

Table des matières (mise en page perturbée par les réunion des fichiers !)

Introduction

Err

Erreur ! Signet non défini.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I Etude du parasite

Erreur ! Signet non défini.

A) Historique

Erreur ! Signet non défini.

B) Taxonomie

Erreur ! Signet non défini.

C) Morphologie

Erreur ! Signet non défini.

1. Le trophozoïte

Erreur ! Signet non défini.

2. Le kyste

Erreur ! Signet non défini.

D) Biologie

Erreur ! Signet non défini.

1. Habitat **Erreur ! Signet non défini.**
2. Moyens de défense
Erreur ! Signet non défini.
3. Métabolisme
Erreur ! Signet non défini.
4. Cycle évolutif
Erreur ! Signet non défini.
5. Culture
Erreur ! Signet non défini.

II La Giardiose canine **Erreur ! Signet non défini.**

A) Définition

Erreur ! Signet non défini.

B) Epidémiologie

Erreur ! Signet non défini.

1. Importance
Erreur ! Signet non défini.
2. Sources
Erreur ! Signet non défini.
3. Mode de transmission
Erreur ! Signet non défini.
4. Causes favorisantes
Erreur ! Signet non défini.
 - a. extrinsèques
Erreur ! Signet non défini.
 - b. intrinsèques
Erreur ! Signet non défini.

C) Résistance

Erreur ! Signet non défini.

D) Symptômes

Erreur ! Signet non défini.

1. forme aiguë
Erreur ! Signet non défini.
2. Forme chronique
Erreur ! Signet non défini.

E) Lésions
Erreur ! Signet non défini.

F) Pathogénie
Erreur ! Signet non défini.

1. Pathogénie de la malabsorption/maldigestion
Erreur ! Signet non défini.
2. Pathogénie de la diarrhée
Erreur ! Signet non défini.

G) Immunité
Erreur ! Signet non défini.

1. Immunité à médiation humorale
Erreur ! Signet non défini.
2. Immunité à médiation cellulaire
Erreur ! Signet non défini.

H) Diagnostic
Erreur ! Signet non défini.

1. Diagnostic clinique et épidémiologique
Erreur ! Signet non défini.
2. Diagnostic différentiel
Erreur ! Signet non défini.
3. Diagnostic de laboratoire
Erreur ! Signet non défini.
 - a. Observation _____ directe
Erreur ! Signet non défini.
 - b. Coproscopie _____ après _____ enrichissement
Erreur ! Signet non défini.
 - 1) Technique _____ de _____ flottation
Erreur ! Signet non défini.
 - 2) Technique _____ de _____ sédimentation
Erreur ! Signet non défini.

3) *Reconnaissance des kystes*
Erreur ! Signet non défini.

4) *Interprétation de la flottation et de la sédimentation*
Erreur ! Signet non défini.

c. Examen du liquide d'aspiration duodénale
Erreur ! Signet non défini.

d. Entero-test®
Erreur ! Signet non défini.

e. Techniques immunologiques
Erreur ! Signet non défini.

1) *Immunofluorescence directe*
Erreur ! Signet non défini.

2) *ELISA : copro-antigène*
Erreur ! Signet non défini.

(a) Utilisation chez l'humain
Erreur ! Signet non défini.

(b) Utilisation chez le chien
Erreur ! Signet non défini.

f. Techniques de biologie moléculaire
Erreur ! Signet non défini.

g. Autres méthodes
Erreur ! Signet non défini.

4. Conclusion
Erreur ! Signet non défini.

I) Traitement **Erreur ! Signet non défini.**

1. Quinacrine
Erreur ! Signet non défini.

2. 5-nitro-imidazolés
Erreur ! Signet non défini.

a. Ipronidazole
Erreur ! Signet non défini.

b. Furazolidone
Erreur ! Signet non défini.

c. Métronidazole
Erreur ! Signet non défini.

3. Benzimidazoles
Erreur ! Signet non défini.
 - a. Albendazole
Erreur ! Signet non défini.
 - b. Oxfendazole
Erreur ! Signet non défini.
 - c. Fenbendazole
Erreur ! Signet non défini.
4. Association fébantel praziquantel et pyrantel
Erreur ! Signet non défini.
5. Conclusion
Erreur ! Signet non défini.

J) Prophylaxie
Erreur ! Signet non défini.

1. sanitaire
Erreur ! Signet non défini.
2. médicale
Erreur ! Signet non défini.

K) Autres espèces animales
Erreur ! Signet non défini.

L) Santé publique vétérinaire
Erreur ! Signet non défini.

1. potentiel zoonotique
Erreur ! Signet non défini.
2. La giardiose chez l'homme
Erreur ! Signet non défini.

PARTIE EXPERIEMENTALE

I Matériel et méthodes
Erreur ! Signet non défini.

A) Les chiens
Erreur ! Signet non défini.

B) Etude des selles
Erreur ! Signet non défini.

1. Coproscopie par sédimentation
Erreur ! Signet non défini.

2. Test ELISA ProspectT® *Giardia*
Erreur ! Signet non défini.

C) Analyse statistique des résultats
Erreur ! Signet non défini.

II Résultats

Erreur ! Signet non défini.

A) Résultats des échantillons positifs
Erreur ! Signet non défini.

B) Résultats des échantillons négatifs
Erreur ! Signet non défini.

C) Analyse des résultats
Erreur ! Signet non défini.

1. Synthèse
Erreur ! Signet non défini.

2. Etude statistique des résultats
Erreur ! Signet non défini.

a. Sensibilités
Erreur ! Signet non défini.

b. Valeurs prédictives
Erreur ! Signet non défini.

1. *Coproscopie*
Erreur ! Signet non défini.

2. *ELISA*
Erreur ! Signet non défini.
- c. Tests du Chi²
Erreur ! Signet non défini.
3. *Comparaison entre les deux méthodes*
Erreur ! Signet non défini.
4. *Comparaison entre coproscopies*
Erreur ! Signet non défini.
5. *Comparaison entre ELISA*
Erreur ! Signet non défini.

III Discussion

Erreur ! Signet non défini.

Conclusion

Err

eur ! Signet non défini.

Références bibliographiques

Err

eur ! Signet non défini.

ANNEXES

Err

eur ! Signet non défini.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats des coproscopies et ELISA réalisés sur les coproscopies positives

Tableau 2 : Résultats des ELISA réalisés sur les coproscopies négatives

Tableau 3 : Synthèse des résultats obtenus

Tableau 4 : Réponse de la coproscopie face à la situation réelle

Tableau 5 : Réponse de l'ELISA face à la situation réelle

Tableau 6 : Calculs statistiques de Chi^2 pour la comparaison entre la méthode ELISA et la coproscopie par sédimentation

Tableau 7 : Calculs statistiques de Chi^2 pour la comparaison des coproscopies réalisées sur les échantillons positifs

Tableau 8 : Calculs statistiques de Chi^2 pour la comparaison des ELISA réalisés sur les échantillons positifs

Liste des figures

Figure 1 : Trophozoïte de *Giardia duodenalis*

Figure 2 : Kyste de *Giardia*

Figure 3 : Fixation de *Giardia* à la surface des entérocytes

Figure 4 : Cycle évolutif de *Giardia duodenalis*

Figure 5 : Coproscopie par sédimentation

Figure 6 : Protocole ELISA

Liste des photos

Photo 1 : Kystes de *Giardia duodenalis* sans coloration

Photo 2 : Kystes de *Giardia duodenalis* sans coloration

Photo 3 : Kystes de *Giardia duodenalis* colorés au lugol

Introduction

Giardia duodenalis est une des espèces du genre *Giardia*. Elle est cosmopolite et responsable de la giardiose chez un très grand nombre de mammifères y compris l'homme. Au sein de cette espèce, les sous-groupes ne sont pas encore bien définis, mais il semble de plus en plus clair que les animaux puissent avoir un rôle de réservoir pour la giardiose vis à vis de l'homme. Le symptôme observé le plus couramment est une diarrhée chronique non caractéristique. Mais nombreux sont les animaux porteurs asymptomatiques.

La forte prévalence de *Giardia duodenalis*, le risque pour la santé publique et l'absence de signes cliniques caractéristiques associés, font du diagnostic de laboratoire un élément fondamental de la lutte contre la giardiose.

L'observation microscopique des kystes du parasite est la méthode diagnostique la plus employée. Mais cette méthode nécessite plusieurs prélèvements espacés dans le temps pour être d'une bonne sensibilité. En médecine humaine, des tests ELISA ont été développés et s'avèrent être très sensibles et très spécifiques vis à vis de *Giardia duodenalis*. En médecine vétérinaire, les études peu nombreuses réalisées avec des tests ELISA chez le chien nécessitent d'être approfondies.

Cette étude portant sur le diagnostic de la giardiose avait donc pour objectifs de :

- Comparer la coproscopie par sédimentation et le test ELISA ProspectT® *Giardia* pour le diagnostic de la giardiose chez le chien.
- Etudier la conséquence de la conservation pendant une semaine à température ambiante des selles non traitées sur les résultats du test ELISA ProspectT® *Giardia*.
- Etudier la conséquence de la conservation pendant une semaine à température ambiante des selles non traitées sur les résultats de la coproscopie par sédimentation.

Nous ferons dans une première partie une mise au point des connaissances actuelles sur *Giardia duodenalis* et sur la giardiose canine. Puis nous détaillerons dans une deuxième partie l'expérimentation mise en place pour la réalisation des objectifs choisis. Nous présenterons les résultats puis les discuterons.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

LA GIARDIOSE CANINE

I. Etude du parasite

A) Historique

Le protozoaire *Giardia* fut un des premiers parasites observés au microscope, par Anton Leeuwenhoek examinant ses propres selles en 1681. La reconnaissance de son implication dans la survenue de diarrhée chez des animaux infectés s'est faite plus tard.

Pendant longtemps, le genre *Giardia* a été reconnu pour comporter un nombre important d'espèces adaptées à leur hôte. Mais le manque de distinction morphologique évidente a conduit Filice en 1952 (*cité par VAN KEULEN et al., 2002*) à redéfinir trois espèces morphologiquement différentes, dont *Giardia duodenalis* qui est l'espèce retrouvée chez la plupart des mammifères y compris les humains.

La littérature emploie indifféremment les noms de *Giardia duodenalis* ou *Giardia intestinalis* pour désigner la giardiose chez les mammifères autres que l'homme, et *Giardia lamblia* chez l'homme. Tous désignent morphologiquement le même organisme. Ainsi, Thompson *et al.*(1993a) proposent l'utilisation unique du nom *Giardia duodenalis* pour éviter toute confusion.

Plus récemment, la caractérisation moléculaire d'isolats de *Giardia duodenalis* dans des espèces animales différentes a indiqué l'existence d'un certain nombre de génotypes distincts, dont certains semblent être adaptés à leur hôte (THOMPSON *et al.*, 1993a).

B) Taxonomie

Selon la classification la plus récente, *Giardia duodenalis* est un organisme unicellulaire faisant partie (BUSSIERAS et CHERMETTE, 1992 ; COX, 2002) :

- Du règne des Protozoaires (eucaryotes unicellulaires)
- Du phylum des *Metamonada* (flagellés intestinaux), issu de l'ancienne classe des *Mastigophora*
- De l'ordre des *Diplomonadida* caractérisé par une symétrie bilatérale du fait d'un corps divisé longitudinalement (2 noyaux, 8 flagelles, mais pas de mitochondries ni de Golgi)
- De la famille des *Hexamitidae* (présence de 8 flagelles)
- Du genre *Giardia* (présence d'un disque adhésif ventral).

La taxonomie du genre *Giardia* est basée sur la morphologie ; en particulier sur la forme du trophozoïte, des corps médians et sur la taille du disque ventral adhésif comparé à la taille de la cellule. En utilisant ces critères, Filice (1952) a défini trois grandes espèces morphologiques: *Giardia agilis* retrouvée chez les amphibiens, *Giardia muris* chez les rongeurs, et *Giardia duodenalis* chez les mammifères. Par la suite, deux nouvelles espèces *Giardia psittaci* et *Giardia ardeae*, retrouvées chez les oiseaux, ont été décrites sur la base d'une identification par microscopie électronique. Une sixième espèce retrouvée chez les campagnols et les rats musqués, *Giardia microti*, a été proposée sur la base de la morphologie des kystes et de l'analyse de l'ARN ribosomal (MONIS *et al.*, 2003).

Giardia duodenalis est retrouvée chez de nombreux mammifères. L'unité morphologique des isolats retrouvés masque en réalité une considérable diversité génétique et biotypique (MELONI *et al.*, 1995). Les données taxonomiques ont ainsi dû être reconsidérées (MONIS *et al.*, 2003).

Les isolats de *Giardia duodenalis* provenant d'humains et de nombreux autres mammifères peuvent être réunis dans un des deux assemblages génétiques majeurs : Assemblage A et Assemblage B (HOMAN *et al.*, 1992 ; MONIS *et al.*, 1996).

L'Assemblage A étant lui-même séparé en deux groupes : A-I et A-II. A-I comprend des isolats retrouvés aussi bien chez les humains que chez les animaux (EY *et al.*, 1996). Il focalise ainsi l'attention concernant le potentiel de transmission zoonotique de *Giardia duodenalis*. L'isolat A-II est connu pour être retrouvé exclusivement chez les humains (THOMPSON *et al.*, 2000). Une étude récente vient cependant de retrouver des isolats A-II chez des animaux domestiques (PONCE-MACOTELA *et al.*, 2002).

L'Assemblage B est essentiellement retrouvé chez les humains mais également chez quelques espèces de mammifères.

Le niveau de diversité génétique des génotypes appartenant à l'assemblage B est plus important que ceux retrouvés dans l'assemblage A. Nombre de ces génotypes n'ont été retrouvés que chez une seule espèce hôte, ce qui laisse supposer une plus grande ancienneté de cet assemblage (THOMPSON *et al.*, 2000).

Les études récentes portant sur les isolats d'origine animale ont révélé plusieurs nouveaux groupes génétiques autres que les Assemblages A et B au sein de *Giardia duodenalis*, ceux-ci apparaissant spécifiques de leur hôte (THOMPSON *et al.*, 2000) :

- Les assemblages C et D, isolés chez le chien
- L'assemblage E, isolé chez le bétail (alpaga, bovins, ