènes codant pour des fonctions métaboliques et pour une variance d'antigènes de surface (Abrahamsen et al, 2004).

Une étude portant sur la spécificité de ce protozoaire démontre que la pathogénicité diffère selon l'espèce impliquée. Okhuysen et collaborateurs (1999) ont montré que la dose infectante, la période de pré-patence, la durée et l'intensité de l'infection diffèrent selon l'espèce et même selon le génotype impliqué. Cela pourrait être dû à une variation dans la composition en protéines de surface du parasite (Mead et al, 1990). En effet, des molécules

importantes pour l'adhérence et l'attachement du protozoaire aux cellules gastriques joueraient un rôle quant à sa virulence. D'autre part, le protozoaire contiendrait également une entérotoxine probablement impliquée dans la virulence (Simon et al, 1994; Okhuysen et al, 1999).

1.4 Cycle de vie et mécanismes de l'infection

Ce parasite ne se multiplie pas dans l'environnement et l'infection résulte d'une exposition directe (i.e. d'animal à animal, d'un animal à l'homme, de l'homme à l'homme) ou indirecte (i.e. par ingestion d'eau contaminée et par pratique d'activités nautiques, par ingestion de nourriture contaminée et par l'air contaminé) (Fayer et al, 2000; Pedraza-diaz et al, 2001).

1.4.1 Développement dans l'hôte

Le cycle de vie complet peut se compléter à l'intérieur de l'hôte (Figure 3) en deux jours (Villeneuve, 2003). Les ookystes sporulés contiennent quatre sporozoïtes immédiatement infectieux qui sont excrétés dans les matières fécales de l'hôte. Une fois ingérés, des facteurs tels que la présence d'enzymes pancréatiques, la température corporelle, le dioxyde de carbone et les sels biliaires entraînent la dégradation d'une extrémité de la paroi de l'ookyste, ce qui permet de libérer les sporozoïtes. Ces derniers s'attachent par la suite à la surface apicale des cellules épithéliales de l'intestin (O'Donoghue, 1995).

Des études *in vitro* démontrent que des facteurs tels que le pH, le temps d'incubation, la dose infectante, les cations divalents et la réponse immunitaire de l'hôte jouent un rôle important sur la capacité des sporozoïtes à s'attacher sur les cellules épithéliales (Hamer et al, 1994). Des glycoprotéines appartenant aux sporozoïtes contribuent également à la mobilité et à l'adhésion, comme par exemple des lectines spécifiques Gal/GalNAc (Joe et

al, 1998). Des études sur *C. parvum* démontrent que ce dernier induit un réarrangement du cytosquelette, avant d'incorporer l'actine et l' α -actine des cellules hôtes, formant ainsi un complexe entre la cellule de l'hôte et le parasite. Cette accumulation filamenteuse d'actine est typique aux cellules infectées par ce protozoaire et elle reste en place durant la pénétration intracellulaire et le début du développement du parasite (Elliot et al, 2000, 2001; Deng et al, 2004).

Le parasite pénètre ensuite dans un compartiment extracytoplasmique, mais intracellulaire. Le mécanisme exact par lequel le parasite atteint cette vacuole parasitaire est méconnu. À ce stade, le protozoaire, alors nommé trophozoïte, se multiplie de façon asexuée par mérogonie, ce qui entraîne la formation de huit nouvelles cellules filles ou mérozoïtes. Ceux-ci pénètrent ensuite de nouvelles cellules épithéliales de l'hôte afin de pratiquer une nouvelle mérogonie et former des mérozoïtes de type II. Ainsi, le mérozoïte I forme quatre mérozoïtes de type II. Suite à l'invasion de nouvelles cellules hôtes, les mérozoïtes II se reproduisent de façon sexuée (gamétogonie) donnant naissance à des microgamètes mâles ou à des macrogamètes femelles qui, à leur tour, se développent respectivement en microgamétocytes et macrogamétocytes. Les microgamétocytes se développent en microgamètes non-flagellés qui fertiliseront les macrogamétocytes afin de former des zygotes. Finalement, le zygote se multiplie de façon asexuée (sporogonie) et donne naissance à un ookyste sporulé contenant quatre sporozoïtes. Parfois, les sporozoïtes se libèrent et redémarrent un nouveau cycle de développement dans le même hôte, mais autrement les ookystes sont évacués avec les matières fécales (O'Donoghue, 1995). Par ailleurs, une étude *in vitro* menée par Hijjawi et collaborateurs (2004) montre que dans un milieu de culture adéquat, ce protozoaire est capable de mener à bien son développement sans cellule hôte.

Chez la majorité des espèces, la période de prépatence de ce parasite se situe dans un intervalle allant de 2 à 14 jours, alors que la période de patence peut varier de quelques jours à plusieurs mois selon les individus et les espèces hôtes (Villeneuve, 2003).

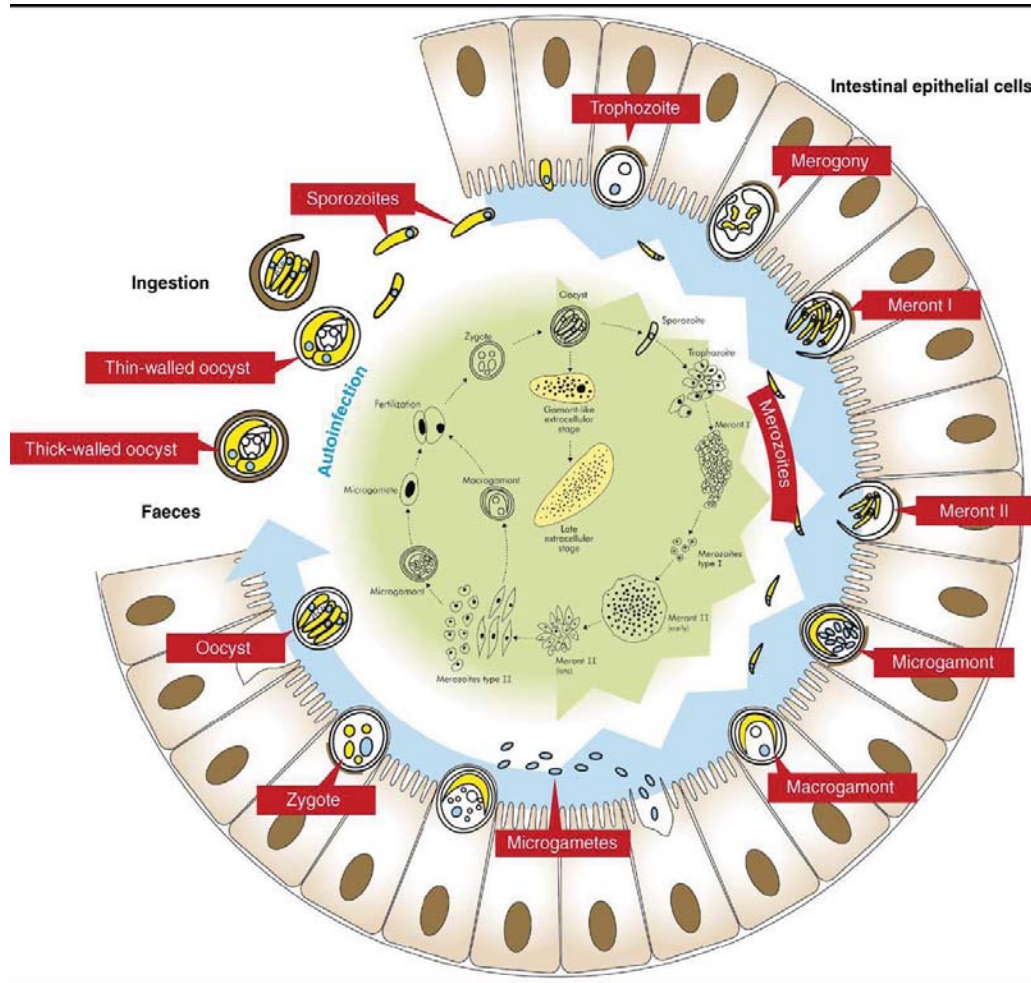


Figure 3 : Cycle évolutif de *Cryptosporidium* spp. dans l'intestin grêle, démontrant les étapes intracellulaires et extracellulaires connues (d'après Hijjawi et al, 2004; Barta et Thompson, 2006).

1.4.2 Dispersion des ookystes dans l'environnement

Les animaux contaminés par *Cryptosporidium* spp., en particulier le bétail, excrètent de grandes quantités d'ookystes contaminant l'environnement et la nappe phréatique (Peeters et al, 1989). Une étude montre que l'eau de surface des pâturages peut contenir jusqu'à 6×10^3 ookystes/L (Madore et al, 1987). Le ruissellement de l'eau de pâturage peut contaminer l'eau potable ou les cours d'eau utilisés à des fins de plaisance. Les chats et les chiens contaminés peuvent également excréter des ookystes dans l'environnement sur une période variant de quelques jours à quelques mois. En effet, Yoshiuchi et ses collaborateurs (2010) montrent que l'excrétion d'ookystes dans les matières fécales peut durer entre 48 et 116 jours chez le chat et entre 21 et 88 jours chez le chien. Les ookystes de ce protozoaire ont la faculté de survivre dans des milieux aérobiques ou anaérobiques, ce qui lui confère la flexibilité de s'adapter très facilement à divers environnements (Barta et Thompson, 2006). Un test en milieu contrôlé montre que les ookystes de *Cryptosporidium* spp. peuvent survivre un an dans l'eau salée à 4 °C (Castro-Hermida et al, 2008). Le fait que les ookystes demeurent viables et infectieux dans l'eau joue un rôle considérable dans la transmission de cette zoonose (Chen et al, 2007).

La capacité du protozoaire d'entrer en dormance et ainsi de rester infectieux sur une longue période de temps lui permet d'accroître sa capacité de dispersion et d'infection. En effet, une durée de dormance prolongée affecte le taux d'amylopectine, un hydrate de carbone qui est la source d'énergie utilisée par le parasite pour éclore et former des sporozoïtes. Il s'agit donc d'un élément important du pouvoir infectant du protozoaire. Lors de la dormance, les ookystes utilisent de petites quantités d'amylopectine et lorsque le seuil devient trop bas, les sporozoïtes qui s'y sont formés manquent d'énergie pour infecter les cellules (Vetterling et Doran, 1969). Des ookystes de *Cryptosporidium parvum* stockés dans de l'eau stérile durant quatre mois à 15 °C ne présentent plus de trace d'amylopectine (Jenkins et al, 2002). Le stade ookyste est relié à la dispersion, à la survie du parasite et à son pouvoir d'infection.

1.5 Réaction du système immunitaire de l'hôte

Lorsque les parasites sont intracellulaires, ils sont moins susceptibles d'être reconnus et éliminés par le système immunitaire de leur hôte (Heussler et al, 2001). Cependant, la cellule contaminée possède la capacité d'engendrer sa propre mort et d'ainsi contrecarrer l'invasion du pathogène (Heussler et al, 2001). Les parasites *Cryptosporidium* spp. logent au pôle apical des cellules épithéliales de l'intestin. La cellule infectée sécrète des cytokines telles que IL-8 et GROS α qui attirent des neutrophiles dans la muqueuse des tissus contaminés (Laurent et al, 1999). Cette médiation cellulaire est très importante pour se débarrasser de la présence du parasite. Ojcius et collaborateurs (1999) ont démontré par immunofluorescence et par cytofluorimétrie que *Cryptosporidium parvum* peut entraîner l'apoptose. Les cellules apoptotiques sont reconnues puis phagocytées par les macrophages. Les résultats indiquent que le pourcentage de cellules subissant l'apoptose est fonction du nombre d'ookystes infectants (Ojcius et al, 1999).

Cependant, *Cryptosporidium* spp. aurait acquis la capacité de moduler les défenses de l'hôte. Ainsi, les protozoaires intracellulaires dont *Cryptosporidium parvum* ont la capacité d'inhiber la mort cellulaire programmée de la cellule hôte en activant le facteur de transcription NF-kB qui régule la transcription de protéines anti-apoptotiques (Heussler et al, 2001).

1.6 Évolution des interactions hôtes-parasites

Une étude phylogénétique sur l'adaptation des parasites à leur hôte suggère que *C. parvum* provient de parasites de rongeurs tandis que *C. meleagridis* provient de parasites d'autres mammifères et qu'ils auraient par la suite changé d'hôte, pour se déplacer vers l'homme, entre autres (Xiao et al, 2002).

Les espèces ayant récemment trouvé un passage chez l'homme seraient plus virulentes afin d'assurer leur succès reproducteur et la propagation de l'infection parasitaire. Cette stratégie est souvent retrouvée lorsque la transmission est horizontale, c'est-à-dire lorsqu'il y a un changement d'hôte (Poulin, 2006). Par exemple, la diarrhée chez l'hôte facilite la transmission des ookystes et ce, même si une diarrhée prolongée peut compromettre la survie de l'hôte. En théorie, le protozoaire évoluera jusqu'à ce qu'il atteigne une exploitation optimale de son hôte, lui permettant ainsi de maximiser sa longévité par son pouvoir reproductif (Dybdahl et Storfer, 2003; Poulin, 2006).

1.7 Décontamination et désinfectants utiles

Des études ont montré que les rayons UV, le chlore et l'ozone affecteraient la viabilité des ookystes de *Cryptosporidium* spp. en modifiant la perméabilité de leur membrane, ou encore en modifiant les stimuli biochimiques qui permettent au protozoaire de pénétrer et de se multiplier dans les entérocytes de son hôte (Quilez et al, 2005).

Certaines compagnies d'épuration des eaux utilisent du dioxyde de chlore et du dioxyde d'ozone pour désinfecter l'eau. Cependant, ces derniers ne sont efficaces que lorsque le seuil de contamination est bas (moins de 10^4 ookystes par ml : Peeters et al, 1989). Une étude *in vivo* montre que la température influence la capacité d'infection. En effet, des ookystes de *C. muris* en suspension dans l'eau, placés trois jours à -5°C et une journée à -20°C ne sont plus infectieux. La même étude démontre le même effet pour une exposition à 55°C durant une minute (Neumayerova et Koudela, 2008).

Quelques désinfectants (Tableau II) ont la capacité d'inactiver des ookystes infectieux. Parmi eux se trouvent les produits à base de formol (10%), d'ammoniaque (5%) ainsi que le peroxyde d'hydrogène (Peeters et al, 1989; Quilez et al, 2005). Quilez et collaborateurs (2005) ont comparé l'efficacité de deux produits à base de peroxyde d'hydrogène sur

Cryptosporidium spp. Leurs travaux montrent que 3% du produit « Ox-Agua », qui contient une concentration de 48% de peroxyde d'hydrogène appliqué pendant 30 minutes rend inactifs les ookystes; le même effet est obtenu avec 5% du produit « Ox-Virin » ayant une concentration de 5% de peroxyde d'hydrogène appliqué pendant 120 minutes.

Tableau II : Désinfectants efficaces contre *Cryptosporidium* spp.

Produits	Temps de contact (minutes)	Références
Ammoniac 5%	120	Campbell et al, 1982
Dioxyde de chlore	15	Peeters et al, 1989
Dessiccation	120 (air libre)	Robertson et al, 1992
Formol 10%	120	Campbell et al, 1982
Congélation -5°C	4320	Neumayerova et Koudela, 2008
Congélation -20°C	1440	Neumayerova et Koudela, 2008
Congélation -70°C	non spécifié	Campbell et al, 1982
Chaleur 55°C	1	Neumayerova et Koudela, 2008
Chaleur 65°C	30	Tzipori, 1983
H ₂ O ₂ 5%	120	Quilez et al, 2005
H ₂ O ₂ 48%	30	Quilez et al, 2005
Ozone 1,11 p.p.m.	6	Peeters et al, 1989

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

1.8 Traitement

Pour le moment, les options de traitement contre les différentes espèces de *Cryptosporidium* sont limitées (Chalmers et Davies, 2010). L'analyse des génomes de *C. hominis* et *C. parvum* a permis de révéler l'absence de cible habituellement utilisée par les traitements conventionnels contre les coccidies (Barta et Thompson, 2006). Contrairement aux autres membres des apicomplexes, les espèces de *Cryptosporidium* ne possèderaient pas de plastide. Ainsi, l'inhibition du métabolisme des plastides n'est pas une option pharmacologique (Zhu et al, 2000). Cook (2008) a d'abord suggéré l'utilisation de la paromomycine, mais celle-ci n'a pas été retenue, car elle provoque de l'insuffisance rénale

chronique chez le chat. Ce même auteur suggère cependant un supplément en glutamine pour aider la guérison des entérocytes affectés par les parasites *Cryptosporidium* spp. D'autres médicaments tels que l'azithromycine et le tylosin peuvent être considérés pour traiter des chats immunodéficients (Cook, 2008). Une étude menée en 2006 par Rossignol et ses collaborateurs montre que la nitazoxanide, un thialozide qui empêche les protozoaires de compléter leur cycle de vie, est considéré comme un traitement efficace contre la diarrhée causée par la présence des parasites *Cryptosporidium* spp. chez les hommes immunocompétents et âgés d'au moins douze ans. Santé Canada (2010) permet l'usage de la paromomycine chez l'homme.

1.9 Prévention

1.9.1 Immunothérapie

Développer un vaccin présenterait de nombreux avantages tels que permettre une protection contre la cryptosporidiose, particulièrement chez les personnes immunodéficientes et donc plus à risque de développer la maladie de façon chronique. Il a déjà été démontré que le colostrum bovin hyperimmun a la capacité d'enrayer ou du moins d'améliorer les signes cliniques chez des personnes atteintes de cryptosporidiose (Ungar et al, 1990; Doyle et al, 1993). Ceci suggère qu'il serait possible de développer un vaccin, à condition d'identifier les antigènes de *Cryptosporidium* spp. Pour être efficaces, les anticorps spécifiques doivent se trouver sur le site d'infection assez longtemps pour se lier à l'antigène au moment approprié du cycle de vie du parasite, inactivant ainsi le mécanisme d'infection (Crabb, 1998).

1.9.2 Anticorps monoclonaux

Puisque les anticorps polyclonaux réduisent l'infection causée par *Cryptosporidium parvum*, Schaefer et ses collaborateurs (2000) ont testé l'hypothèse selon laquelle l'immunité passive pourrait être augmentée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisant des antigènes de stades définis du cycle de vie du parasite. Ces chercheurs ont trouvé que les anticorps monoclonaux 3E2 (anti-CSL [aCSL]), 3H2 (aGP25-200) et 1E10 (aP23) pouvaient réduire l'infection de 93% chez la souris. Des protéines de surface jouent un rôle connu dans l'adhésion, l'attachement et l'invasion des cellules et sont ainsi des cibles potentielles pour l'élaboration d'un vaccin (Joe et al, 1998; Yu et al, 2010). Yao et ses collaborateurs (2007) ont identifié deux nouvelles protéines de surface des sporozoïtes de *Cryptosporidium parvum* potentiellement intéressantes pour la confection d'un vaccin, dont CP12, une protéine importante pour l'adhésion du sporozoïte et de l'ookyste aux cellules épithéliales du système intestinal. Des essais par immunofluorescence montrent que l'anticorps peut spécifiquement se lier à la surface apicale du sporozoïte. Yu et collaborateurs (2010) ont testé les antigènes de CP12 et CP21 en tant que candidats potentiels pour la fabrication d'un vaccin sur des souris BALB/c ayant préalablement été inoculées oralement avec 1×10^6 ookystes de *C. parvum*. L'étude montre que le vaccin par voie nasale offre une meilleure protection que le vaccin injecté par voie intramusculaire. Bien que le vaccin testé par Yu et ses collaborateurs (2010) ne permet pas une protection complète contre le parasite, une diminution statistiquement significative (77,5% de réduction) quant à l'excrétion des ookystes du parasite dans les matières fécales, une augmentation significative du niveau d'IgG dans le sérum, ainsi qu'un plus haut pourcentage des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ ont été notés pour le groupe de souris ayant été vaccinées par voie nasale.

L'efficacité et la sécurité d'utilisation de concentré d'immunoglobulines dérivant de colostrum bovin ont été testés chez des individus atteints à la fois de VIH et du parasite *Cryptosporidium* spp. Le traitement s'est avéré significativement efficace pour diminuer le nombre d'évacuations fécales par jour, en plus de réduire le poids des fèces ($p= 0,04$), sans

engendrer d'effets secondaires (Greenberg et Cello, 1996). Le développement d'un vaccin efficace est actuellement considéré prioritaire afin d'offrir une protection adéquate aux personnes à risque.

2.1 Signes cliniques chez l'homme

Le site principal d'infection est le petit intestin, mais l'infection peut également se propager dans tout le système digestif (Chalmers et Davies, 2010). Dans certains cas isolés, on observe même que *Cryptosporidium* spp. possède la capacité de migrer jusque dans les organes extra-intestinaux (Davis et al, 1987). Les signes cliniques les plus spécifiques de la cryptosporidiose sont : une perte de poids rapide, des crampes, des nausées, des vomissements, une légère fièvre et plusieurs évacuations liquides (jusqu'à dix selles par jour) souvent avec mucus, mais rarement accompagnées de sang. La gravité et la durée de l'infection dépendent du degré d'immunité de la personne atteinte. Les signes cliniques durent de une à deux semaines chez une personne immunocompétente (O'Donoghue, 1995). Il est établi que les espèces zoonotiques peuvent causer la diarrhée chez les individus ayant un système immunitaire déficient (Abe et al, 2002; Bowman et Lucio-Forster, 2010). Cama et collaborateurs (2007) ont caractérisé les différentes manifestations cliniques selon l'espèce de *Cryptosporidium* en cause. Leurs résultats suggèrent que le signe clinique associé à *C. felis* et à *C. canis* est la diarrhée, car *C. hominis* et *C. parvum* étaient également présents chez six des 21 patients qui présentaient des vomissements en plus de la diarrhée. Les auteurs de cette recherche suggèrent que des infections dues à plusieurs espèces de *Cryptosporidium* pourraient être plus fréquentes que ce qui a été observé.

2.2 Facteurs de risque

2.2.1 Immunodéficience

Les groupes les plus à risque de souffrir de cryptosporidiose sont les enfants, les personnes souffrant de malnutrition, les personnes immunodéficientes, les personnes ayant

subi une greffe, ou encore les personnes recevant un traitement de chimiothérapie (Fayer et al, 2000; Tumwine et al, 2005). D'autres études effectuées sur des personnes ayant peu de cellules CD4 (comptage inférieur à 50) ont permis de trouver une faible corrélation entre la présence de ce protozoaire et celle du VIH (Hunter et Nichols, 2002; Bowman et Lucio-Forster, 2010). C'est en 1999 que Pieniazek et collaborateurs ont détecté une première infection chez l'humain causée par *C. felis* et par *C. canis*. Ces mêmes auteurs suggèrent que la découverte d'un nouveau génotype chez l'homme serait issue d'une infection opportuniste; en effet, les personnes testées étaient immunodéficientes et leur infection aurait été causée par des espèces en circulation chez des animaux domestiques. Cependant, *C. felis* a été détectée par PCR chez une fillette de cinq ans immunocompétente ne présentant aucun signe clinique (Wang et al, sous presse). D'autre part, les personnes n'ayant jamais été exposées à *Cryptosporidium* spp. sont plus susceptibles d'être contaminées par de petites quantités d'ookystes, car elles n'ont pas d'anticorps spécifiques contre ces parasites. Aussi, selon l'espèce ou le génotype en cause, la DI₅₀ passe de neuf ookystes à 1 042 ookystes (Okhuysen et al, 1999).

2.2.1 Présence d'animaux domestiques

L'animal domestique partageant l'habitat de l'homme, la proximité et les interactions avec les propriétaires augmentent les risques de transmission d'agents zoonotiques pathogènes. Un sondage mené aux Pays-Bas démontre que 50% des gens permettent à leur animal de compagnie de lécher leur visage, 60% des animaux de compagnie sont admis dans la chambre à coucher, 45 à 60% des chats et chiens sont admis sur le lit et 18 à 30% dorment avec leur propriétaire. Presque 39% des propriétaires de chiens ne ramassent jamais les matières fécales de leur animal. Finalement, 15% des propriétaires de chiens et 8% des propriétaires de chats se lavent régulièrement les mains après avoir caressé leur animal (Overgaauw et al, 2009). Xiao et collaborateurs (2001) ont isolé et détecté, par diagnostic moléculaire, cinq espèces de *Cryptosporidium* issues des matières fécales de 80 enfants immunocompétents au Pérou soit *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. hominis*, *C. canis* et *C. felis*. Selon leurs résultats, la présence d'animaux domestiques

dans l'habitat immédiat n'explique pas la prévalence de ces cinq espèces de *Cryptosporidium* : la prévalence du parasite chez les enfants vivant avec des animaux de compagnie n'est pas statistiquement différente de la prévalence du parasite chez les enfants ne possédant pas d'animal domestique. Une étude récente menée par Neira et collaborateurs (2010) a rapporté pour la première fois la possibilité d'une transmission de *C. parvum* entre une femme immunocompétente, mais atteinte de diarrhée et son chat asymptomatique. En effet, *C. parvum* a été détectée par PCR dans leurs matières fécales et tous deux étaient infectés durant la même période de temps par le parasite. La littérature rapporte peu de cas de zoonose, les animaux domestiques représenteraient un risque minimal dans la transmission zoonotique de cet agent pathogène (Lucio-Forster et al, 2010).

2.3 Prévalence

Une méta-analyse (Hörman et al, 2004) a permis d'estimer la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les habitants des pays nordiques européens (Suède, Norvège, Danemark et Finlande), à 0,99% pour la catégorie de personnes ne présentant pas de signe clinique et 2,91% pour la catégorie de personnes présentant un ou plusieurs signes cliniques (vomissements, gastroentérite, diarrhée, douleur ou crampes abdominales. Selon ces auteurs, la prévalence est sous-estimée, car les personnes n'ayant ni inconfort ni signe clinique ne consultent habituellement pas de médecin pour un contrôle du système gastrique, et que les méthodes de diagnostic utilisées dans les laboratoires médicaux ne sont pas assez sensibles.

La prévalence de *Cryptosporidium* spp. peut atteindre 31,5% dans les pays en voie de développement. Elle affecte particulièrement les enfants (Gatei et al, 2006). Gatei et collaborateurs (2006) ont effectué une recherche sur ce parasite au Kenya et ils estiment que la prévalence de ce parasite est plus élevée chez les enfants âgés de 13 à 24 mois. Les résultats de Gatei et collaborateurs (2006) démontrent que sur les 4 899 échantillons de

matières fécales analysées, 4% contenaient *Cryptosporidium* spp. L'analyse moléculaire a permis d'affiner ces résultats en démontrant que 87% des échantillons étaient contaminés par *C. hominis*, 9% par *C. parvum* et 4% par *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* ou *C. muris*. La même étude montre que le taux d'infection augmente entre novembre et février, c'est-à-dire pendant la saison chaude et sèche au Kenya. Les auteurs de cette étude suggèrent que le manque d'eau en période de saison sèche commune à plusieurs pays en voie de développement diminue la qualité de l'hygiène de ces populations humaines, ce qui a pour conséquence d'augmenter le risque d'être contaminé par *Cryptosporidium* spp. (Gatei et al, 2006). Cependant, une étude menée par Siwila et collaborateurs (sous presse) sur 100 enfants en Zambie, démontre un pic d'infection avec une prévalence de *Cryptosporidium* spp atteignant 34,8 % durant la saison humide (octobre-avril) contre 24,7% lors de la saison sèche (mai-septembre). Les auteurs de cette étude suggèrent que les fortes pluies et le ruissellement auraient probablement contaminé les sources d'approvisionnement en eau.

Aux États-Unis d'Amérique, environ 2% des matières fécales testées lors d'exams médicaux sont positifs à *Cryptosporidium* spp. Étant donné que 15 millions de personnes atteintes de diarrhée consultent un médecin chaque année, on estime à 300 000 le nombre de personnes infectées par ce parasite dans ce pays (Fayer et al, 2000). Durant l'année 2000, toujours aux États-Unis d'Amérique, une étude menée sur 2 896 personnes provenant de 48 États estime la prévalence de *Cryptosporidium* spp. à 13%. De ce nombre, 30% des gens infectés ne présentaient aucun signe clinique (Amin, 2002). De plus, le rapport de surveillance de la cryptosporidiose aux É-U rapporte une augmentation de cet agent pathogène de 111,4% entre 2003 et 2005. La majorité des cas a été rapportée dans les États du nord. Les enfants entre un et neuf ans et les adultes entre 30 et 39 ans comptent parmi les plus fréquemment atteints. Ceci pourrait être expliqué par l'immaturité du système immunitaire des jeunes enfants, puis la transmission à leurs parents ou aux personnes qui en prennent soin (employés de la garderie, enseignants, etc.). L'infection débute en été et persiste jusqu'au début de l'automne, ce qui coïncide avec l'augmentation des activités extérieures, dont la natation (Yoder et Beach, 2007). Cette infection est maintenant à

déclaration obligatoire au Canada, et cela depuis l'année 2000 (Agence de santé publique du Canada, 2003).

2.4 Prévention

Étant donné que les traitements pour la cryptosporidiose restent limités, la prévention reste la meilleure façon de lutter contre le parasite (Chalmers et Davies, 2010). L'ingestion d'eau et d'aliments contaminés, ainsi que le contact direct sont les principaux modes de transmission du parasite (Brown et al, 2004). Comme les personnes infectées excrètent une grande quantité d'ookystes dans l'environnement et que la dose infectieuse est faible, une hygiène rigoureuse incluant de fréquents lavages de mains (particulièrement après avoir changé des couches, après avoir pris soin d'une personne souffrant de diarrhée, après avoir fait ses besoins, après avoir nettoyé des vêtements ou de la literie souillée, après avoir été en contact avec des animaux, avant de préparer de la nourriture et avant de manger) est la principale façon d'éviter la contamination (Brown et al, 2004; Chalmers et Davies, 2010). De plus, les fruits et légumes devraient être lavés avec de l'eau préalablement bouillie, lorsque l'eau potable est indisponible (Chalmers et Davies, 2010). Il est recommandé que les individus contaminés par le parasite soient exclus de leur lieu de travail, de l'école et autres institutions publiques jusqu'à 48 heures après le dernier épisode diarrhéique (Brown et al, 2004). Les individus doivent également attendre un minimum de 48 heures après le dernier épisode diarrhéique avant de fréquenter les piscines publiques, car les ookystes de *Cryptosporidium* spp. continuent d'être excrétés en même temps que les premières selles normales. De plus les ookystes résistent au taux standard de chlore retrouvé dans l'eau des piscines (Peeters et al, 1989; Brown et al, 2004).

Des mesures plus rigoureuses sont recommandées pour les individus à risque. Les jeunes individus atteints de leucémie aiguë, les personnes ayant un système immunitaire déficient, incluant tous les individus dont la fonction des cellules T est compromise, ou encore ayant une déficience du ligand CD 40 (syndrome d'hyper IgM) devraient bouillir l'eau, que ce

soit pour la boire, pour laver des aliments ou pour faire de la glace et ce, pour l'eau provenant de n'importe quelle source, embouteillée ou non (EPA, 1999; Hunter et Nichols, 2002; Brown et al, 2004). Des filtres supprimant les particules d'un diamètre plus petit qu'un micromètre peuvent aussi être utilisés (EPA, 1999). D'autres comportements tels que le contact avec de jeunes animaux et l'ingestion d'eau en se baignant doivent être évités (Hunter et Nichols, 2002).

2.5 Dépistage et identification de *Cryptosporidium spp.*

Plusieurs méthodes existent afin de diagnostiquer l'infection (Figure 4). Les méthodes de concentration, de coloration ou encore les méthodes d'immunofluorescence ou de capture d'antigènes (ELISA) sont utilisées pour dépister la présence d'ookystes dans les matières fécales (Baillargeon, 2004).

2.5.1 Techniques de concentration

Différentes techniques de concentration sont utilisées : la flottation dans une solution saturée de sucrose (technique Sheather), dans une solution saturée de $ZnSO_4$ ou dans une solution saturée de NaCl. Il existe également des techniques de concentration par sédimentation dans la formaline-acétate d'éthyl (FAE) ou dans la formaline-éther (FE) qui nécessitent de plus petites quantités de matières fécales que les techniques de flottation (Bukhari et Smith, 1995; Baillargeon, 2004). Le seuil de détection pour les techniques de flottation de Sheater ou de flottation dans une solution saturée de NaCl est évalué à 4 000 ookystes par gramme de matières fécales (Webster et al, 1996). Bukhari et Smith (1995) ont comparé trois techniques de concentration, soit la flottation de Sheater, la flottation dans le $ZnSO_4$ et celle dans l'eau-éther. Ils ont obtenu des taux de recouvrement respectivement de 24 à 64,8%, de 21 à 40,9% et de 46,4 à 74,9%. De plus, selon leurs résultats, il semble que ni la flottation avec la solution de sulfate de zinc, ni la flottation avec la solution sucrée ne permet de déterminer la viabilité des ookystes. Ainsi, leur choix

quant à la méthode la plus sensible est celle de l'eau-éther suivie par la solution saturée en sucre.

Certains facteurs influencent la sensibilité des techniques de concentration. La provenance des ookystes et la présence de lipides dans les fèces en sont des exemples. Il semble que la méthode de flottation dans une solution saturée en $ZnSO_4$ soit plus efficace pour la détection des ookystes dans le sol que les autres méthodes. Ceci serait dû au fait que les cations dispersent les particules du sol, empêchant ainsi les ookystes de former des agrégats avec celles-ci (Kuczynska et Shelton, 1999). Les techniques par sédimentation sont appropriées lorsqu'il faut extraire les lipides des matières fécales. La FAE retient les lipides et les débris fécaux, ce qui permet aux ookystes de se disperser dans la phase aqueuse. Il est également possible de combiner une méthode de sédimentation avec une méthode de flottation afin d'optimiser les chances d'obtenir un haut taux de recouvrement (Bukhari et Smith, 1995; Baillargeon, 2004).

2.5.2 Techniques de coloration

Les techniques de coloration utilisées pour les ookystes de *Cryptosporidium* spp. sont basées sur les propriétés de coloration alcoolo-acido-résistante de leur membrane (Baillargeon, 2004). Ces techniques comprennent la technique de coloration par la chaleur, aussi nommée Ziehl-Nielsen modifiée, et la technique Kinyoun. La technique de coloration à froid (Kinyoun) requiert une concentration d'ookystes située entre 10^4 et 10^5 ookystes par gramme de matières fécales pour obtenir une efficacité de 100% (Weber et al, 1992). La coloration est couramment utilisée dans les techniques de diagnostic puisqu'elle permet plus facilement de repérer, de reconnaître leur morphologie et de compter les ookystes (Baillargeon, 2004).

2.5.3 Test de capture d'antigène (ELISA)

Les infections avec *Cryptosporidium parvum* stimulent la production d'immunoglobulines A, M et G spécifiques aux antigènes de surface. Il est ainsi possible de diagnostiquer l'agent en cause grâce à un test de capture d'antigène (ELISA). Priest et ses collaborateurs (1999) ont testé la sensibilité et la spécificité d'un ELISA pour la détection d'anticorps contre l'antigène 17-KDa. Les résultats montrent une sensibilité de 91% et une spécificité de 60%. Le test d'immunobuvardage de l'ouest serait plus sensible que l'ELISA (Priest et al, 1999). L'existence d'antigènes communs à *Cryptosporidium* spp. et *Eimeria* spp. diminuerait la spécificité des tests sérologiques, ce qui en limiterait l'utilisation. En effet, une réaction immunitaire croisée entre *Cryptosporidium* spp. et *Eimeria* spp. a été démontrée avec un test ELISA et confirmée par un test d'immunobuvardage de l'ouest (Lorenzo et al, 1998). La non-spécificité des méthodes basées sur les anticorps peut s'avérer problématique lorsqu'il y a une réaction croisée avec d'autres microorganismes. Par exemple, lors d'une étude sur des ookystes trouvés dans les branchies et dans l'hémolymphe d'huîtres, un grand nombre d'organismes de tailles et formes différentes étaient aussi fluorescents que les ookystes de *Cryptosporidium* spp. (Fayer et al, 1998; Fayer et al, 2000).

2.6 Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire par l'utilisation de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est la technique la plus efficace et cela, autant pour les études cliniques que pour les études environnementales (Kaushik et al, 2008). Cette technique, mise au point par Dr Kerry Mullis, se base sur l'amplification d'un fragment spécifique d'ADN. L'ADN amplifié peut ensuite être visualisé sur gel d'agarose et étudié par différentes techniques telles que l'hybridation, l'analyse des RFLP ou encore le séquençage direct (Voet et Voet, 1998).

L'amplification exponentielle du locus choisi permet à la PCR de détecter des séquences cibles présentes en nombres extrêmement faibles dans un échantillon. Cela en fait une méthode très sensible. Cependant, une étude menée par Webster et collaborateurs (1996) montre qu'un seuil minimal de 1 600 ookystes par gramme de matières fécales doit être atteint pour que la PCR détecte le protozoaire. De plus, l'extraction d'ADN et son amplification sont plus ardues lorsque les échantillons proviennent de matières fécales et de l'environnement (Widjoatmodjo et al, 1992; Monteiro et al, 1997). Les échantillons provenant de matières fécales et de l'environnement contiennent des substances inhibitrices de la « Taq polymérase ». En effet, une faible concentration de bile, de bilirubine et des polysaccharides complexes en provenance des matières fécales peuvent inhiber l'activité de la « Taq polymérase » et donc la PCR (Widjoatmodjo et al, 1992; Monteiro et al, 1997). La technique de séparation immunomagnétique (IMS) couplant des billes magnétiques à un anticorps, permet de se débarrasser des impuretés qu'elles soient biologiques, particulières ou chimiques (Webster et al, 1996; Baillargeon, 2004).

Il existe plusieurs variantes de techniques moléculaires conduisant à une grande variété d'applications (Figure 5). Les techniques suivantes ont été utilisées pour le dépistage de *Cryptosporidium* spp.

2.6.1 PCR multiplexe

Le protocole permet d'amplifier plusieurs locus d'ADN distincts à la fois. Ceci est utile pour diagnostiquer des infections concomitantes causées par des génotypes différents, ce que la méthode standard ne permet pas dans une même réaction PCR. Cette méthode se base sur le dessin de couples d'amorces spécifiques correspondant aux différents locus appartenant à chaque génotype. Ainsi, cette méthode a l'avantage d'être plus rapide en diminuant le nombre de réactions PCR à effectuer et la quantité de réactifs totaux à utiliser pour un même nombre de diagnostics. Un PCR multiplexe a été développé pour

diagnostiquer les espèces *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. ryanae*, et *C. bovis* (Santín et Zarlenga, 2009).

2.6.2 PCR emboîtée

Cette technique a pour but d'augmenter la spécificité et la sensibilité du diagnostic. La PCR emboîtée se fait en deux étapes et utilise deux couples d'amorces différents. Le premier couple d'amorces sert à amplifier un fragment de gène spécifique aux différentes espèces de *Cryptosporidium*, alors que le second couple d'amorces permet d'amplifier un fragment interne de l'amplicon de manière spécifique à une espèce particulière de *Cryptosporidium*. Cela permet une meilleure sensibilité et réduit les chances de contamination par la présence d'autres apicomplexes dans les matières fécales à l'étude. Cette technique est capable de détecter la majorité des génotypes et des espèces de *Cryptosporidium* (Xiao et al, 1999).

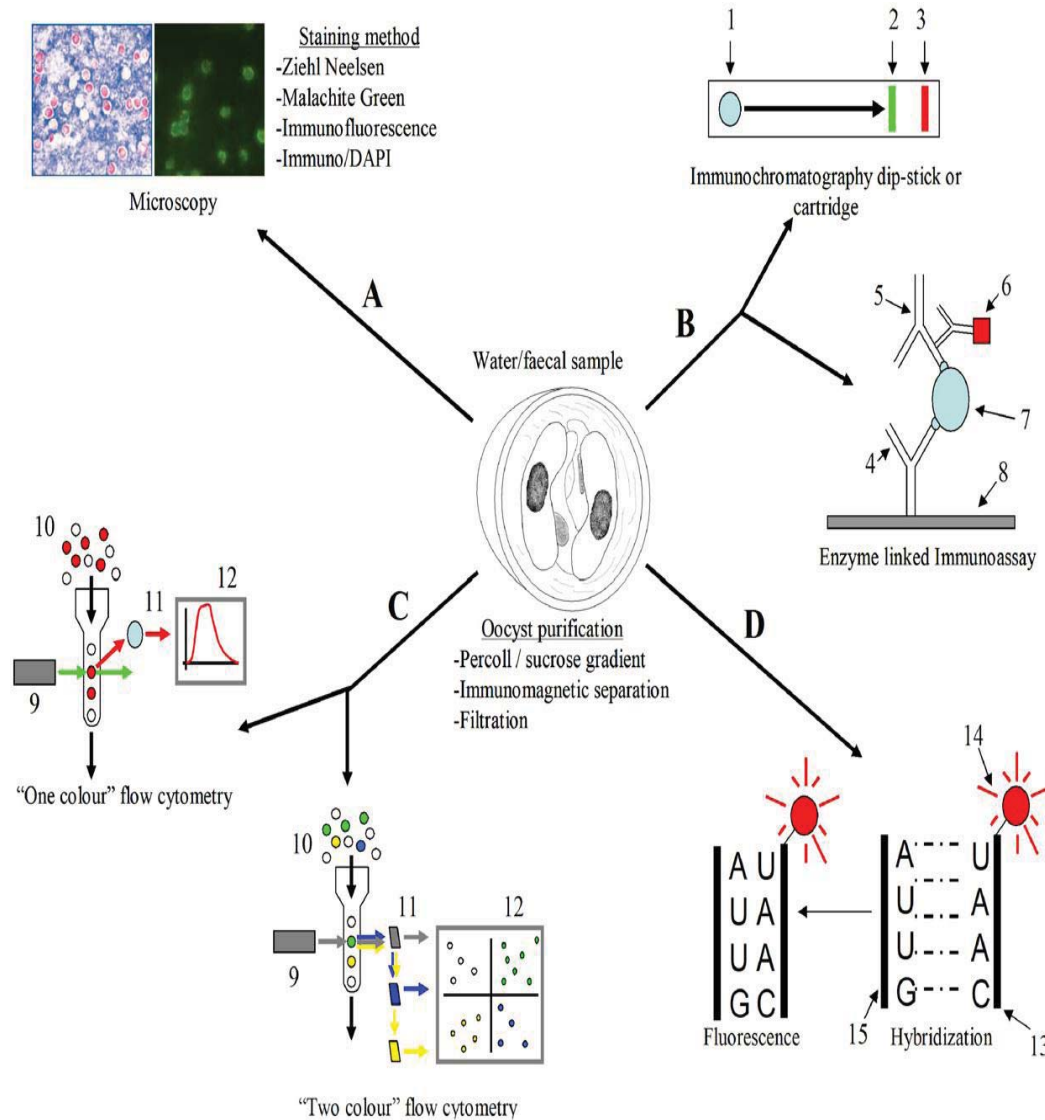


Figure 4: Schéma des différentes approches utilisées pour détecter et quantifier *Cryptosporidium* spp. issu d'échantillons de matières fécales ou d'échantillons d'eau. (A) méthode par microscopie, (B) détection des antigènes par immunoessai, (C) cytométrie, (D) hybridation *in situ*, (1) échantillon à tester, (2) échantillon positif à *Cryptosporidium* spp., (3) contrôle positif, (4) anticorps de capture, (5) anticorps secondaire spécifique, (6) conjugué pour une détection par colorimétrie, (7) antigène, (8) ELISA, (9) émetteur laser, (10) échantillon contenant des oocystes colorés et labellés, (11) détecteur par lumière, (12) affichage par ordinateur, (13) oligonucléotide, (14) fluorochrome, (15) locus cible (ex: gène ARNr 18S). (D'après Jex et al, 2008)

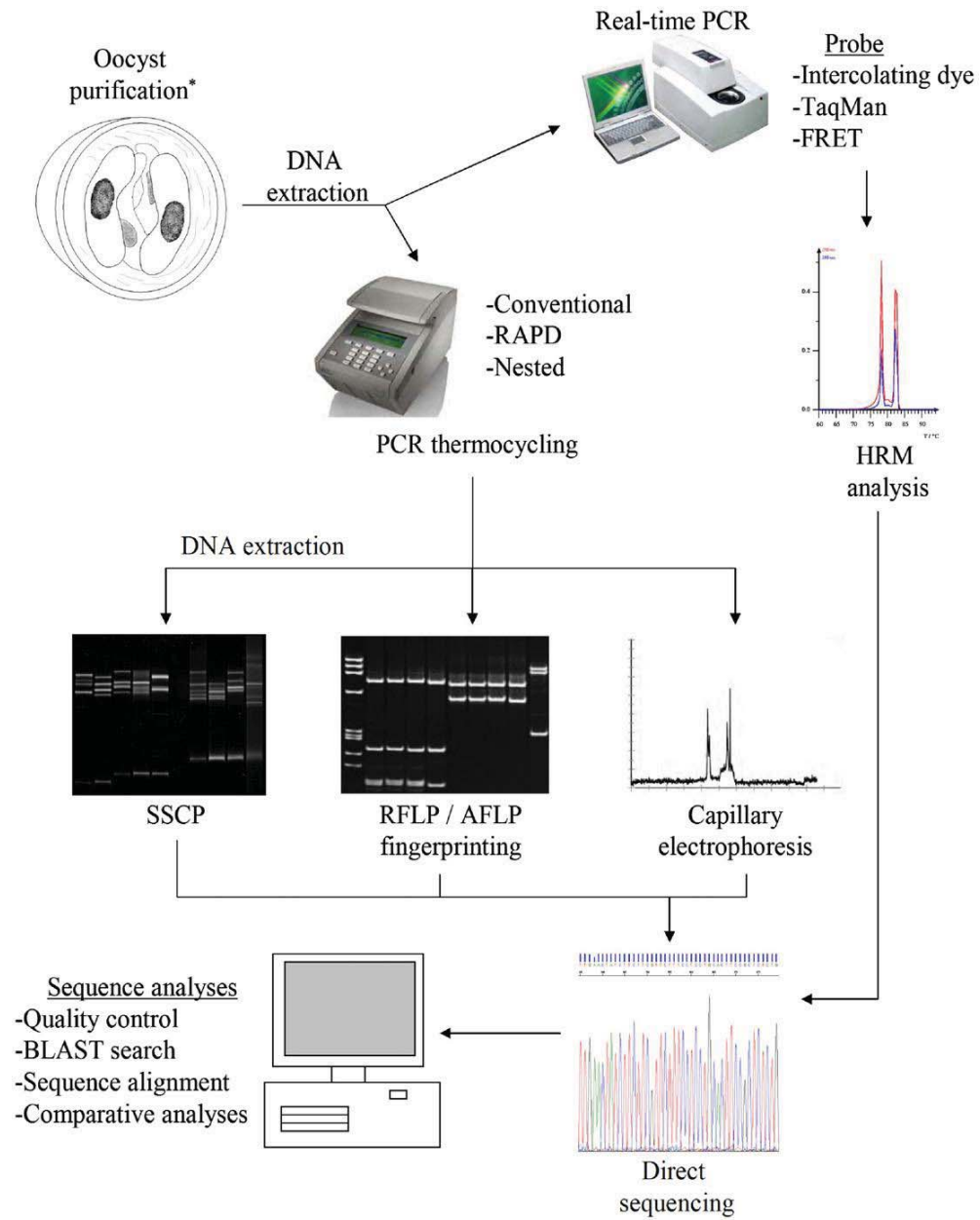


Figure 5: Méthodes basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) afin d'effectuer le génotypage de *Cryptosporidium* spp. (D'après Jex et al, 2008)

2.6.3. Marqueurs moléculaires

Différentes techniques de diagnostic moléculaire ont été utilisées par des chercheurs afin de différencier les espèces et génotypes de *Cryptosporidium* (Figure 5). Les gènes couramment utilisés pour le diagnostic moléculaire de *Cryptosporidium* spp. sont énumérés dans le Tableau III. L'amplification d'un fragment de gène de la petite sous-unité d'ARN ribosomiale (ARNr 18S) est fréquemment utilisée afin de détecter la présence de *Cryptosporidium* spp. chez l'homme, les animaux et l'eau (Jex et al, 2008; Xiao et al, 2010). L'alignement des séquences de ce gène permet de différencier les espèces de *Cryptosporidium* par la présence à la fois de régions hautement conservées et de régions variables (Xiao, 2010). Le diagnostic moléculaire fait à partir des gènes codant pour les protéines de la membrane de l'ookyste (COWP) est moins populaire ces dernières années, car elles ont donné de moins bon résultats que les diagnostics faits à partir du gène ARNr 18S. En effet, seulement 23 sur 116 articles scientifiques publiés entre 2007 et 2010 ont utilisé ce marqueur et dans plusieurs cas, le gène ARNr 18S a été amplifié conjointement aux gènes COWP (Xiao, 2010). D'autres gènes tel que celui codant pour la protéine de l'actine et de la « *heat shock proteine* » (HSP70) permettent d'identifier les différentes espèces de *Cryptosporidium* présentes, alors que les séquences des espaces de transcription (ITS) de l'ADN ribosomiale sont beaucoup plus variables et sont utilisées pour détecter la variation intraspécifique existant au sein d'une même espèce (Jex et al, 2008).

Tableau III : Gènes utilisés pour le diagnostic moléculaire de *Cryptosporidium* spp. chez le chien (*Canis lupus familiaris*), le chat (*Felis catus*) et l'homme (*Homo sapiens*).

Chien	Chat	Homme	Gènes	Références
<i>C. canis</i>		<i>C. canis, C. felis, C. parvum</i>	ARNr 18S	Pieniasek et al, 1999
<i>C. canis, C. parvum</i>			ARNr 18S et HSP70	Morgan et al, 2000
			ARNr 18S et HSP70	Fayer et al, 2001
		<i>C. felis, C. meleagridis, C. parvum</i>	ARNr 18S	Xiao et al, 2001
		<i>C. felis</i>	ARNr 18S et HSP70	Pedraza-Diaz, 2001
<i>C. canis</i>			ARNr 18S	Abe et al, 2002
<i>C. canis</i>			ARNr 18S	Miller et al, 2003
<i>C. canis, C. parvum</i>			COWP	Giangaspero et al, 2006
		<i>C. canis, C. felis, C. hominis, C. meleagridis, C. muris, C. parvum</i>	ARNr 18S	Gatei et al, 2006
<i>C. canis</i>	<i>C. felis</i>		ARNr 18S	Huber et al, 2007
<i>C. canis</i>	<i>C. felis</i>		ARNr 18S	Thomaz et al, 2007
<i>C. muris</i>			ARNr 18S	Lupo et al, 2008
<i>C. canis</i>	<i>C. felis</i>		ARNr 18S	Palmer et al, 2008
	<i>C. parvum</i>	<i>C. parvum</i>	ARNr 18S	Neira et al, 2010
	<i>C. felis</i>	<i>C. felis, C. hominis</i>	ARNr 18S	Wang et al, sous presse
		<i>C. andersoni, C. canis, C. felis, C. hominis, C. meleagridis, C. muris, C. parvum</i>	CpA135	Tosini et al, 2010
	<i>C. muris</i>		ARNr 18S	Ellis et al, 2010
	<i>C. muris, C. felis</i>		ARNr 18S et Actin	Fitzgerald et al, 2011

2.7 Prévalence et facteurs de risque chez le chien

Le protozoaire est signalé dans plusieurs pays (Tableau IV). En Italie, Rinaldi et collaborateurs (2008) ont observé une prévalence de *Cryptosporidium* spp. de 4,2% chez des chiens en milieu urbain. Une autre étude menée au Brésil dans laquelle des fragments du gène ARNr 18S de *Cryptosporidium* spp. retrouvés dans des matières fécales provenant de neuf chiens infectés par ce parasite ont été amplifiés par la réaction PCR puis séquencés, a identifié *C. canis* (Thomaz et al, 2007). Dans la ville d'Osaka (Japon), la prévalence a été estimée à 9,3% et la caractérisation du génotype par amplification et séquençage de fragments du gène ARNr 18S a démontré que 100% des échantillons étaient contaminés par *C. canis* (Abe et al, 2002).

L'environnement du chien influence le risque d'être contaminé par le protozoaire. En effet, les chiens habitant un refuge ont un risque de contamination plus élevé, car le stress affaiblit leur système immunitaire (Palmer et al, 2008). Ils ont également plus de contacts avec d'autres chiens et la possibilité de se réinfecter (Dubnà et al, 2007; Palmer et al, 2008). En Corée, une étude effectuée sur 257 chiens établit une prévalence de *Cryptosporidium* spp. atteignant 9,7%, les plus atteints étant les chiens de compagnie (13,8%), suivis par les chiens de garde (10,1%) puis par les chiens de ferme (6,1%) (Kim et al, 1998). Cependant, en Espagne, il n'existerait pas de différence statistiquement significative de la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les chiens errants et les chiens de compagnie (Causapé et al, 1996).

Par contre, l'âge serait une variable pouvant expliquer la présence du parasite puisque la prévalence la plus élevée (22%) se trouve chez les chiots non-errants de six mois et moins probablement à cause de leur système immunitaire immature (Causapé et al, 1996 ; Palmer et al, 2008). De plus, la prévalence de ce parasite est significativement plus élevée ($p < 0,05$) chez les chiens diarrhéiques (prévalence de 30%) par rapport aux chiens n'ayant pas de diarrhée (prévalence de 4,2 %) (Causapé et al, 1996).

La saison et les habitudes alimentaires pourraient également être des facteurs de risque. En République tchèque, la prévalence de *Cryptosporidium* spp. estimée chez le chien est de 1,4%. De plus, la prévalence globale estimée est significativement plus élevée au printemps et particulièrement dans les milieux ruraux ($p < 0,01$). Les auteurs ont avancé l'hypothèse qu'à la campagne, les animaux ont la possibilité de chasser des hôtes paraténiques et qu'ils sont plus souvent nourris avec de la nourriture crue. Cette même étude permet de conclure que la prévalence peut être jusqu'à sept fois plus élevée chez les chiens de refuge, surtout s'ils y résident pour une longue période (Dubná et al, 2007).

Les études de Causapé (1996) et de Dubná (2007) ne caractérisent pas l'espèce *Cryptosporidium* en cause. Il est difficile d'évaluer si *C. canis* est fréquent et pathogène pour le chien. Cependant, il devient clair que le chien peut contribuer de façon significative à la dispersion de ces agents zoonotiques tant en milieu urbain qu'en milieu rural (Dubná et al, 2007).

Tableau IV : Résumé des études de prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez le chien.

Régions	Prévalence (%)	Méthodes de diagnostic	Espèces	Références
Italie	6/143 (4,2%)	Test ELISA		Rinaldi et al, 2008
Brésil	9/9 (100%)	PCR	<i>C. canis</i>	Thomaz et al, 2007
République tchèque	52/3780 (1,4%)	Technique modifiée de Ziehl-Neelson		Dubnà et al, 2007
Japon	13/140 (9,3%)	PCR	<i>C. canis</i>	Abe et al, 2002
Corée				
Chien de compagnie	11/80 (13,8%)			
Chien de garde	8/79 (10,1%)	Immunofluorescence		Kim et al, 1998
Chien de ferme	6/98 (6,1%)			
Espagne	6/81 (7,4%)	Technique modifiée de Ziehl-Neelson		Causapé et al, 1996

Note : Le taux d'infection correspond au nombre d'animaux contaminés sur le nombre total d'animaux testés

2.7.1 Pathogénicité de *Cryptosporidium* spp. chez le chien

Aydin et collaborateurs (2004) ont détecté la présence d'une espèce de *Cryptosporidium* lors de la nécropsie d'un chiot de dix mois atteint de distemper. *Cryptosporidium* spp. a également été identifié chez un chiot de neuf semaines atteint du parvovirus et souffrant d'une gastroentérite aiguë (Denholm et al, 2001). Lorsque les animaux sont jeunes et atteints d'une infection comme le distemper ou le parvovirus, il devient difficile de déterminer l'importance respective de chaque microorganisme dans l'apparition de signes cliniques. Il n'est pas toujours possible de savoir si la découverte du parasite est accidentelle ou si le protozoaire est associé avec la pathologie. Généralement, l'immunosuppression provoquée par ces infections virales, tel que le distemper augmente la gravité des infections parasitaires. Il est aussi possible que l'infection soit sous-clinique (Aydin et al, 2004). Les signes cliniques identifiés chez un chien adulte immunocompétent atteint de cryptosporidiose sont une perte de poids et la présence d'une diarrhée chronique (Greene et al, 1990).

2.8 Prévalence et facteurs de risque chez le chat

La première découverte de *Cryptosporidium* spp. chez le chat fut faite au Japon en 1979 (Iseki, 1979). Dans la littérature scientifique, trois espèces de *Cryptosporidium* ont été retrouvées chez le chat soit : *C. felis*, *C. parvum* et *C. muris* (Morgan et al, 1998; Sargent et al, 1998; Pavlasek et al, 2007). La prévalence de ce parasite chez le chat a été évaluée par microscopie entre 0% et 12,3% aux États-Unis d'Amérique, en Australie, en République tchèque, au Japon, en Allemagne et en Écosse (Fayer et Xiao, 2008). Par exemple, en Australie, Sargent et collaborateurs (1998) ont trouvé une prévalence de 1,2% de l'espèce féline chez des chats âgés de 12 à 18 mois. Une autre étude australienne menée sur 40 chats (dont les âges se situaient entre six mois et 20 ans) a montré une prévalence de 10%. Si ces 40 échantillons de matières fécales félines ont montré des résultats négatifs à *Cryptosporidium* spp. lors d'une évaluation microscopique, il s'avère que suite à l'amplification et au séquençage du fragment du gène ARNr 18S, 10% de ces mêmes échantillons contenaient *C. felis* (McGlade et al, 2003). Thomaz et collaborateurs (2007)

ont également amplifié et séquencé un fragment du gène ARNr 18S provenant d'échantillons positifs à *Cryptosporidium* spp. issus de sept chats ayant passé un examen de routine à la Faculté de médecine vétérinaire de Sao Paulo (Brésil). Tous les échantillons contenaient *C. felis*. Malgré le petit nombre d'échantillons, ce résultat est important vu la possibilité zoonotique de cet agent pathogène.

Sachant que l'excrétion des ookystes de *Cryptosporidium* spp. est intermittente autant chez les chats asymptomatiques que chez les chats présentant des signes cliniques, il est possible que la prévalence chez le chat soit sous-évaluée, car les matières fécales sont souvent testées qu'une seule fois par individu (Rambozzi et al, 2007).

Rambozzi et collaborateurs (2007) ont identifié quatre facteurs de risque pour le chat, statistiquement associés à une augmentation de probabilité de contracter la maladie. Ces facteurs sont : un âge inférieur à un an, le type de diète (s'il est adepte d'une diète maison ou d'une diète commerciale), la présence de diarrhée et la présence d'autres parasites entériques. La présence de kystes de *Giardia* est associée de façon statistiquement significative avec l'excrétion d'ookystes de *Cryptosporidium* spp. chez les félins (Ballweber et al, 2009).

2.8.1 Pathogénicité de *Cryptosporidium* spp. chez le chat

Il est possible que les infections dues à *C. felis* n'engendrent pas ou peu de signes cliniques chez le chat, puisqu'il serait adapté à cet hôte (Ballweber et al, 2009). Une étude d'Asahi et de ses collaborateurs (1990) ne permet pas d'associer de signe clinique avec la présence de *Cryptosporidium* spp. chez des chats. Cependant, certains chats infectés par *C. felis* présentent des signes cliniques tels que de l'anorexie, de la diarrhée et une perte de poids (Poonacha et Pippin, 1982; Thomaz et al, 2007). La cryptosporidiose est pratiquement toujours auto-limitante chez le chat. La diarrhée ne serait pas statistiquement

associée avec l'infection par *Cryptosporidium* spp., ce qui signifie que dans la plupart des cas, les chatons immunocompétents sont des porteurs asymptomatiques (Abe et al, 2002).

Chapitre II : *Cryptosporidium* spp. chez le chat et le chien au Québec

1 Hypothèses et objectifs

Des hypothèses liées aux différentes variables identifiées dans la revue de littérature seront testées. (1) Les chiens sont plus à risque d'être contaminés par *Cryptosporidium* spp. que les chats, car ils seraient plus fréquemment exposés aux environnements contaminés par le parasite, contrairement aux chats, souvent confinés à l'intérieur. (2) Les chiens et les chats sont plus propices à s'infecter lors de saisons durant lesquelles la température est tempérée (i.e. le printemps et l'automne). (3) Les jeunes chiens et les jeunes chats (< 1 an) sont plus à risque d'être infectés par le parasite étant donné que leur système immunitaire acquis est moins compétent que celui des animaux adultes (> 1 an), et (4) les animaux infectés par *Giardia* spp sont plus susceptibles d'être également infectés par *Cryptosporidium* spp. car ce sont tous deux des parasites ubiquistes et le mécanisme d'infection est le même.

Une autre composante du projet de recherche avait pour but d'identifier les espèces et les génotypes de *Cryptosporidium* que l'on retrouve chez le chat et le chien à l'aide du diagnostic moléculaire. L'identification des espèces et génotypes présents chez leurs hôtes domestiques (chats et chiens) à l'aide de séquences d'ADN et d'analyses phylogénétiques devait permettre de déterminer l'existence potentielle de compartiments spécifiques pour une espèce ou encore certains génotypes. Ces données devaient servir à leur associer des signes cliniques (s'il y en a) spécifiques.

2 Méthodologie

2.1 Échantillons

Durant l'année 2008, 1 202 échantillons de matières fécales de chiens ($n = 831$) et de chats ($n = 371$) provenant d'établissements vétérinaires de la province de Québec circonscrits entre les coordonnées GPS suivantes : sud-est : 45.311 115,-73.254 089 à sud-ouest : 45.495 278,-75.646 362 et de nord est : 48.593 867,-68.192 825 à nord-ouest : 48.67736,-72.445221 (Figure 6) ont été analysés. Les échantillons envoyés au laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal provenaient de cas internes du Centre hospitalier universitaire vétérinaire (CHUV) de l'Université de Montréal ($n = 144$) ou de cliniques vétérinaires privées ($n = 1 058$).



Figure 6 : Distribution géographique de la provenance des 831 échantillons fécaux de chiens et des 371 échantillons fécaux de chats analysés durant l'année 2008 par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.

Les matières fécales ont été récoltées directement sur le sol ou dans la litière. La quantité de matières fécales soumise correspondait à la totalité des selles pour les chats et une portion entre 5 et 50 g pour les chiens. Les échantillons ont ensuite été placés individuellement dans un contenant en plastique, puis dans une boîte avec un bloc de gelée congelable rigide, afin de les garder au frais. Le tout a été envoyé par courrier rapide et livré au laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal en moins de 24 heures. Les échantillons ont été placés à 4°C avant d'être analysés la journée même de leur réception, ou le lendemain.

2.2 Animaux testés

Les raisons ayant poussé les propriétaires à demander une analyse de fèces de leur animal sont multiples. Les animaux testés pour cette étude ont été soit des animaux atteints de diarrhée, des animaux ayant du sang dans les fèces ou, en dernière option, des animaux malades sur lesquels plusieurs tests ont été effectués sans succès. Les coproscopies ont également été réalisées sur des matières fécales provenant d'animaux sains, lors d'exams annuels, de nouvelles adoptions ou de suivis médicaux.

2.3 Dossiers

Pour soumettre un échantillon, les demandeurs avaient à leur disposition un exemplaire de requête fourni par le laboratoire (Annexe I), qu'ils ont dû remplir. La qualité de l'anamnèse et des informations concernant l'animal varie selon chaque médecin vétérinaire responsable de son évaluation clinique. Ainsi, plusieurs formulaires n'ont pas été complétés entièrement, ce qui explique le nombre de variables incomplètes dans les tableaux des résultats. Les données descriptives de l'animal ont été tabulées dans le logiciel informatique « Omnitech », alors que l'anamnèse est capturée dans le dossier papier.

2.4 Centrifugation dans le sulfate de zinc

La technique utilisée par le laboratoire de parasitologie du CHUV pour le diagnostic de *Cryptosporidium* spp. provenant de matières fécales est la centrifugation dans le sulfate de zinc. La solution saturée de sulfate de zinc est composée de 331 g de ZnSO₄ par litre d'eau du robinet. Une fois le ZnSO₄ dissout, la densité obtenue varie entre 1,18 et 1,20, ce qui permet de faire flotter les ookystes de *Cryptosporidium* spp.

Deux grammes de matières fécales par échantillon ont été utilisés en incluant le mucus périphérique (si présent). Dix millilitres d'eau du robinet ont été ajoutés à ces deux grammes de matières fécales afin de les solubiliser. L'échantillon a été filtré à l'aide d'une triple épaisseur de gaze ou d'un tamis à thé pour enlever les gros débris. Le filtrat a ensuite été versé dans un tube à centrifugation pour être centrifugé à 1 500 rpm durant dix minutes. Par la suite, le surnageant a été enlevé et le culot, entièrement et minutieusement solubilisé avec un bâtonnet dans une petite quantité de sulfate de zinc avant d'ajouter de la solution de sulfate de zinc dans le tube jusqu'à l'obtention d'un ménisque positif afin d'y déposer une lamelle. Le tube a été centrifugé de nouveau à 1 500 rpm pendant dix minutes. Finalement, la lamelle a été transférée sur une lame sur laquelle une goutte de sucrose a été déposée, puis examinée au microscope avec un objectif 40X. Le sucrose facilite l'identification de *Cryptosporidium* spp. en donnant un aspect rosé et brillant au cytoplasme du protozoaire (Figure 7).

Bien que la littérature stipule que la technique du Winsconsin soit la technique à favoriser pour le diagnostic de *Cryptosporidium* spp., le laboratoire de parasitologie du CHUV utilise la centrifugation dans le sulfate de zinc, car celle-ci permet de récupérer un plus grand nombre d'ookystes et de se débarrasser de plus de débris, ce qui facilite la lecture au microscope (Alain Villeneuve, communication personnelle).

Les échantillons présentant des ookystes de *Cryptosporidium* spp. ont été placés à 4°C pour une durée de temps variant entre 24 heures et une semaine, avant d'être utilisés pour l'extraction d'ADN. L'ADN a été conservé à -20°C, pour ensuite être soumis à l'amplification par PCR. L'amplification d'ADN a été tentée sur six échantillons provenant de matières fécales de chats et sur six échantillons provenant de matières fécales de chiens.

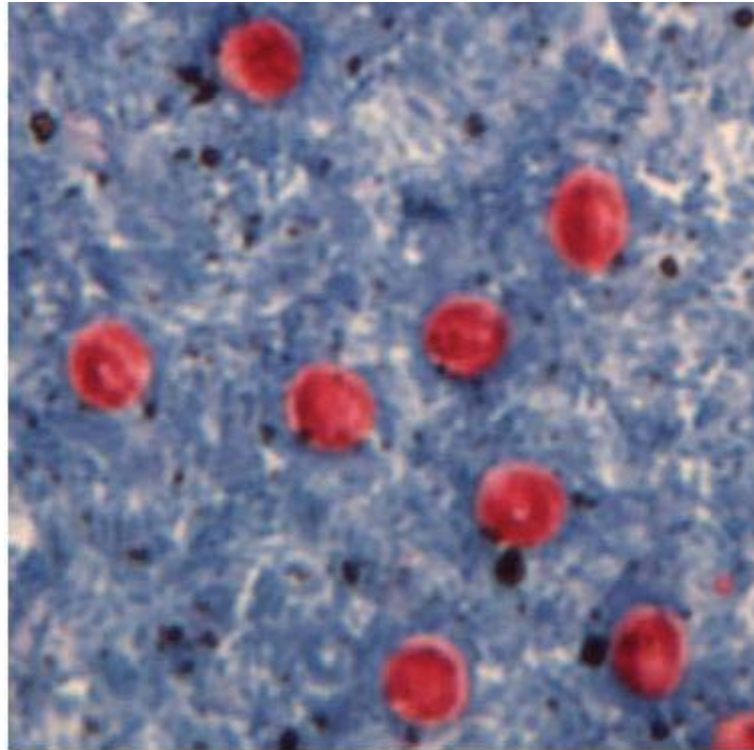


Figure 7 : Identification microscopique de *Cryptosporidium* spp. à l'aide de la méthode de centrifugation dans le sulfate de zinc (image du Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, provenant de <http://dpd.cdc.gov/>).

2.5 Traitement des données et tests statistiques

Les données ont été classées dans un fichier Microsoft ExcelTM afin de calculer la prévalence globale et spécifique chez les chats et les chiens testés. Pour cette étude, les facteurs de risque sont définis comme étant des agents associés à l'augmentation de la probabilité à être infecté par le parasite *Cryptosporidium* spp. Tous les facteurs de risque ont été répartis en catégories nominales soit : selon l'espèce (féline ou canine), l'âge (moins

de un an et plus de un an), le sexe (femelle ou mâle) et la saison de l'échantillonnage (automne, hiver, printemps ou été).

L'existence d'une relation entre *Cryptosporidium* spp. et les variables décrites plus haut a été effectuée à l'aide des tests statistiques Khi^2 ou du test exact de Fisher lorsque les valeurs attendues sont plus petites que cinq. Les tests ont été exécutés à l'aide du logiciel informatique SAS v9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.5.1 Test du Khi^2

Le Khi^2 a été utilisé pour tester l'indépendance entre les animaux présentant des ookystes de *Cryptosporidium* spp. dans leurs matières fécales par rapport aux animaux exempts d'ookystes selon les variables étudiées. Le principe du test du Khi^2 repose sur la différence au carré entre la fréquence observée et la fréquence attendue divisé par la fréquence attendue (Dawson et Trapp, 2004):

$$\chi^2(\text{degrés de liberté}) = \sum (\text{fréquence observée} - \text{fréquence attendue})^2 / \text{fréquence attendue}$$

Le seuil critique alpha a été fixé à 0,05, il est ainsi accepté qu'il existe un risque de 5% de rejeter H_0 alors qu'elle ne devrait pas être rejetée. Sous ce seuil, l'hypothèse H_0 a été rejetée.

Les données étant nombreuses chats ($n = 371$) et chiens ($n = 831$), il a été possible d'appliquer le théorème central limite et donc d'affirmer que la distribution est normale. Cependant, pour les facteurs de risque suivants : l'âge chez le chat et l'infection par *Giardia* spp. chez le chat, la méthode exacte de Fisher a été appliquée étant donné que les effectifs n'étaient pas assez grands (fréquence attendue < 5) pour respecter la condition d'application du Khi^2 . Pour ces cas, la validité des hypothèses a été déterminée au seuil α de 0,05 avec 1 degré de liberté.

2.5.2 Hypothèses posées

Espèce

H0 : Il n'existe pas de différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. selon les espèces testées (chat et chien).

H1 : Il existe une différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. selon les espèces testées (chat et chien).

Âge

H0 : Il n'existe pas de différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) âgés de moins d'une année et la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux âgés de plus d'une année.

H1 : Il existe une différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) âgés de moins d'une année et la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux âgés de plus d'une année.

Sexe

H0 : Il n'existe pas de différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) de sexe féminin et la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux de sexe masculin.

H1 : Il existe une différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) de sexe féminin et la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux de sexe masculin.

Saison

H0 : Il n'existe pas de différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) selon les quatre saisons (hiver, printemps, été, automne).

H1 : Il existe une différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) selon les quatre saisons (hiver, printemps, été, automne).

Infection par *Giardia* spp.

H0 : Il n'existe pas de différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) infectés par *Giardia* spp. par rapport à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) exempts de *Giardia* spp.

H1 : Il existe une différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) infectés par *Giardia* spp. par rapport à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les animaux (chats et chiens) exempts de *Giardia* spp.

2.6 Extraction de l'ADN

Des échantillons fécaux provenant de chats (n = 12) et de chiens (n = 17) contenant des ookystes de *Cryptosporidium* spp. ont été traités avec la trousse commerciale « *KIT PowerSoilTM DNA Isolation Kit* » (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) en respectant les recommandations du fabricant.

2.7 Amplification de l'ADN

La méthode de PCR emboîtées ou « nested PCR » a été utilisée afin d'amplifier des fragments des gènes ARNr 18S et HSP70. La méthode de PCR emboîtées a été retenue, car elle permet une meilleure sensibilité tout en réduisant les possibilités de contamination. L'amplification d'un fragment du gène HSP70 (environ 1950 pb) et du gène nucléaire ARNr 18S (environ 830 pb) a été choisie, car en plus d'être présents en plusieurs copies, ces gènes possèdent à la fois des régions polymorphiques et des régions interspécifiques hautement conservées. Ceci est un atout, puisque les régions conservées permettent de dessiner des amorces communes à toutes les espèces de *Cryptosporidium*. Les régions polymorphiques, quant à elles, permettent de discriminer les différentes espèces de protozoaires sur la base de différences dans la séquence d'ADN (Xiao et al, 2002; Fayer et Xiao, 2008).

Les séquences des fragments de gènes ARNr 18S et HSP70 ont été utilisées dans plusieurs études afin de caractériser *C. muris*, *C. andersoni*, *C. serpentis*, *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. wrairi*, *C. saurophilum*, *C. ferret*, *C. felis*, et *C. canis*, ce qui justifie leur utilisation pour la présente étude (Tableau III). Deux couples d'amorces par gène ont donc été utilisés afin d'effectuer la réaction de PCR emboîtées. Le premier couple d'amorces, P1F et P2R, permet l'amplification du grand fragment de gène ARNr 18S, alors que deuxième couple d'amorces, P3F et P4R, permet d'amplifier le fragment intérieur (Tableau V; Annexe II). Les couples d'amorces P5F et P6R ainsi que P7F et P8R permettent respectivement l'amplification du grand fragment et du fragment intérieur du gène HSP70.

Tableau V : Liste des amorces utilisées pour l'amplification des fragments des gènes ARNr 18S et HSP70 par la méthode de PCR emboîtées.

Noms	Séquences 5'-3'	Gènes	Produits (bp)	Orientations	Références
P1F	TTCTAGAGCTAA TACATGCG	ARNr 18S	~1320	Sens	Xiao et al, 1999
P2R	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA	ARNr 18S		Antisens	Xiao et al, 1999
P3F	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	ARNr 18S	~830	Sens	Xiao et al, 1999
P4R	AAGGAGTAAGGAACACCTCCA	ARNr 18S		Antisens	Xiao et al, 1999
P5F	ATGTCTGAAGGTCCAGCTATTGGTATTGA	HSP70	~2000	Sens	Irshad et al, 2000
P6R	TTAGTCGACCTCTTCAACAGTTGG	HSP70		Antisens	Irshad et al, 2000
P7F	TATTCATGTGTTGTGTATGGAGAAA	HSP70	~1950	Sens	Irshad et al, 2000
P8R	CAACAGTTGGACCATTAGATCC	HSP70		Antisens	Irshad et al, 2000

Les oligonucléotides lyophilisés ont été centrifugés à 14 000 rpm durant 20 secondes avant d'être reconstitués avec de l'eau ultra pure (exempte d'ADN et d'ARN) jusqu'à l'obtention d'une concentration de 200 pmol/ μ l. Une fois reconstituées, les amorces sont restées à température pièce pendant une heure pour ensuite être homogénéisées au vortex. Les amorces ont par la suite été diluées dans de l'eau ultra pure jusqu'à une concentration de 5 pmol.

Les quatre réactions de PCR ont été effectuées dans un volume total de 50 μ l constitué de 5 μ l de l'extrait d'ADN ajouté à 21,5 μ l d'eau ultra pure, 5 μ l de BSA de concentration 1 μ g/ μ l, 5 μ l de solution tampon 10X, 1 μ l de DNTPs 10 mM, 0,5 μ l de Taq polymérase à 5U/ μ l, 6 μ l d'amorce sens 5 pmol/ μ l et 6 μ l d'amorce antisens 5 pmol/ μ l. Seul le couple d'amorces a changé afin de réaliser les réactions de PCR emboîtées, indépendamment du gène à amplifier. Un contrôle négatif a été fait en remplaçant les 5 μ l d'ADN par 5 μ l d'eau ultra pure. Des extractions d'ADN de *C. parvum* conservées à -20°C provenant d'études antérieures du laboratoire de microbiologie de l'Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement (IRDA) ont servi de contrôles positifs.

Chaque amplicon a été versé dans un microtube de 0,5 ml à paroi mince pour la réaction de PCR puis déposé dans un thermocycleur. Les cycles d'amplification pour les deux fragments du gène ARNr 18S débutent par un cycle de dénaturation de l'ADN de 15 min à 95°C, suivi de 36 cycles d'amplification de l'ADN de 55 s à 94°C, de 30 s à 55°C (appariement des amorces), de 50 s à 72°C (synthèse du brin complémentaire d'ADN) et d'un cycle de 10 min à 72°C. Les cycles d'amplification pour les deux fragments du gène HSP70 débutent par un cycle de 15 min à 95°C suivi de 40 cycles de 45 s à 94°C, de 45 s à 55°C, de 60 s à 72°C et d'un cycle de 10 min à 72°C. Une fois ces cycles terminés, les amplicons ont été conservés à une température de 4°C avant d'être visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose.

2.8 Migration sur gel d'électrophorèse et visualisation des fragments d'ADN

Des concentrations de 0,5% et de 0,7% d'agarose ont été utilisées pour la préparation de gel d'électrophorèse afin de visualiser les produits des amplifications des fragments des gènes HSP70 et ARNr 18S obtenus à la dernière étape des réactions de PCR emboîtées. L'agarose a été mélangée à 100 ml de la solution tampon TBE 1X avant d'être chauffée jusqu'à dissolution complète. Le liquide a ensuite été versé sur le module d'électrophorèse de façon à éviter la formation de bulles. Un couvercle a été placé sur le module durant 30 minutes, jusqu'à ce que le gel soit figé. Les paramètres de migration sont les suivants : 100 volts et 400 mAmps pour 60 minutes. Une fois la migration terminée, le gel a été placé dans la solution colorante commerciale SYBR safeTM (Invitrogen, Carlsbad, CA) durant 30 minutes à l'abri de la lumière et sous agitation lente. Finalement, le gel a été placé sur la plaque du transilluminateur sous un rayonnement UV afin de visualiser les produits d'ADN.

2.9 Caractérisation moléculaire à partir des séquences d'ADN

Le but de cette étape est de réaliser la caractérisation moléculaire des différents isolats de *Cryptosporidium* spp. que l'on retrouve chez les chats et les chiens du Québec à partir des séquences du fragment de gène ARNr 18S préalablement obtenues par séquençage des produits de PCR.

Chaque produit PCR a été purifié à l'aide « QIAquick purification kit » (QIAGEN). La PCR de séquençage a été réalisée avec « Big Dye terminator cycle sequencing kit version 1.1 » (Applied Biosystems). Le séquençage a été effectué avec un séquenceur « DNA analyser ABI 3730 » de Applied Biosystems dans les deux directions, en utilisant les amorces sens et antisens (Tableau V) à la plateforme génomique de l'Institut de recherche en immunologie et oncologie de l'Université de Montréal. Les chromatogrammes de toutes les séquences ont été vérifiés au moyen du logiciel informatique « FinchTV 1.4.0 » (Geospiza Inc.), pour ensuite être alignés en utilisant « Clustal X 1.83 » (Thompson et al, 1997). La caractérisation moléculaire à partir des séquences a pu être réalisée en utilisant l'outil de recherche BLAST (Altschul et al, 1990) de la base de donnée GenBank.

2.9.1 Relations phylogénétiques entre les différents génotypes

Cette étape a pour but d'inférer sur les relations phylogénétiques qui existent entre les espèces et génotypes de *Cryptosporidium* spp. isolés chez les chats et les chiens du Québec à partir des séquences du fragment de gène ARNr 18S obtenues par séquençage des produits de PCR.

Les relations phylogénétiques entre les différentes espèces de *Cryptosporidium* spp. trouvées ont été inférées au moyen des méthodes d'analyse bayésienne et de maximum de vraisemblance implémentées dans « MRBayes 3.1.2 » (Ronquist et Huelsenbeck, 2003) et « Treefinder » (Jobb et al, 2004) respectivement. Le choix du meilleur modèle de

substitution a été déterminé par le logiciel « MODELTEST 3.7 » (Posada et Crandall, 1998). Une séquence du gène ARNr 18S de *Eimeria tenella* telle qu'utilisée par Nakamura et collègues (2009) a servi de groupe externe. Chaque analyse bayésienne a été initiée à l'aide d'un arbre aléatoire utilisant le meilleur modèle de substitution déterminé par le logiciel « MODELTEST 3.7 » et comprenant deux simulations de *Markov Chain Monte Carlo* pendant 1 000 000 générations avec huit chaînes simultanées, en utilisant une fréquence d'échantillonnage à toutes les 1 000 générations et un allumage des 1 000 premiers arbres phylogénétiques.

3 Résultats

3.1 Prévalence globale de *Cryptosporidium* spp.

Les analyses de matières fécales par centrifugation dans le sulfate de zinc montrent qu'en 2008, 28 des 371 chats et 88 des 831 chiens (Figure 8) testés à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, excrétaient des ookystes de *Cryptosporidium* spp. Ainsi, la prévalence chez les animaux domestiques testés est de 7,55% pour les chats et de 10,59 % pour les chiens. La différence de prévalence entre les deux espèces d'hôte n'est pas statistiquement significative (Tableau VI $p = 0,0989$) et la prévalence est donc considérée semblable.

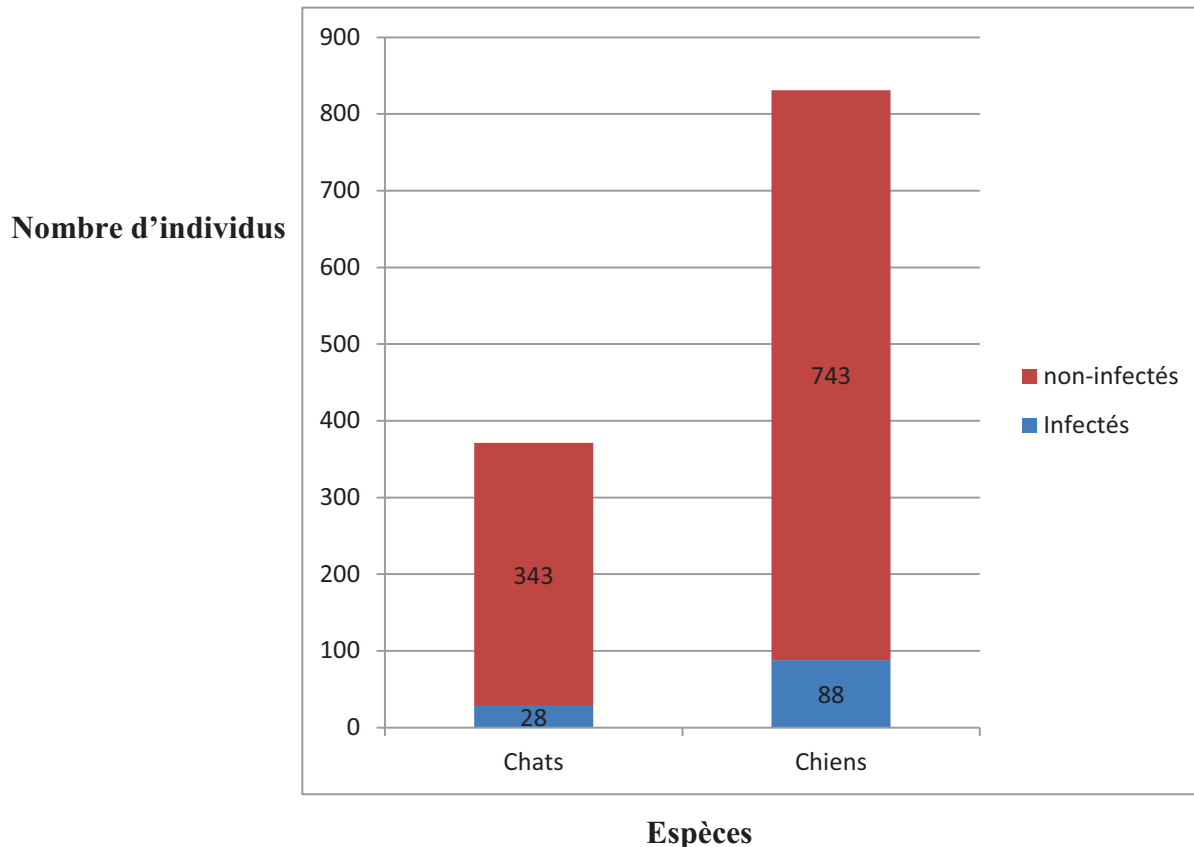


Figure 8 : Proportion des chats et des chiens dont les analyses coproscopiques effectuées par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal en 2008 ont révélé la présence d'ookystes de *Cryptosporidium* spp. dans leurs matières fécales (en bleu), par rapport aux animaux exempts d'ookystes (en rouge).

3.2 Prévalence des autres entéroparasites

Plusieurs entéroparasites ont été diagnostiqués lors des coproscopies effectuées par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. La majorité des infections concomitantes observées chez le chat et le chien infectés par *Cryptosporidium* spp. dans cette étude était le fait de *Giardia* spp (Tableau VI). Il est intéressant de noter que *Cryptosporidium* spp. est l'entéroparasite le plus fréquent chez le chat (Figure 9) alors que *Giardia* spp. est l'entéroparasite qui a été diagnostiqué le plus souvent chez le chien (Figure 10).

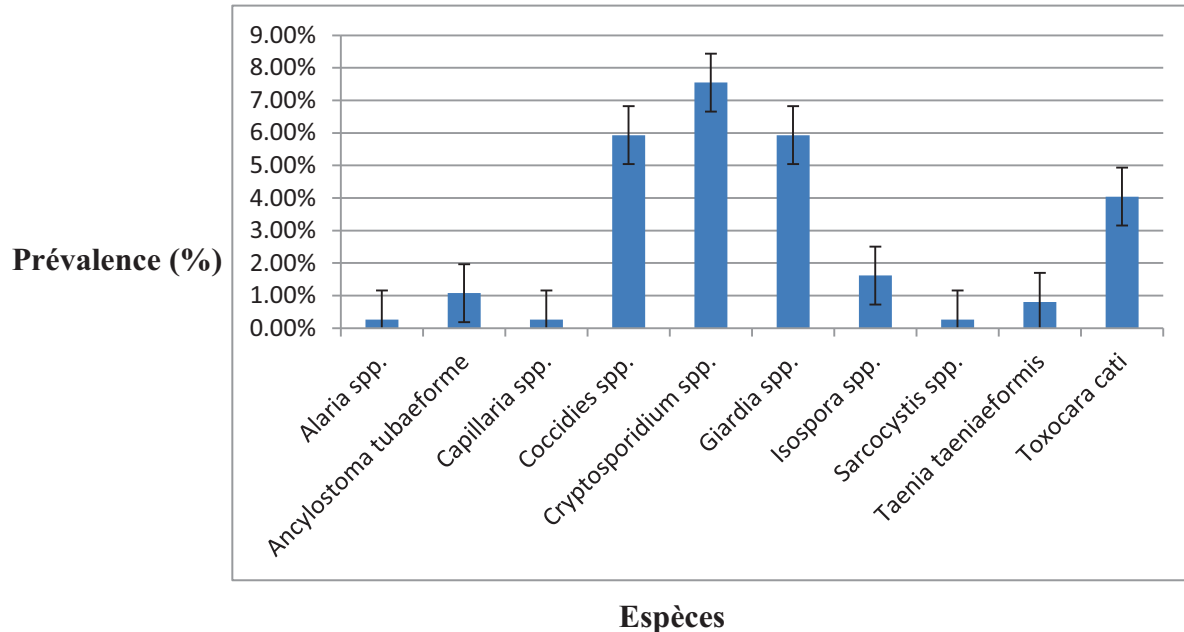


Figure 9 : Prévalence (en pourcentage) des autres entéroparasites chez les chats (n = 371) testés par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal durant l'année 2008.

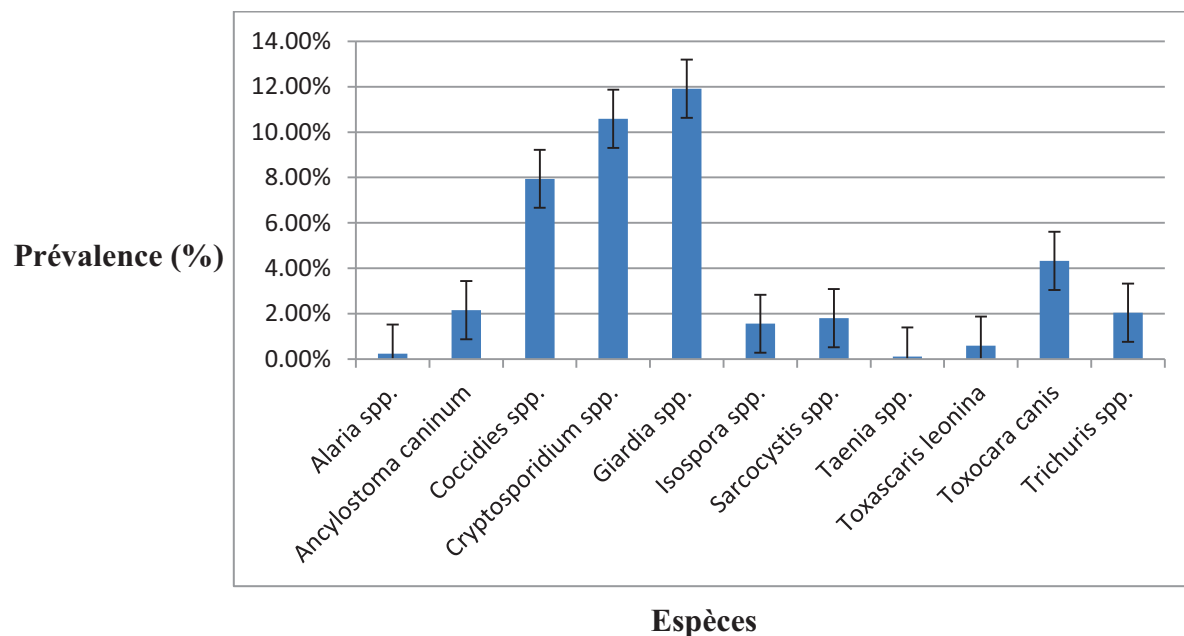


Figure 10 : Prévalence (en pourcentage) des autres entéroparasites chez les chiens (n = 831) testés par le laboratoire de parasitologie de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal durant l'année 2008.

3.3 Variables explicatives

Espèce

Il n'y a pas de différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp chez les chats et les chiens ($p = 0,0989$). Les résultats ne permettent pas de démontrer que l'espèce est une variable corrélée à la présence de ce parasite (Tableau VI).

Strate d'âge

Le nombre de chiens infectés varie significativement selon la strate d'âge ($p < 0,0001$). Il y a une plus grande prévalence de chiens de moins d'une année infectés (18,34 % > 3,48 %) par le parasite (Tableau VI). Par contre, bien qu'une tendance semblable au chien soit détectée pour les chats, c'est-à-dire que la proportion d'animaux infectés chez la strate de moins de une année est plus élevée (9,52 % > 3,42 %), la différence n'est pas statistiquement significative (Tableau VI : $p = 0,0551$). La strate d'âge serait donc un facteur expliquant la présence du parasite chez le chien, alors qu'une tendance serait observée chez le chat.

Sexe

Il n'y a pas de différence statistiquement significative quant à la prévalence de *Cryptosporidium* spp. selon le sexe, ni chez les chats ($p = 0,2150$), ni chez les chiens ($p = 0,2640$) (Tableau VI). Le sexe ne serait donc pas une variable associée à la présence du parasite chez les deux espèces.

Saison

Le nombre d'animaux atteints par *Cryptosporidium* spp. ne varie pas de façon statistiquement significative selon la saison, ni chez le chat ni chez le chien, soit $p = 0,5630$ et $p = 0,1770$ respectivement (Tableau VI). La saison ne serait donc pas une variable associée à la présence du parasite chez les deux espèces.

Infection par *Giardia* spp.

Le nombre de chats et de chiens infectés par le parasite *Giardia* spp. (présence de kystes et/ou trophozoïtes) s'élève à (21/371) et (95/831) respectivement. Il y a une prévalence significativement plus grande ($p < 0,0001$) de chiens infectés à la fois par *Giardia* spp. et par *Cryptosporidium* spp., par rapport aux chiens infectés par *Cryptosporidium* spp seulement (Tableau IV). Alors que chez les chats il n'y a pas de différence statistiquement significative ($p = 0,6661$), la prévalence de chats infectés à la fois par *Giardia* spp. et par *Cryptosporidium* spp. et la prévalence des chats infectés que par par *Cryptosporidium* spp. est considérée comme étant semblable (Tableau VI: $p = 0,6661$).

Tableau VI Prévalence des animaux contaminés par *Cryptosporidium* spp. selon les variables étudiées (l'espèce hôte, la strate d'âge, le sexe, la saison et l'infection par *Giardia* spp.).

Facteurs de risque	Chats		Chiens	
	taux d'infection (%)	Valeur de <i>P</i>	taux d'infection (%)	Valeur de <i>P</i>
Espèce hôte	28/371 (7,55%)		88/831 (10,59%)	<i>p</i> = 0,0989
Strate d'âge	<1 an	24/252 (9,52%)	73/398 (18,34%)	<i>p</i> = 0,0001
	>1 an	4/117 (3,42%)	15/431 (3,48%)	
Sexe	Femelle	8/134 (5,97%)	42/366 (11,48%)	<i>p</i> = 0,2604
	Mâle	17/172 (9,88%)	34/378 (8,99%)	
Saison	Automne	9/95 (9,47%)	21/148 (14,19%)	<i>p</i> = 0,1770
	Hiver	2/52 (3,85%)	13/114 (11,40%)	
	Printemps	7/111 (6,30%)	33/399 (8,27%)	
	Été	10/113 (8,85%)	21/170 (12,35%)	
Infection par <i>Giardia</i> spp.	Présence	2/21 (9,52%)	24/95 (25,26%)	<i>p</i> = 0,6661
	Absence	26/350 (7,43%)	64/736 (8,70%)	<i>p</i> = 0,0001

3.4 Durée d'excrétion des ookystes de *Cryptosporidium* spp.

Deux chats infectés par *Cryptosporidium* spp. ont subi plusieurs coproscopies afin de tenter d'identifier la durée de l'excrétion du parasite. Lors de ces tests, les matières fécales d'un chat âgé de plus d'une année (chat A), dont la présence ou l'absence de signes cliniques n'a pas été mentionné dans le dossier, et les matières fécales d'un chat âgé de moins d'un an (chat B), mais ne présentant pas de signes cliniques ont été examinées (Figure 11 A) une fois par semaine afin d'observer la durée et l'intensité de leur excrétion. Aucun test statistique n'a pu être fait, étant donné que le début de l'infection n'était pas connu et que le nombre d'animaux étudiés était trop faible ($n = 2$). Cependant, il est possible de constater que l'intensité peut varier dans le temps (Figure 11 B) et que le parasite peut persister un minimum de sept mois, soit plus que ce qui est rapporté par Yoshiuchi et ses collaborateurs (2010).

3.5 Diagnostic moléculaire

La mise au point des outils moléculaires a échoué et n'a pas permis de caractériser génotypiquement les échantillons de *Cryptosporidium* spp. provenant des chiens et des chats et ainsi identifier les espèces et génotypes en cause.

4 Discussion

4.1 Prévalence

La prévalence de *Cryptosporidium* spp. chez les chats (7,55%) et les chiens (10,59%) du Québec, confirme leur importance en tant que réservoir du parasite. Il est intéressant de constater qu'à partir des estimés d'un sondage Léger Marketing (2008), environ 100 038 chats et 88 956 chiens du Québec, suivi par un médecin vétérinaire et dont les propriétaires auraient demandé une analyse de matière fécales seraient infectés par *Cryptosporidium* spp. Ceci met en perspective que bien que les chats semblent moins souvent infectés, ils représentent un réservoir potentiellement plus important étant donné leur nombre absolu.

Il est fort probable que la prévalence observée chez les chats et les chiens est sous-estimée. Il a été démontré que plusieurs chats domestiques ne présentaient pas de signes cliniques (Abe et al, 2002; Rambozzi et al, 2007; Neira et al, 2010), ce qui ne pousse pas les propriétaires à faire examiner leurs matières fécales. Bien que l'existence du chien contaminé par *Cryptosporidium* spp., mais ne présentant pas de signes clinique n'ait pas été discuté dans la littérature, il est probable qu'il existe aussi des porteurs sains pour cette espèce. Une autre raison pour laquelle la prévalence de ce parasite est probablement sous-estimée est que la sensibilité de la technique de flottation dans le sulfate de zinc est limitée, puisqu'elle permet de détecter une infection uniquement lorsqu'il y a plus de 1 000 ookystes par gramme de matières fécales (Weber et al, 1992; Xiao et Herd, 1993). Ainsi,

l'utilisation d'un test plus sensible comme par exemple l'amplification des fragments des gènes ARNr 18S et HSP 70 à l'aide d'une réaction PCR pourrait modifier le résultat obtenu par coproscopie (Webster et al, 1996). De plus, étant donné que l'intensité d'excrétion n'est pas constante (Figure 11B), et que l'excrétion est intermittente (Fayer et Xiao, 2008), il est possible que cela influence à la baisse l'estimation de la prévalence. Pour ces raisons, de nombreux échantillons de matières fécales devraient être analysés avant d'affirmer que l'animal est exempt de *Cryptosporidium* spp.

Les populations de chiens et de chats pour lesquelles l'examen coprologique a été réalisé dans cette étude ne représentent probablement pas les populations du Québec, étant donné qu'il y a possiblement un biais d'échantillonnage sur des animaux ayant, dans la majorité des cas, des problèmes de santé puisqu'ils sont suivis par des médecins vétérinaires. Les animaux errants et les animaux ne fréquentant aucun établissement vétérinaire n'ont pas été pris en compte.

Le taux d'infection par *Cryptosporidium* spp. chez le chat et le chien au Québec est relativement élevé en comparaison avec la prévalence des chats en Australie (1,2%, Sargent et al, 1998) et celle des chiens en République tchèque (1,4%, Dubnà et al, 2007), mais la prévalence de ce parasite est très variable et peut atteindre 12,3% pour les chats aux États-Unis d'Amérique, en République tchèque, au Japon, en Allemagne et en Écosse (Fayer et Xiao, 2008) et 13,8% chez les chien habitant la Corée (Kim et al, 1998). La proximité des animaux d'élevage avec les humains et l'importance des animaux errants (chats et chiens) sont probablement des facteurs importants.

4.2 Espèce

Bien que l'étude porte sur un nombre restreint de chats et de chiens infectés, des raisons comportementales et écologiques peuvent expliquer la différence de prévalence de

Cryptosporidium spp., entre les deux espèces. Les résultats ne permettent pas d'affirmer que l'espèce est une variable associée à la présence du parasite (Tableau VI). Cependant, il serait intéressant de tester à nouveau cette variable sur un nombre plus importants de chats et de chiens, car selon nous, le chat est moins exposé à *Cryptosporidium* spp. que le chien. En effet, plusieurs propriétaires gardent leurs chats à l'intérieur, alors que la quasi-totalité des chiens doivent aller à l'extérieur pour expulser leurs matières fécales. Ceci les rend plus vulnérables aux parasites en général. Les chiens ont encore plus de comportements à risque, tels que boire dans une flaque d'eau ou entrer en contact avec d'autres canidés, lors des cours de dressage ou encore dans les « parcs à chiens », par exemple. L'environnement des animaux domestiques devrait aussi faire l'objet d'une étude afin de déterminer l'importance de la transmission indirecte et ainsi estimer le risque lié à la présence d'autres animaux domestiques dans leur environnement quotidien.

La coprophagie est un autre comportement à risque décrit chez le chien, tandis que ce comportement est rarement observé chez le chat (Nonaka et al, 2008). Les raisons pour lesquelles un chien développe le comportement de coprophagie sont multiples : le stress, l'ennui (Beerda et al, 1999; Schipper et al, 2008), les problèmes de digestion, la déficience en enzymes pancréatiques (Kwong et Barnes, 1975), l'exploration et le jeu chez le chiot (Richard Beaudet, éthologue, communication personnelle), etc. Le chien aura tendance à manger les fèces d'un autre chien si elles contiennent des aliments qui ne font pas partie de sa diète (Richard Beaudet, éthologue, communication personnelle). D'ailleurs, la coprophagie est un comportement naturel chez le chien à l'état sauvage, car il mange les selles d'herbivores (Richard Beaudet, éthologue, communication personnelle). La présence du comportement de coprophagie ainsi que l'accès à l'extérieur n'ont pas été notés aux dossiers des animaux testés mais sont potentiellement des facteurs de risque à la contamination de l'animal par *Cryptosporidium* spp.

4.3 Strates d'âge

L'âge pourrait jouer un rôle quant à la vulnérabilité des animaux testés face à une infection à *Cryptosporidium* spp. La production endogène des anticorps commence dès l'âge de 5 à 6 semaines, on considère l'animal immunocompétent vers l'âge de trois mois, et adulte à l'âge d'un an (Day, 2007).

Ballweber et collaborateurs (2009) ont identifié que les chats âgés d'un an et moins étaient plus à risque d'être infectés par *Cryptosporidium* spp. Cependant, nos résultats ne vont pas en ce sens. Le faible nombre de chats âgés de plus d'une année (n=4) pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas pu valider cette hypothèse. Il serait important de tester l'âge sur une plus grande population de chats afin de vérifier à nouveau ce facteur de risque potentiel.

Selon nos résultats, les chiens âgés d'une année et moins sont plus à risque d'être contaminés par *Cryptosporidium* spp. que les chiens de plus d'une année. Pourtant, selon une recherche effectuée au Brésil, 40 chiens sur 450 sont infectés par *Cryptosporidium* spp et les chiens âgés de moins d'un an auraient une prévalence plus faible de ce parasite (5,5%), comparé aux chiens âgés de plus d'une année (9,3%) (Lallo et Bondan, 2006). Cependant, Lallo et Bondan (2006) sont incapables d'expliquer pourquoi les animaux âgés d'une année ou moins ont une prévalence plus faible. Selon ces auteurs, il existerait probablement d'autres facteurs que le système immunitaire (immunité acquise moins compétente que les animaux adultes) pour expliquer la prévalence de ce parasite chez les jeunes animaux. Une étude semblable également menée au Brésil et effectuée sur 433 chiens n'a trouvé aucune différence significative entre ces deux strates d'âge (Mundim et al, 2007). Toutefois, le nombre de chiens de cette étude excréant des ookystes de *Cryptosporidium* spp. est peu élevé (n=6). Il serait donc préférable de faire une recherche sur une plus grande population canine afin d'augmenter la puissance des tests statistiques.

Certains facteurs peuvent interférer sur les résultats. Par exemple, les chiens en très bas âge (trois semaines et moins) sont possiblement contaminés, mais non diagnostiqués étant donné qu'ils n'ont pas encore acquis le réflexe de défécation (Beaver, 2009). De plus, le métabolisme est différent selon la taille de l'animal. En effet, les chiens de grande taille deviennent adultes plus rapidement (Speakman et al, 2003). Ainsi, le système immunitaire des chiens de grande taille pourrait être compétent plus tôt et par le fait même, plus efficace pour détecter, puis se débarrasser de ces parasites.

4.4 Sexe

Notre étude est en accord avec la littérature scientifique, le sexe ne serait pas une variable associée avec la présence de *Cryptosporidium* spp. pour ces deux espèces d'animaux domestiques (Lallo et Bondan, 2006; Mundim et al, 2007). Cependant, il serait possible que les femelles ayant eu des rejetons soient plus à risque de se contaminer auprès de leurs petits, puisqu'elles déclenchent la défécation en léchant la zone anale du chaton ou du chiot et en avalent les déjections (Alain Villeneuve, communication personnelle).

4.5 Saison

La saison modifie l'environnement des animaux par un changement de température. Cependant, les tests statistiques indiquent qu'il n'existe pas de différence significative quant à la prévalence du parasite selon les saisons ni chez le chat, ni chez le chien. Ce résultat est plausible pour le chat, compte tenu que plusieurs d'entre eux sont confinés à l'intérieur et ont ainsi moins de chances de se contaminer via l'environnement ou de se réinfecter.

Le gel au sol prévient probablement que les animaux domestiques, principalement le chien, se contaminent en buvant à même une flaque d'eau ou en se baignant dans un lac. Une

étude menée en République tchèque par Dubnà et collaborateurs (2007) a montré une augmentation de la prévalence de *Cryptosporidium* spp. au printemps chez les chiens habitant en milieu rural. Tout comme le Québec, la République tchèque se situe géographiquement dans la zone tempérée et possède quatre saisons. Dubnà et collaborateurs (2007) ont avancé l'hypothèse que durant cette saison, les chiens pourraient chasser davantage et s'infecter en consommant des proies contaminées. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse chez les chiens de campagne laissés en liberté ainsi que chez les chats vivant en milieu rural et fréquentant l'extérieur.

La saison pourrait jouer un rôle sur la prévalence des animaux atteints par le parasite puisque la température a un effet sur la viabilité et le pouvoir infectieux des ookystes (Fayer et al, 1998; Neumayerova et Koudela, 2008). Étant donné qu'une température de -3°C durant trois jours tue ou inactive le pouvoir infectieux des ookystes (Neumayerova et Koudela, 2008), il serait plausible que la prévalence d'animaux contaminés par *Cryptosporidium* spp. diminue durant l'hiver, d'autant plus que la moyenne des températures du mois de février 2008 (année de cueillette des échantillons) a été de -10,4°C (Environnement Canada). Une température de plus de 15°C altère le temps de survie des ookystes (Fayer et Xiao, 2008). Selon l'étude de Fayer et ses collaborateurs (1998), 10% d'ookystes placés dans l'eau à 25°C survivent durant huit semaines, alors qu'à une température de 35°C, 20% des ookystes survivent une seule semaine et aucun ookyste de cette dernière étude n'était vivant après deux semaines.

Cependant, pour bien évaluer si les saisons sont associées avec la présence de *Cryptosporidium* spp. chez le chat et le chien, il serait important de suivre des animaux préalablement sains durant quelques mois, voire quelques années. Car comme la durée de l'infection peut s'étendre sur plusieurs mois (Figure 11A et B) et donc plusieurs saisons, il est important de connaître le moment de l'infection afin de pouvoir démontrer leur importance en tant que variable associée à la prévalence du parasite.

4.6 Infection par *Giardia* spp.

L'importance des infections concomitantes par *Giardia* spp. par rapport à l'importance des infections concomitantes par les autres entéroparasites identifiés lors de cette étude, suggère qu'il pourrait exister un facteur de risque commun à *Cryptosporidium* spp. et à *Giardia* spp. Le mécanisme d'infection par *Giardia* spp. est le même que celui de *Cryptosporidium* spp., soit par contact direct ou indirect via l'environnement (i.e. ingestion d'eau ou de nourriture contaminée, contact avec un homme ou avec un animal infecté (Fayer et al, 2000; Pedraza-diaz et al, 2001; Siwila et al, sous presse). De plus, il n'y a pas de compétition entre les deux espèces, car elles n'occupent pas tout à fait le même site anatomique de l'hôte. En effet, *Giardia* spp. est libre ou fixé à l'aide de sa ventouse à la muqueuse du lumen du petit intestin et il ne pénètre jamais les tissus (Aronson et al, 2001), alors que *Cryptosporidium* spp. est un parasite qui se loge dans un compartiment extracytoplasmique, mais intracellulaire des cellules épithéliales des intestins (O'Donoghue, 1995), tant chez les chats que chez les chiens.

Tout comme *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp peut occasionner la diarrhée. Ainsi, lors d'infections concomitantes, fréquentes chez les animaux, l'apparition de signes cliniques devient plus probable, mais il devient impossible de savoir à quel parasite ils sont reliés. Plusieurs facteurs affectent le pouvoir pathogène et le succès de transmission des agents infectieux. Par exemple, la compétition interspécifique peut limiter le nombre d'agents pathogènes ou changer l'emplacement du site anatomique de l'infection (Poulin, 2006). De plus, le dommage pathologique causé par un parasite pourrait augmenter la susceptibilité de l'hôte à être infecté par une autre espèce de parasite. Bien que ces interactions soient de plus en plus étudiées, il existe encore peu d'information à ce sujet. Ainsi, les professionnels de la santé traitent chaque agent infectieux comme une entité séparée, alors que l'interaction entre agents pathogènes contribue à la « maladie globale » (Petney et al, 1998).

4.7 Mise au point de la PCR

Il a été impossible d'effectuer le diagnostic moléculaire des espèces et génotypes de *Cryptosporidium* spp. isolés à partir d'échantillons de matières fécales par la méthode de centrifugation dans le sulfate de zinc. Quelques hypothèses peuvent être avancées quant aux causes possibles ayant mené à l'échec de l'amplification des fragments de gènes cibles.

La trousse d'extraction d'ADN utilisée a été choisie en fonction de sa sensibilité à extraire l'ADN total de ce protozoaire. Dans le même laboratoire, des résultats positifs avaient été obtenus avec des ookystes de *Cryptosporidium* spp. isolés à partir d'échantillons en provenance de l'environnement. Il est possible que cette méthode d'extraction ne soit pas appropriée pour extraire l'ADN provenant d'échantillons fécaux. Cette hypothèse est peu probable puisque la trousse commerciale « *KIT PowerSoilTM DNA Isolation Kit* » (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) a été utilisée avec succès pour isoler de l'ADN à partir d'ookystes de *Cryptosporidium* spp. retrouvés dans des échantillons fécaux (Nolan et al, 2009; Ng et al, 2011). Les échantillons de matières fécales sont les plus difficiles à utiliser pour faire un PCR, car la présence de nombreux produits de dégradation des aliments peuvent interférer avec la réaction PCR, en plus de nombreuses substances inhibitrices de la Taq polymérase (polysaccharide, bile, hème s'il y avait du sang dans les fèces). Il est difficile de trouver une solution efficace pour retirer ces produits de dégradation des matières fécales, car la concentration des substances inhibitrices varie d'un échantillon à l'autre (Monteiro et al, 1997; Jaulhac et al, 1998). Parmi les alternatives ayant pu être évaluées durant la période d'optimisation de la PCR, il y a l'utilisation de plus petits volumes de solution d'extraction d'ADN (i.e. 2 µl, 1 µl, 0,5 µl), de manière à réduire la concentration des inhibiteurs de la Taq polymérase potentiellement présents dans les fèces et conséquemment, dans l'extraction d'ADN.

Une autre hypothèse quant à l'échec de l'amplification des fragments de gènes cibles est que la quantité d'ADN recueillie ait été insuffisante. Plusieurs facteurs peuvent influencer

la quantité d'ADN totale isolée à l'aide de la trousse d'extraction. D'une part, il est possible, mais peu probable que la quantité d'ookystes recueillis par la méthode de flottation dans le sulfate de zinc soit insuffisante. Selon Smith et ses collaborateurs (2009), la méthode d'amplification par PCR de la sous-unité ribosomiale du gène ARNr 18S n'est pas assez sensible pour les espèces autres que *C. parvum* ou *C. hominis*, car il y aurait moins de copies du gène cible que les autres espèces. Bien qu'il soit possible que *C. parvum* et *C. hominis* aient moins de copies du gène ARNr 18S, cette limitation n'a pas empêché plusieurs auteurs de réaliser la réaction de PCR ainsi que le séquençage des produits de PCR (Tableau III). D'autre part, l'absence d'ADN appartenant à *Cryptosporidium* spp. pourrait s'expliquer par une dégradation des ookystes qui serait due à une durée de conservation trop longue (la durée de conservation des ookystes a varié de quelques heures à trois semaines). Cette dernière hypothèse est encore peu probable puisque les ookystes de *Cryptosporidium* spp. sont très résistants et s'adaptent facilement à différents environnements (Barta et Thompson, 2006).

4.8 Conclusions

En 2008, la prévalence des parasites du genre *Cryptosporidium* des animaux testés s'élève à 7,55% chez les chats et à 10,59% chez les chiens. Bien que la prévalence de *Cryptosporidium* spp. semble plus faible chez les chats, ceux-ci sont un réservoir de l'entéroparasite potentiellement plus important que les chiens étant donné leur nombre plus élevé au Québec. Selon la strate d'âge, les chiens âgés de moins d'une année seraient plus à risque d'être contaminés par *Cryptosporidium* spp. Cependant, les résultats ne permettent pas d'associer l'âge avec la présence du parasite chez les chats. D'autre part, nos analyses montrent que les infections concomitantes par *Giardia* spp. seraient un facteur de risque pour le chien et non pour le chat. L'espèce (chat et chien), le sexe et la saison ne sont pas des variables expliquant la présence de *Cryptosporidium* spp. chez aucune des deux espèces étudiées.

Malgré que le résultat du test ne soit pas statistiquement significatif, le chien semble plus propice à s'infecter avec *Cryptosporidium* spp. que le chat. En effet, la prévalence de *Cryptosporidium* spp. est plus élevée chez le chien que chez le chat, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que la quasi-totalité des chiens doivent faire leurs besoins à l'extérieur et peuvent ainsi s'exposer aux parasites présents dans l'environnement. De plus, cela pourrait contribuer à contaminer l'environnement commun à l'homme et aux animaux domestiques.

5 Investigations futures

Les futures investigations devraient comporter deux volets, expérimental et épidémiologique afin de mieux comprendre le rôle que jouent les animaux domestiques dans la transmission des espèces/génotypes du genre *Cryptosporidium* chez l'homme. Pour ce faire les investigations futures devraient intégrer l'étude de la diversité génétique inter et intra spécifique par l'utilisation de marqueurs moléculaires appropriés.

Le diagnostic moléculaire fait à l'aide de l'amplification de fragments de gènes cibles (e.g. ARNr 18S et HSP 70) permettrait d'obtenir un aperçu global de la prévalence des espèces/génotypes de *Cryptosporidium* spp. à l'échelle du Québec. Il serait ainsi possible d'identifier les facteurs de risque et ou variables pouvant expliquer la cryptosporidiose chez les animaux domestiques selon les espèces/génotypes. La dynamique d'infection du parasite pourrait être investigué à l'aide de marqueurs moléculaires beaucoup plus variables (e.g. microsatellites et minisatellites : Feng et al, 2011). Ainsi l'étude de la diversité intra spécifique (e.g. génétique des populations) permettrait de détecter la présence de groupements génétiques dans la population d'une certaine espèce de *Cryptosporidium*. Le volet expérimental permettrait de mieux comprendre le cycle de vie et les mécanismes d'infection du parasite, ainsi que la durée de l'infection selon les espèces/génotypes et l'hôte.

Les études futures portant sur ce parasite devraient être réalisées sur un groupe de chiens et de chats beaucoup plus important (~10 000 individus de chaque espèce) afin de travailler sur une population infectée d'environ 1 000 individus (~10%).

L'environnement des chats et des chiens pourrait expliquer la présence du parasite. Ainsi, l'environnement pourrait être caractérisé par les classes suivantes : maison, environnement urbain, environnement rural. De plus, le pourcentage de temps passé à l'extérieur selon les saisons devrait être pris en compte. Le comportement alimentaire de chaque individu devrait également être décrit à l'aide d'un questionnaire distribué aux propriétaires des animaux testés afin d'identifier des facteurs de risque pouvant expliquer la présence ou l'absence de *Cryptosporidium* spp. tels que les comportements de coprophagie et de chasse. Un effort devrait finalement être consenti à mieux caractériser les signes cliniques associés à la présence de *Cryptosporidium* spp., afin de permettre aux vétérinaires de les reconnaître et pousser l'investigation plus loin pour identifier cet agent pathogène potentiellement dangereux pour l'homme.

Pour mieux comprendre la biologie du parasite, il serait pertinent de suivre le cycle d'excrétion des ookystes du parasite chez les chiens et les chats contaminés, à condition de connaître le moment exact de l'infection. Il faudrait donc que l'infection par *Cryptosporidium* spp. se fasse en milieu contrôlé, avec un nombre fixe de chats et de chiens. Une portion de l'échantillon de matières fécales serait utilisée afin de déterminer la durée d'excrétion et la variation d'excrétion d'ookystes du parasite à l'aide d'un microscope optique, alors qu'une autre portion du même échantillon servirait au diagnostic moléculaire.

Le diagnostic moléculaire permettrait d'identifier les espèces de *Cryptosporidium* parasitant les animaux domestiques, chats et chiens, du Québec. Il pourrait être pertinent de suggérer des tests de dépistage chez les personnes possédant des animaux domestiques

infectés afin de vérifier si elles aussi sont infectées par ce même parasite. La relation entre le génotype et les espèces du parasite, leur hôte et la géographie devrait être étudiée. Il serait ainsi possible d'établir la distribution géographique des espèces et de comprendre la dynamique d'infection des agents pathogènes.

Références

- Abe, N., Sawano, Y., Yamada, K., Kimata, I., Iseki, M., 2002, *Cryptosporidium infection in dogs in Osaka, Japan*. *Veterinary Parasitology* 108, 185-193.
- Abrahamsen, M. S., Templeton, T. J., Enomoto, S., Abrahante, J. E., Zhu, G., Lancto, C. A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G. A., Xu, P., Bankier, A. T., Dear, P. H., Konfortov, B. A., Spriggs, H. F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V., 2004, *Complete genome sequence of the apicomplexan, Cryptosporidium parvum*. *Science* 304, 441-445.
- Adl, S. L., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Andersen, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. F. J. R., 2005, *The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists*. *Journal of Eucaryotic Microbiology* 52, 5: 399-451.
- Agence de santé publique du Canada, 2003, *Maladies à déclaration obligatoire nationale*. http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/list_f.html.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990, *Basic local alignment search tool*. *Journal of Molecular Biology* 5; 215, 3:403-10.
- Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla, A., 2002, *Cryptosporidium molnari n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, Sparus aurata L. and Dicentrarchus labrax L.* Volume 32. Elsevier, Kidlington, Royaume-Uni.
- Amin, O., 2002, *Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66, 799-803.
- Aronson, N. E., Cheney, C., Rholl, V., Burris, D., Hadro, N., 2001, *Biliary giardiasis in a patient with human immunodeficiency virus*. *Journal of Gastroenterology* 33, 2: 167-170.
- Asahi, H., Koyama, T., Arai, H., Funakoshi, Z. Y., Yamaura, H., Shirasaka, R., Okutomi, K., 1990, *Biological nature of Cryptosporidium spp. isolated from a cat*. *Parasitology Research* 77, 237-240.
- Aydin, Y., Guvenc. T., Beyaz, L. and Sancak, A. A. 2004. *Intestinal cryptosporidiosis associated with distemper in a dog*. *Veterinary Journal of Ankara University* 51, 233-235.
- Baillargeon, J., 2004, *Étude sur la contamination du colostrum bovin par des ookystes de Cryptosporidium parvum*. Mémoire de maîtrise. Université de Montréal.

- Ballweber, L. R., Panuska, C., Huston, C. L., Vasilopoulos, R., Pharr, G. T., Mackin, A., 2009, *Prevalence of and risk factors associated with shedding of Cryptosporidium felis in domestic cats of Mississippi and Alabama*. *Veterinary Parasitology* 160, 306-310.
- Barta, J. R., Thompson, R. C. A., 2006, *What is Cryptosporidium? Reappraising its biology and phylogenetic affinities*. *Trends in Parasitology* 22, 463-468.
- Beaver, B.V., 2009, *Canine eliminative behavior*, In: *Canine Behavior* (2nd ed). W. B. Saunders, Saint Louis, 244-258.
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., Van Hooff, J. A. R. A. M., De Vries, H. W., Mol, J. A., 1999, *Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses*. *Physiology and Behavior* 66, 233-242.
- Bowman, D. D., Lucio-Forster, A., 2010, *Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: veterinary and public health importance*. *Experimental Parasitology* 124, 121-127.
- Brown, D. W. G., Chalmers, R. M., Chiodini, P. L., Cowden, J. M., Crowcroft, N. S., O'Brien, S. J., Painter, M. J., Salmon, R. L., Smith, H. R., Tompkins, D. S., Trevena, W. B., 2004, *Preventing person-to-person spread following gastrointestinal infections: guidelines for public health physicians and environmental health officers*. *Communicable Disease and Public Health* 7, 4: 362-384.
- Bukhari, Z., Smith, H. V., 1995, *Effect of three concentration techniques on viability of Cryptosporidium parvum oocysts recovered from bovine feces*. *Journal of Microbiology* 33, 10: 2592-2595.
- Cama, V. A., Ross, J., Â. M., Crawford, S., Kawai, V., Chavezâ Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Ã'avincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, RobertÂ, H., Bern, C., Xiao, L., 2007, *Differences in clinical manifestations among Cryptosporidium species and subtypes in HIV infected persons*. *Journal of Infectious Diseases* 196, 5: 684-691.
- Campbell, I., Tzipori, A., Hutchison, G., Angus, K., 1982, *Effect of disinfectants on survival of Cryptosporidium oocysts*. *The Veterinary Record* 111, 18: 414-415.
- Castro-Hermida, J. A., García-Preledo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia Da Costa, J. M., Mezo, M., 2008, *Presence of Cryptosporidium spp. and Giardia duodenalis through drinking water*. *Science of the Total Environment* 405, 45-53.
- Causapé, A. C., Quílez, J., Sánchez-Acedo, C., del Cacho, E., 1996, *Prevalence of intestinal parasites, including Cryptosporidium parvum, in dogs in Zaragoza city, Spain*. *Veterinary Parasitology* 67, 161-167.
- Chalmers, R. M., Davies, A. P., 2010, *Minireview: Clinical cryptosporidiosis*. *Experimental*

Parasitology 124, 138–146.

- Chen, F., Huang, K., Qin, S., Zhao, Y., Pan, C., 2007, *Comparison of viability and infectivity of Cryptosporidium parvum oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water*. Veterinary Parasitology 150, 13-17.
- Cook, A. K., 2008, *Feline infectious diarrhea*. Topics in Companion Animal Medicine 23, 169-176.
- Crabb, J. H., 1998, *Antibody-based immunotherapy of cryptosporidiosis*. Advances in Parasitology 40, 121-149.
- Current, W. L., Reese, N. C., Ernst, J. V., Bailey, W. S., Heyman, M. B., Weinstein, W. M., 1983, *Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons: studies of an outbreak and experimental transmission*. The New England Journal of Medicine 308, 1252-1257.
- Current, W. L., Upton, S. J., Haynes, T. B., 1986, *The life cycle of Cryptosporidium baileyi n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens*. Journal of Eukaryotic Microbiology 33, 289-296.
- Davis, J. J., Heyman, M. B., Ferrell, L., Kerner, J., Kerlan, R., Thaler, M. M., 1987, *Sclerosing cholangitis associated with chronic cryptosporidiosis in a child with congenital immunodeficiency disorder*. American Journal of Gastroenterology 82, 1196–1202.
- Dawson, B., Trapp, R., 2004, *Basic and clinical biostatistics*. 4th Edition, New York: McGrawHill.
- Day, M. J., 2007, *Immune system development in the dog and cat*. Journal of Comparative Pathology 137, S10-S15.
- Deng, M., Rutherford, M. S., Abrahamsen, M. S., 2004, *Host intestinal epithelial response to Cryptosporidium parvum*. Advanced Drug Delivery Reviews 56, 869-884.
- Denholm, K., Haitjema, H., Gwynne, B., Morgan, U., Irwin, P., 2001, *Concurrent Cryptosporidium and parvovirus infections in a puppy*. Australian Veterinary Journal 79, 98-101.
- Doyle, P. S., Crabb, J., Peterson, C., 1993, *Anti-Cryptosporidium parvum Antibodies inhibit infectivity in vitro and in vivo*. Infection and immunity 61, 10. 4079-4084.
- Dubnà, S., Langrová, I., Nápravník, J., Jankovská, I., Vadlejš, J., Pekár, S., Fechtner, J., 2007, *The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of*

the Czech Republic. Veterinary Parasitology 145, 120-128.

- Dybdahl, M. F., Storfer, A., 2003, *Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King*. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 523-530.
- Elliott, D. A., Clark, D. P., 2000, *Cryptosporidium parvum induces host cell actin accumulation at the host-parasite interface*. *Infection and Immunity* 68, 4: 2315-2322.
- Elliott, D. A., Coleman, D. J., Lane, M. A., May, R. C., Machesky, L. M., Clark, D. P., 2001, *Cryptosporidium parvum infection requires host cell actin polymerization*. *Infection and Immunity* 69, 9: 5940-5942.
- Ellis, A. E., Brown, C. A., Miller, D. L., 2010, *Diagnostic exercise: Chronic vomiting in a dog*. *Veterinary Pathology* 47, 5: 991-994.
- EPA, United States Environmental Protection Agency, 1999, *Guidance for people with severely weakened immune systems*. www.epa.gov/safewater.
- Fayer, R., 2010, *Taxonomy and species delimitation in Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology* 124, 90-97.
- Fayer, R., Graczyk, K., T., Lewis, J., E., Trout, M., J., Farley, A., C., 1998, *Survival of infectious Cryptosporidium parvum oocysts in seawater and eastern oysters (Crassostrea virginica) in the Chesapeake Bay*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3: 1070-1074.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S. J., 2000, *Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification*. *International Journal for Parasitology* 30, 1305-1322.
- Fayer, R., Trout, J. M., Xiao, L., Morgan, U. M., Lal, A. A., Dubey, J. P., 2001, *Cryptosporidium canis n. sp. from domestic dogs*. *The Journal of Parasitology* 87, 1415-1422.
- Fayer, R., Xiao, L., 2008, *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press.
- Feng, Y., Yang, W., Zhang, L., Kvac, B., Koudela, B., Modry, D., Li, N., Fayer, R., Xiao, L., 2011, *Development of a Multilocus Sequence Tool for Typing Cryptosporidium muris and Cryptosporidium andersoni*. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 1. 34-41.
- Fitzgerald, L., Bennett, M., Ng, J., Nicholls, P., James, F., Elliot, A., Slaven, M., Ryan, U., 2011, *Morphological and molecular characterisation of a mixed Cryptosporidium muris/Cryptosporidium felis infection in a cat*. *Veterinary Parasitology* 175, 160-164.
- Gatei, W., Wamae, C. N., Mbae, C., Waruru, A., Mulinge, E., Waithera, T., Gatika, S. M., Kamwathi, S. K., Revathi, G., Hart, C. A., 2006, *Cryptosporidiosis : prevalence,*

genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 75, 1 : 78-82.

- Giangaspero, A., Iorio, R., Paoletti, B., Traversa, D., Capelli, G., 2006, *Molecular evidence for Cryptosporidium infection in dogs in Central Italy.* Parasitology Research 99, 297-299.
- Gould, S. B., Tham, W. H., Cowman, A. F., McFadden, G. I., Waller, R. F., 2008, *Alveolins, a new family of cortical proteins that define the Protist infrakingdom Alveolata.* Molecular Biology and Evolution 25, 6: 1219-1230.
- Greenberg, P. D., Cello, J. P., 1996, *Treatment of severe diarrhea caused by Cryptosporidium parvum with oral bovine immunoglobulin concentrate in patients with AIDS.* Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 13, 4: 348-54.
- Greene, C. E., Jacobs, G. J., Prickett, D., 1990, *Intestinal malabsorption and cryptosporidiosis in an adult dog.* Journal of the American Veterinary Medical Association 197, 3: 365-367.
- Hamer, D. H., Ward, H., Tzipori, S., Pereira, M. E., Alroy, J. P., Keusch, G. T., 1994, *Attachment of Cryptosporidium parvum sporozoites to MDCK cells in vitro.* Infection and Immunity 62, 6: 2208-2213.
- Heussler, V. T., Küenzi, P., Rottenberg, S., 2001, *Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites.* International Journal for Parasitology 31, 1166-1176.
- Hijjawi, N. S., Meloni, B. P., Ng'anzo, M., Ryan, U. M., Olson, M. E., Cox, P. T., Monis, P. T., Thompson, R. C. A., 2004, *Complete development of Cryptosporidium parvum in host cell-free culture.* International Journal for Parasitology 34, 769-777.
- Hörman, A., Korpela, H., Sutinen, J., Wedel, H., Hänninen, M.-L., 2004, *Meta-analysis in assessment of the prevalence and annual incidence of Giardia spp. and Cryptosporidium spp. infections in humans in the Nordic countries.* International Journal for Parasitology 34, 1337-1346.
- Huber, F., Da Silva, S., Bomfim, T. C. B., Teixeira, K. R. S., Bello, A. R., 2007, *Genotypic characterization and phylogenetic analysis of Cryptosporidium sp from domestic animals in Brazil.* Veterinary Parasitology 150, 65-74.
- Hunter, P. R., Nichols, G., 2002, *Epidemiology and clinical features of Cryptosporidium infection in immunocompromised patients.* Clinical Microbiology Reviews 15, 1: 145-154.
- Irshad, S. M., Morgan, U. M., Andrew Thompson, R. C., Lal, A. A., Xiao, L., 2000, *Phylogenetic relationships of Cryptosporidium parasites based on the 70-kilodalton Heat Shock Protein (HSP70) Gene.* Applied and Environmental Microbiology 66, 6: 2385-2391.

- Iseki, M., 1979, *Cryptosporidium felis (Protozoa : Eimeriorina) from the domestic cat*. Japanese Journal of Parasitology 35, 285-307.
- Jaulhac, B., Reyrolle, M., Sodahlon, Y. K., Jarraud, S., Kubina, M., Monteil, H., Piemont, Y., Etienne, J., 1998, *Comparison of sample preparation methods for detection of Legionella pneumophila in culture-positive bronchoalveolar lavage fluids by PCR*. Journal of Clinical Microbiology 36, 2120-2122.
- Jenkins, M., Trout, J., Higgins, J., Dorsch, M., Veal, D., Fayer, R., 2002, *Comparison of tests for viable and infectious Cryptosporidium parvum oocysts*. Parasitology Research 89, 1-5.
- Jex, A. R., Smith, H. V., Monis, P. T., Campbell, B. E., Gasser, R. B., 2008, *Cryptosporidium biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation*. Biotechnology Advances 26, 304-317.
- Jirku, M., Valigurova, A., Koudela, B., Krizek, J., Modry, D., Slapeta, J., 2008, *New species of Cryptosporidium Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny*. Folia Parasitology (Praha) 55, 81-94.
- Jobb, G. von Haeseler, A. Strimmer, K., 2004, *Treefinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics*. BMC Evolutionary Biology, 4,18.
- Joe, A., Verdon, R., Tzipori, S., Keusch, G. T., Ward, H. D., 1998, *Attachment of Cryptosporidium parvum sporozoites to human intestinal epithelial cells*. Infection and Immunity 66, 7: 3429-3432.
- Kaushik, K., Khurana, S., Wanchu, A., Malla, N., 2008, *Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients*. Acta Tropica 107, 1-7.
- Kim, J. T., Wee, S. H., Lee, C. G., 1998, *Detection of Cryptosporidium oocysts in canine fecal samples by immunofluorescence assay*. Korean Journal of Parasitology 36, 147-149.
- Koudela, B., Modry, D., 1998, *New species of Cryptosporidium (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from lizards*. Folia Parasitologica 45, 2: 93-100.
- Kuczynska, E., Shelton, D. R., 1999, *Method for detection and enumeration of Cryptosporidium parvum oocysts in feces, manures, and soils*. Applied and Environmental Microbiology 65, 7: 2820-2826.
- Kwong, E., Barnes, R. H., 1975, *Role of coprophagy in masking dietary deficiencies of cystine in the rat*. Journal of Nutrition 105, 1457-1465.

- Lallo, M. A., Bondan, E. F., 2006, *Prevalência de Cryptosporidium sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo*. Revista de Saude Publica 40, 1: 120-125.
- Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L., Kagnoff, M.F., 1999, *Pathogenesis of Cryptosporidium parvum infection*. Microbes and Infection, 2, 141–148.
- Léger Marketing, pour le compte de L'AMVQ (Association de médecine vétérinaire du Québec), 2008, <http://ftp.amvq.qc.ca/Chroniques/Sondage-Leger-Marketing-02-08.pdf>.
- Levine, N.D., 1980, *Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature*. The Journal of Parasitology 66, 830-834.
- Lindsay, D. S., Upton, S. J., Owens, D. S., Morgan, U. M., Mead, J. R., Blagburn, B. L., 2000, *Cryptosporidium andersoni*. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos taurus*. Journal of Eukaryotic Microbiology 47, 91-95.
- Lorenzo, M. J., Casal, J. A., Freire, F., Castro, J. A., Vergara, C. A., Ares-Mazás, M. E., 1998, *Determination of immuno-cross-reactivity between Cryptosporidium parvum and Eimeria spp.* Veterinary Parasitology 76, 1-8.
- Lucio-Forster, A., Griffiths, J. K., Cama, V. A., Xiao, L., Bowman, D. D., 2010, *Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats*. Trends in Parasitology 26, 4: 174-179.
- Lupo, P. J., Langer-Curry, R. C., Robinson, M., Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., 2008, *Cryptosporidium muris in a Texas canine population*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 78, 6: 917-921.
- Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B., Davis, J. P., 1994, *A massive outbreak in Milwaukee of Cryptosporidium infection transmitted through the public water supply*. The New England Journal of Medicine 331, 161-167.
- Madore, M. S., Rose, J. B., Gerba, C. P., Arrowood, M. J., Sterling, C. R., 1987, *Occurrence of Cryptosporidium oocysts in Sewage effluents and selected surface waters*. The Journal of Parasitology 73, 702-705.
- McGlade, T. R., Robertson, I. D., Elliot, A. D., Read, C., Thompson, R. C. A., 2003, *Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia*. Veterinary Parasitology 117, 251-262.
- Mead, J. R., Humphreys, R. C., Sammons, D. W., Sterling, C. R., 1990, *Identification of isolate-specific sporozoite proteins of Cryptosporidium parvum by two-dimensional gel electrophoresis*. Infection and Immunity 58, 7: 2071-2075.

- Miller, D. L., Liggett, A., Radi, Z. A., Branch, L. O., 2003, *Gastrointestinal cryptosporidiosis in a puppy*. *Veterinary Parasitology* 115, 199-204.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K. G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., Megraud, F., 1997, *Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model*. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 4: 995-998.
- Morgan, U. M., Sargent, K. D., Elliot, A., Thompson, R. C. A., 1998, *Cryptosporidium in cats- Additional evidence for C. felis*. *The Veterinary Journal* 156, 159-161.
- Morgan, U. M., Xiao, L., Monis, P., Fall, A., Irwin, P. J., Fayer, R., Denholm, K. M., Limor, J., Lal, A., Thompson, R. C. A., 2000, *Cryptosporidium spp. in domestic dogs: The 'dog' genotype*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2220-2223.
- Morgan-Ryan, U. M., Fall, A., Ward, L. A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R. C. A., Olson, M., Lal, A., Xiao, L., 2002, *Cryptosporidium hominis n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49, 433-440.
- Morrison, D. A., 2009, *Evolution of the Apicomplexa : where are we now?* *Trends in Parasitology* 25, 8: 375-382.
- Mundim, M. J. S., Rosa, L. A. G., Hortêncio, S. M., Faria, E. S. M., Rodrigues, R. M., Cury, M. C., 2007, *Prevalence of Giardia duodenalis and Cryptosporidium spp. in dogs from different living conditions in Uberlândia, Brazil*. *Veterinary Parasitology* 144, 356-359.
- Nakamura, A. A., Simoes, C. D., Antunes, G. R., Da Silva, C. D., Meireles, V. M., 2009, *Molecular characterization of Cryptosporidium spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil*. *Veterinary Parasitology*, 166, 47-51.
- Neira, P., Munoz, N., Rosales, J., 2010, *Cryptosporidium parvum infection in a pregnant immunocompetent woman*. *Revista Chilena de Infectologia* 4, 345-9.
- Neumayerova, H., Koudela, B., 2008, *Effects of low and high temperatures on infectivity of Cryptosporidium muris oocysts suspended in water*. *Veterinary Parasitology* 153, 197-202.
- Ng, J, Yang, R., Whiffin, V., Cox, P., Ryan, U., *Identification of zoonotic Cryptosporidium and Giardia genotypes infecting animals in Sydney's water catchments*. *Experimental Parasitology* (sous presse).
- Nime, F. A., burek J. D., Page D., Holsher M. A., Yardley J. H., 1976, *Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70, 4: 592-598.

- Nolan, M. J., Jex, A. R., Mansell, P. D., Browning, G. F., Gasser, R. B., 2009, *Genetic characterization of Cryptosporidium parvum from calves by mutation scanning and targeted sequencing zoonotic implications*. Electrophoresis 30, 2640–2647.
- Nonaka, N., Hirokawa, H., Inoue, T., Nakao, R., Ganzorig, S., Kobayashi, F., Inagaki, M., Egoshi, K., Kamiya, M., Oku, Y., 2008, *The first instance of a cat excreting Echinococcus multilocularis eggs in Japan*. Parasitology International 57, 519-520.
- O'Donoghue, P.J., 1995, *Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals*. International Journal for Parasitology 25, 139-195.
- Ojcius, D. M., Perfettini, J.-L., Bonnin, A., Laurent, F., 1999, *Caspase-dependent apoptosis during infection with Cryptosporidium parvum*. Microbes and Infection 1, 1163-1168.
- Okhuysen, P. C., Chappell, C. L., Crabb, J. H., Sterling, C. R., Dupont, H. L., 1999, *Virulence of three distinct Cryptosporidium parvum isolates for healthy adults*. Journal of Infectious Diseases 180, 4: 1275-1281.
- Overgaauw, P. A. M., van Zutphen, L., Hoek, D., Yaya, F. O., Roelfsema, J., Pinelli, E., van Knipen, F., Kortbeek, L. M., 2009, *Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands*. Veterinary Parasitology 163, 115-122.
- Palmer, C. S., Traub, R. J., Robertson, I. D., Devlin, G., Rees, R., Thompson, R. C. A., 2008, *Determining the zoonotic significance of Giardia and Cryptosporidium in Australian dogs and cats*. Veterinary Parasitology 154, 142-147.
- Pavlasek, I., Ryan, U., 2007, *The first finding of a natural infection of Cryptosporidium muris in a cat*. Veterinary Parasitology 144, 349-352.
- Pedraza-Diaz, S., Amar, C., Iversen, A. M., Stanley, P. J., McLauchlin, J., 2001, *Unusual Cryptosporidium species recovered from human faeces: first description of Cryptosporidium felis and Cryptosporidium 'dog type' from patients in England*. Journal of Medical Microbiology 50, 3: 293-296.
- Peeters, J. E., Mazas, E. A., Masschelein, W. J., Villacorta Martiez de Maturana, I., Debacker, E., 1989, *Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of Cryptosporidium parvum oocysts*. Applied and Environmental Microbiology 55, 6: 1519-1522.
- Petney, T. N., Andrews, R. H., 1998, *Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance*. International Journal for Parasitology 28, 377-393.
- Pieniazek, N. J., Bornay-Lliares, F. J., Slemenda, S. B., Da Silva, A. J., Moura, I. N. S., Arrowood, M. J., Ditrich, O., Adiss, D. G., 1999, *New Cryptosporidium genotypes in*

HIV-infected persons. Emerging Infectious Diseases 5, 3: 444-449.

- Poonacha, K. B., Pippin, C., 1982, *Intestinal Cryptosporidiosis in a Cat*. Veterinary Pathology 19, 708-710.
- Plutzer, J., Karanis, P., 2009, *Genetic polymorphism in Cryptosporidium species: An update*. Veterinary Parasitology 165, 187-199.
- Posada, D., Crandall, K. A., 1998, *Modeltest: testing the model of DNA substitution*. Bioinformatics 14, 817-818.
- Poulin, R., 2006. *Evolutionary ecology of parasites*. New Jersey (USA) Second Edition, Princeton University Press.
- Power, M. L., Ryan, U. M., 2009, *A new species of Cryptosporidium (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Eastern grey kangaroos (Macropus giganteus)*. Journal of Parasitology 94, 5: 1114-1117.
- Priest, J. W., Kwon, J. P., Moss, D. M., Roberts, J. M., Arrowood, M. J., Dworkin, M. S., Juranek, D. D., Lammie, P. J., 1999, *Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific Cryptosporidium parvum antigens*. Clinical Journal of Microbiology 37, 5: 1385-1392.
- Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., Avendano, C., del Cacho, E., Lopez-Bernad, F., 2005, *Efficacy of two peroxygen-based disinfectants for inactivation of Cryptosporidium parvum oocysts*. Applied and Environmental Microbiology 71, 5: 2479-2483.
- Rambozzi, L., Menzano, A., Mannelli, A., Romano, S., Isaia, M. C., 2007, *Prevalence of cryptosporidian infection in cats in Turin and analysis of risk factors*. Journal of Feline Medicine and Surgery 9, 5: 392-396.
- Rinaldi, L., Maurelli, M. P., Musella, V., Veneziano, V., Carbone, S., Di Sarno, A., Paone, M., Cringoli, G., 2008, *Giardia and Cryptosporidium in canine faecal samples contaminating an urban area*. Research in Veterinary Science 84, 3: 413-415.
- Robertson, L. J., Campbell, A. T., Smith, H. V., 1992, *Survival of Cryptosporidium parvum oocysts under various environmental pressures*. Applied and Environmental Microbiology 58, 11 : 3494-3500.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., 2003, MRBAYES 3: *Bayesian phylogenetic inference under mixed models*. Bioinformatics 19, 1572-1574.
- Rossignol, J.-F., Kabil, S. M., El-Gohary, Y., Younis, A. M., 2006, *Effect of nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by Cryptosporidium species*. Clinical Gastroenterology and Hepatology 4, 3: 320-324.

- Ryan, U. M., Monis, P., Enemark, H. L., Sulaiman, I., Samarasinghe, B., Read, C., Buddle, R., Robertson, I., Zhou, L., Thompson, R. C. A., Xiao, L., 2009, *Cryptosporidium suis* N. SP. (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology* 90, 4: 769-773.
- Ryan, U. M., Power, M., Xiao, L., 2008, *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (*Apicomplexa: Cryptosporidiidae*) from the red kangaroo (*Macropus rufus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55, 1: 22-26.
- Santé Canada, 2010, Liste des médicaments http://www.hc-sc.gc.ca/fniah-spnia/nihb-ssna/provide-fournir/pharma-prod/med-list/list_alpha-fra.php.
- Santín, M., Zarlenga, D. S., 2009, *A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish Cryptosporidium species of veterinary and public health concern in cattle*. *Veterinary Parasitology* 166, 1-2: 32-37.
- Sargent, K. D., Morgan, U. M., Elliot, A., Thompson, R. C. A., 1998, *Morphological and genetic characterisation of Cryptosporidium oocysts from domestic cats*. *Veterinary Parasitology* 77, 221-227.
- Schaefer, D. A., Auerbach-Dixon, B., Rigg, M. W., 2000, *Characterization and formulation of multiple epitope-specific neutralizing monoclonal antibodies for passive immunization against cryptosporidiosis*. *Infection and Immunity* 68, 5: 2608-2616.
- Schipper, L. L., Vinke, C. M., Schilder, M. B. H., Spruijt, B. M., 2008, *The effect of feeding enrichment toys on the behaviour of kennelled dogs (Canis familiaris)*. *Applied Animal Behaviour Science* 114, 1-2: 182-195.
- Simon, D., David, J., Brandt, L. J., 1994, *Enterotoxic effect of stool supernatant of Cryptosporidium infected calves on human jejunum*. *American Journal of Gastroenterology* 89, 2277-2278.
- Slapeta, J., 2009, *Centenary of the genus Cryptosporidium: from morphological to molecular species identification (Chapter 4)*. In: *Giardia and Cryptosporidium: From molecules to disease*, M. G. Ortega-Pierres, S. Caccio, R. Fayer, T. Mank, H. Smith, R. C. A. Thompson (Eds.), CAB International, 31-50.
- Slavin, D., 1955, *Cryptosporidium meleagridis* sp. nov. *Journal of Comparative Pathology* 65, 3: 262-266.
- Smith, R. P., Chalmers, R. M., Elwin, K., Clifton-Hadley, F. A., Mueller-Doblies, D., Watkins, J., Paiba, G. A., Giles, M., 2009, *Investigation of the role of companion animals in the zoonotic transmission of cryptosporidiosis*. *Zoonoses and Public Health* 56, 1: 24-33.

- Speakman, J. R., Acker, A. V., Harper, E. J., 2003, *Age-related changes in the metabolism and body composition of three dog breeds and their relationship to life expectancy*. *Aging Cell* 2, 5: 265-275.
- Siwila, J., Phiri, I. G. K., Enemark, H. L., Nchito, M., Olsen, A., *Seasonal prevalence and incidence of Cryptosporidium spp. and Giardia duodenalis and associated diarrhoea in children attending pre-school in Kafue, Zambia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (sous presse)*.
- Thomaz, A., Meireles, M. V., Soares, R. M., Pena, H. F. J., Gennari, S. M., 2007, *Molecular identification of Cryptosporidium spp. from fecal samples of felines, canines and bovines in the state of São Paulo, Brazil*. *Veterinary Parasitology* 150, 4: 291-296.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., 1997, *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882.
- Tosini, Drumo, R., Elwin, K., Chalmers, R. M., Pozio, E., Cacciò, S. M., 2010, *The CpA135 gene as a marker to identify Cryptosporidium species infecting humans*. *Parasitology International* 59, 4:606-9.
- Tumwine, J. K., Kekitiinwa, A., Bakeera-Kitaka, S., Ndeezi, G., Downing, R., Feng, X., Akiyoshi, D. E., Tzipori, S., 2005, *cryptosporidiosis and microsporidiosis in Ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the immunodeficiency virus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 5: 921-925.
- Tyzzer, E. E., 1907, *A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 5, 12-13.
- Tyzzer, E. E., 1912, *Cryptosporidium parvum (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse*. *Archiv für Protistenkunde* 2, 6: 394- 412.
- Tzipori, S., Campbell, I., 1981, *Prevalence of Cryptosporidium antibodies in 10 animal species*. *Journal of Clinical Microbiology* 14, 4: 455-456.
- Tzipori, S., 1983, *Cryptosporidiosis in animals and humans*. *Microbiological Reviews* 47, 1: 84-96.
- Tzipori, S., Griffiths, J. K., 1998, *Natural history and biology of Cryptosporidium parvum*. *Advances in Parasitology* 40, 5-36.
- Ungar, B. L. P., Ward, D. J., Fayer, R., Quinn, C. A., 1990, *Cessation of Cryptosporidium-associated diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient after treatment with hyperimmune bovine colostrum*. *Gastroenterology* 98, 486-489.

- Vetterling, J. M., Doran, D. J., 1969, *Storage polysaccharide in coccidial sporozoites after excystation and penetration of cells*. Journal of Eukaryotic Microbiology 16, 4: 772-775.
- Vetterling, J. M., Jervis, H. R., Merrill, T. G., Sprinz, H., 1971, *Cryptosporidium wrairi sp. n. from the guinea pig Cavia porcellus, with an emendation of the genus*. Journal of Eukaryotic Microbiology 18, 2: 243-247.
- Villeneuve, A., 2003, *Les zoonoses parasitaires*. Les Presses universitaires de Montréal, Montréal.
- Voet, D., Voet, J. G., 1998, *Biochimie*. De Boeck, Paris.
- Wang, R., Zhang, .X., Zhu, H., Zhang, L., Feng, Y., Jian, F., Ning, F., Qi, N., Zhou, Y., Fu, K., Wang, Y., Sun, Y., Wang, Q., Xiao, L., *Genetic characterizations of Cryptosporidium spp. and Giardia duodenalis in humans in Henan, China*. Experimental Parasitology (sous presse).
- Weber, R., Bryan, R. T., Bishop, H. S., Wahlquist, S. P., Sullivan, J. J., Juranek, D. D., 1992, *Threshold of detection of Cryptosporidium oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods*. Journal of Clinical Biology 27, 7: 1323-1327.
- Webster, K. A., Smith, H. V., Giles, M., Dawson, L., Robertson, L. J., 1996, *Detection of Cryptosporidium parvum oocysts in faeces: Comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction*. Veterinary Parasitology 61, 1-2: 5-13.
- Widjoatmodjo, M. N., Fluit, A. C., Torensma, R., Verdonk, G. P., Verhoef, J., 1992, *The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal sample*. Journal of Clinical Microbiology 30, 12: 3195-3199.
- Xiao, L., 2010, *Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update*. Experimental Parasitology 124, 80-89.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, Robertâ H., Lal, A. A., 2001, *Identification of 5 types of Cryptosporidium parasites in children in Lima, Peru*. Journal of Infectious Diseases 183, 3: 492-497.
- Xiao, L., Herd, R. P., 1993, *Quantitation of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay*. Journal of Clinical Microbiology 31, 11: 2944-2946.
- Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.

- C. A., Fayer, R., Lal, A. A., 1999, *Genetic diversity within Cryptosporidium parvum and Related Cryptosporidium species*. Applied and Environmental Microbiology 65, 8: 3386-3391.
- Xiao, L., Sulaiman, I. M., Ryan, U. M., Zhou, L., Atwill, E. R., Tischler, M. L., Zhang, X., Fayer, R., Lal, A. A., 2002, *Host adaptation and host-parasite co-evolution in Cryptosporidium: implications for taxonomy and public health*. International Journal for Parasitology 32, 14: 1773-1785.
- Yao, L., Yin, J., Zhang, X., Liu, Q., Li, J., Chen, L., Zhao, Y., Gong, P., Liu, C., 2007, *Cryptosporidium spp., identification of a new surface adhesion protein on sporozoite and oocyst by screening of a phage-display cDNA library*. Experimental Parasitology 115, 333–338.
- Yoshiuchi, R., Matsubayashi, M., Kimata, I., Furuya, M., Tani, H., Sasai, K., 2010, *Survey and molecular characterisazation of Cryptosporidium and Giardia spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan*. Veterinary Parasitology 174, 313-316.
- Yoder, J. S., Beach, M. J., 2007, *Cryptosporidiosis surveillance - United-States – 2003-2005*. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5607a1.htm>.
- Yu, Q., Li, J., Zhang, X., Gong, P., Zhang, G., Li, S., Wang, H., 2010, *Induction of immune responses in mice by a DNA vaccine encoding Cryptosporidium parvum Cp12 and Cp21 and its effect against homologous oocyst challenge*. Veterinary Parasitology 172, 1–7.
- Zhu, G., Marchewka, M. J., Keithly, J. S., 2000, *Cryptosporidium parvum appears to lack a plastid genome*. Microbiology 146, 315-321.

Annexe I : Formulaire de soumission du service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal.



SERVICE DE DIAGNOSTIC
 Faculté de médecine vétérinaire

Réception des échantillons (local 1240)
 3200, rue Sicotte
 Saint-Hyacinthe J2S 2M2
 Téléc. : 450 778-8107
 www.medvet.umontreal.ca



FORMULAIRE DE SOUMISSION
 Petits animaux et exotiques

INFORMATIONS ANIMAL / PROPRIÉTAIRE

Nom du propriétaire : _____
 Adresse : _____
 Tél. : _____

Nom de l'animal : _____
 Espèce : _____
 Race : _____
 Âge : _____ Sexe : _____
 No. de dossier : _____

INFORMATIONS FACTURATION

Vétérinaire référant : _____
 Clinique vétérinaire : _____
 Adresse : _____
 Tél. : _____
 Téléc. : _____
 Courriel : _____

No. PO (Client) : _____

INFORMATIONS À REMPLIR POUR CAS INTERNE :
 CHUV MAPAQ Enseignement Nécropse
 RECHERCHE
 Autre : _____

No. fonds de recherche (obligatoire) : _____

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES / TRAITEMENTS

ANAMNÈSE OBLIGATOIRE POUR UNE INTERPRÉTATION DES PATHOLOGISTES

RENSEIGNEMENTS PRÉLÈVEMENTS

Date du prélèvement : ____/____/____

TYPE DE PRÉLÈVEMENTS : Sérum Plasma Sang entier
 Fèces Tissus
 Autres : _____

Commentaires : _____

BACTÉRIOLOGIE

- Antibiogramme
- Bactériologie de routine
- Bactériologie de routine nécropsie
- CMI (chaque antibiotique)
- Dénombrement (géluses RODAC)
- Dénombrement de coliformes (géluses RODAC)
- Frottis direct (coloration Gram)
- Hémo-culture
- Identification de la souche
- Recherche d'anaérobies
- Recherche de bactéries alcool-acido-résistantes (frottis)
- Recherche de Campylobacter (culture)
- Recherche de Campylobacter (frottis direct)
- Recherche de champignons (mycologie)
- Recherche de toxines de Clostridium difficile
- Recherche de Clostridium perfringens
- Recherche de Mycoplasmas
- Recherche de Salmonella
- Recherche de Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM)

Escherichia coli, Laboratoire de référence [E.col.]

- PCR Escherichia coli – Virotypage
- Escherichia coli – Sérotypage 0
- Escherichia coli – Biepuce, antibiorésistance et gènes de virulence
- Escherichia coli – Détection 0157 – Billes magnétiques, sérotypage

SVP, préciser l'âge lorsque requis

PATHOLOGIE CLINIQUE

Bilans

- Bilan de base canin/félin
Profil biochimique de base et hémogramme sans différentiel
- Bilan avancé canin/félin
Profil biochimique complet sans cholestérol et hémogramme avec différentiel
- Bilan gériatrique canin/félin
Bilan avancé canin/félin + T4 total

Profils biochimiques

- Profil de base (GLU, URÉE, CRÉAT, ALP, ALT, PROT, TOT, ALB, CLOR, ALB/GLOB)
- Profil canin/félin complet (GLU, URÉE, CRÉAT, TBLU, ALP, ALT, PROT, TOT, ALB, CLOR, ALB/GLOB, CHOL, CA, PHOS, K, NA, CL, CO2, GAP, ANION)
- Profil complet canin/félin sans cholestérol
- Profil acétyl (GLU, URÉE, CRÉAT, ALP, ALT, LDH, CK, PROT, TOT, ALB, PHOS, CA, AZIDE, URÉE)
- Profil électrolytique (CRÉAT, CA, PHOS, K, NA, CL, CO2, GAP, ANION)
- Profil hépatique petits animaux (GLU, URÉE, TBLU, ALP, ALT, PROT, TOT, ALB, CLOR, ALB/GLOB)
- Profil pancréatique (GLU, URÉE, CRÉAT, ACT, ALP, ALT, PROT, TOT, ALB, CLOR, ALB/GLOB, CA, K, NA, CL, CO2, GAP, ANION, AMPLASE, LIPASE)
- Profil rénal (GLU, URÉE, CRÉAT, PROT, TOT, ALB, CLOR, ALB/GLOB, CA, PHOS, K, NA, CL, CO2, GAP, ANION)

Biochimie

- Acide urique
- Acides gras libres
- Albumine
- ALP (Phosphatase alcaline)
- ALT (Alanine aminotransférase)
- Ammoniaque
- Amylase
- AST (Aspartate aminotransférase)
- Bilirubine
- Calcium
- Calcium ionisé
- Chlore

- Cholestérol
- CK (Créatine kinase)
- CO₂ total
- Créatinine
- Cuivre sérique
- Électrolytes (Na/K/Cl/CO₂)
- Électrophorèse des protéines (canin, félin)
- Fer
- GGT (Transférase Gamma Gutamy)
- GLDH (Glutamate déshydrogénase)
- Globulines
- Glucose
- Lactate
- LDH (Lactate déshydrogénase)
- Lipase
- Magnésium
- Micro-protéines
- Osmolalité
- pH sangum
- pH-Liquide
- Phosphore
- Potassium
- Protéines de Bence Jones
- Protéines totales
- Protéines – albumine – globulines – AG
- Ratio Cort./Créat, urinaire
- Sels biliaires de base
- Sodium
- Triglycérides
- Urée
- Zinc sérique

Catologie*

- Coudre leucocytaire
- Liquide céphalorachidien (LCR)
- Liquide et lavage
- Masse externe
- Moelle osseuse
- Organe interne

Endocrinologie

- Cortisol de base
- Cortisol post ACTH
- Cortisol dexaméthasone
- Ratio cortisol/créatinine urinaire
- Cortisol urinaire
- Progesterone
- T4 total
- TSH endogène Canin

Hématologie

- Examen de frottis
- Hémogramme sans différentiel grands animaux
- Hémogramme complet grands animaux

Formule sanguine

- Hématocrite
- Hématocrite – Protéines totales
- Hématocrite – Protéines totales – Leucocytes-Fibr.
- Réticulocytes

Dosage

- D-dimères
- Produit de dégradation du fibrinogène
- Temps de prothrombine (PT)
- Temps de thromboplastine partielle (PTT)
- Thrombéléstographie (TEG)

Pharmacologie

- Bromure de potassium
- Phénobarbital
- Combo phénobarbital et KBr
- Autres

Diagnostique

- Examen complet
- Examen physique et chimique
- Microscopie urinaire

DIAGNOSTIC MOLECULAIRE

Bactéries

- Profil respiratoire félin (Chlamydia, Calcinus félin, Herpesvirus, Mycoplasma)
- IFS (détection (présence de bactéries))
- Campylobacter spp., jejuni, coli
- Coxiella burnetii (PCR quantitatif)
- Chlamydia spp. (PCR quantitatif)
- Clostridium perfringens
- Clostridium perfringens – Espèce + entérotoxine (PCR en temps réel quantitatif)
- Enterococcus faecalis/faecium
- Identification d'espèce bactérienne
- Leptospira spp.
- Listeria monocytogenes
- Mycoplasma spp.
- Salmonella spp.
- Tularemie (Francisella tularensis)

Virus

- Calcinus félin
- Circovirus aviaire
- Coronavirus
- Virus du Nil Occidental
- Adénovirus
- Herpesvirus
- Influenza type A

PARASITOLOGIE

- Centrifugation au sulfate de zinc
- Centrifugation urine (canin, félin)
- Digestion dans le KDH
- Examen direct de raclage cutané
- Frottis direct (Trichomonas) (félin)
- Hématost
- Identification de parasite(s)
- Recherche antigène de Dirofilaria (canin, félin)
- Recherche de Strongyloides (canin, félin)
- Recherche immunoglobulines de Dirofilaria (canin, félin)
- Technique d'aspirateur
- Test de Baermann
- Test de Difi (canin, félin)
- Test de Knott (canin, félin)
- Vérification d'une identification sur lame

VIROLOGIE

- Leucémie féline (FeLV) / immunodéficience féline (FIV) – ELISA (Détection antigène)
- Parvovirus canin – ELISA (Détection antigène)
- Hépatite infectieuse féline (PIF) – IFA (immunofluorescence indirecte-antigène)
- Chlamydia spp. – FC (Fixation du complément)
- Microscopie électronique
- Isolement viral

DIAGNOSTIC ADN/GÉNOMIQUE*

PATHOLOGIE – BIOPSIE*

Le SD se réserve le droit d'utiliser les échantillons reçus à des fins de recherche ou de développement, le tout en conservant le caractère confidentiel des dossiers.

* Voir les requêtes spécifiques au laboratoire.

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 C. andersoni_AF093496 TAAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCAAA--ACT-ACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. muris_AB089284 TAAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCAAA--ACT-ACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. baileyi_L19068 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACT-ACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. canis_AF112576 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACTTACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. pestis_AF108864 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACTTACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. fayeri_AF108860 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACTTACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. felis_AF108862 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTTTACT-ACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. hominis_AF108865 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACTTACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. meleagridis_AF112574 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACTTACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. parvum_AF112571 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACTTACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. serpentis_AF151376 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACT-ACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. suis_AF115377 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTTTACT-ACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. varanii_AF112573 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--ACTTACATGGATAACCGTGGTAAFTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 C. wrairi_AF115378 TATAACAGTTAAGTTTACTTTGATAAFCCTTT--TTCTAGAGCTAATAATCATGCGAATAAACCACCTTCGCGGAAGGG
 P1F
 P2R
 P3F
 P4R

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 C. andersoni_AF093496 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. muris_AB089284 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. baileyi_L19068 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. canis_AF112576 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. pestis_AF108864 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. fayeri_AF108860 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. felis_AF108862 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. hominis_AF108865 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. meleagridis_AF112574 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. parvum_AF112571 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. serpentis_AF151376 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. suis_AF115377 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. varanii_AF112573 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 C. wrairi_AF115378 TTGTAATTTAGATAAAGAACCAATGAGCTT---GGTGATTCATAATAACTTTACGGATCGCATCTCT---GATGGACATAATCATTTCAAGTT
 P1F
 P2R
 P3F
 P4R

P3F
P4R

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
C. andersoni_AF093496 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. muris_AB089284 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. baileyi_L19068 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. canis_AF112576 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. pestis_AF108864 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. fayeri_AF108860 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. felis_AF108862 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. hominis_AF108865 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. meleagridis_AF112574 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. parvum_AF112571 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. serpentis_AF151376 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. suis_AF115377 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. varanii_AF112573 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
C. wrairi_AF115378 AATTGGAATGAGTGAAGTATAAACCCTTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGGGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGGTATATTA
P1F
P2R
P3F
P4R

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
C. andersoni_AF093496 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTAATAAATTATA-ATATACC AAGGT--AATTAAT--ATAT-TATCAACATCCCTTCC
C. muris_AB089284 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTAATAAATTATA-ATATACTA AAGGT--ATATAT--ATAT-TATCAACATCCCTTCC
C. baileyi_L19068 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATACTATAACAATACC--AC--GGTAT--TATATAA-CATTAACATAAATCA
C. canis_AF112576 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. pestis_AF108864 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--AGGTGTT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. fayeri_AF108860 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--AGGTGTT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. felis_AF108862 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATACCTTATAAATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. hominis_AF108865 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. meleagridis_AF112574 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. parvum_AF112571 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. serpentis_AF151376 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. suis_AF115377 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. varanii_AF112573 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA
C. wrairi_AF115378 AAGTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTCTGTTGTTA-ATAAATTATAAATAAATAAATTTGAT--GAATAT--TATATAA-TATTAACATAAATCA

P1F	-----	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
P2R	-----										
P3F	-----										
P4R	-----										
C. andersoni_AF093496	TATT-----AT----	ATT-CTA-----	AAATAATAGGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCACTGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. muris_AB089284	TATT-----AT----	ATTCTA-----	AAATAATAGGAAACTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCACTGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. baileyi_L19068	CATT-----ACT-T-A--TTTAA	-----AGTA--	TGTAACAACCTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAFTGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. canis_AF112576	TATT-----ACT--	ATTATAT-----	AGTA--TATGAAACTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCCTTTCCTTGAATFACTAGAGC								
C. pestis_AF108864	TATT-----ACTAT-ATATTTT	-----AGTA--	TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAATGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. fayeri_AF108860	TATT-----ACTAT--	ATTTTTTTTT--	AGTA--TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCCTTTCCTTGAATFACTCCAGC								
C. felis_AF108862	TATT-----ACTAT--	ATTTTTTTTT--	AGTA--TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCCTTTCCTTGAATFACTCCAGC								
C. hominis_AF108865	TATT-----ACTA-AAAFTT--	ATT-AGTA-----	TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAATGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. meleagridis_AF112574	TATT-----ACT--	ATAAATTTTTTT--	AGTA--TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAATGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. parvum_AF112571	TATT-----AT----	ATTTTTTA-----	A-TATAATAGGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAATGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. serpentis_AF151376	TATT-----ACT-AAAFTTTT	-----AGTA--	TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAATGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. suis_AF115377	TATT-----ACTTT-ATTTTTT	AG----AGTA--	TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAATGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. varanii_AF112573	TATT-----ACTAT-ATATTTT	-----AGTA--	TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAATGCCCTTGAATFACTCCAGC								
C. wrairi_AF115378	TATT-----ACTAT-ATATTTT	-----AGTA--	TATGAAATTTTACTTTGAGAAATAATAGAGTGCCTTAAAGCAGGCCATAATGCCCTTGAATFACTCCAGC								
P1F	-----										
P2R	-----										
P3F	-----										
P4R	-----										
C. andersoni_AF093496	ATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGCTTTCTTT--	ATTGGTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTCGTTATTTAAACAGCCAG									
C. muris_AB089284	ATGGAATAATAAGTAAGGACTTTTGCTTTCTTT--	ATTGGTCTAGGACAAAAGTAATGGTTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTCGTTATTTAAACAGCCAG									
C. baileyi_L19068	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAGGATAAAAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGTCAG									
C. canis_AF112576	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAAGATAGAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGCTAG									
C. pestis_AF108864	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGTCAG									
C. fayeri_AF108860	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGTCAG									
C. felis_AF108862	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGTCAG									
C. hominis_AF108865	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGTCAG									
C. meleagridis_AF112574	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGTCAG									
C. parvum_AF112571	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAAGATAAGAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGTCAG									
C. serpentis_AF151376	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	GTTGGTCTAGGATAAAAAGTAATGGTTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTCGTTATTTAAACAGTCAG									
C. suis_AF115377	ATGGAATAATA-TTAAAGATTTTTTACTTTTCTTT--	ATTGGTCTAAGATAAAAATAATGATTAATAGGCACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAAACAGTCAG									

C. serpentinis_AF151376
C. suis_AF115377
C. varanii_AF112573
C. wrairi_AF115378
P1F
P2R
P3F
P4R

CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAVATAAACHATGCCGACTAGAGGTGGAGGTGGTTCCTTACTCCTTACGACCCTTATGAGAAAATCAAAGTCTTTGGGGTT
CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAVATAAACHATGCCGACTAGAGGTGGAGGTGGTTCCTTACTCCTTACGACCCTTATGAGAAAATCAAAGTCTTTGGGGTT
CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAVATAAACHATGCCGACTAGAGGTGGAGGTGGTTCCTTACTCCTTACGACCCTTATGAGAAAATCAAAGTCTTTGGGGTT
CAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAVATAAACHATGCCGACTAGAGGTGGAGGTGGTTCCTTACTCCTTACGACCCTTATGAGAAAATCAAAGTCTTTGGGGTT

C. andersoni_AF093496
C. muris_AB089284
C. baileyi_L19068
C. canis_AF112576
C. pestis_AF108864
C. fayeri_AF108860
C. felis_AF108862
C. hominis_AF108865
C. meleagridis_AF112574
C. parvum_AF112571
C. serpentinis_AF151376
C. suis_AF115377
C. varanii_AF112573
C. wrairi_AF115378
P1F
P2R
P3F
P4R

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA
CTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACCTTAAAGGAAATTGACGGAAGGCGCACCCAGGAGTGGAGCCCTGCGGCTTAAATTGACTCAACACCGGGA AAA

C. andersoni_AF093496
C. muris_AB089284
C. baileyi_L19068
C. canis_AF112576
C. pestis_AF108864
C. fayeri_AF108860
C. felis_AF108862
C. hominis_AF108865
C. meleagridis_AF112574
C. parvum_AF112571
C. serpentinis_AF151376
C. suis_AF115377
C. varanii_AF112573
C. wrairi_AF115378
P1F
P2R
P3F
P4R

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
CTCACCAGGTCACACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTGAATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTG
CTCACCAGGTCACACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTGAATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTG
CTCACCAGGTCACACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTGAATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTG
CTCACCAGGTCACACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTGAATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTG
CTCACCAGGTCACACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTGAATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTG
CTCACCAGGTCACACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTGAATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTG
CTCACCAGGTCACACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTGAATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTG
CTCACCAGGTCACACATAGGAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTGAATTCTATGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAATTTG

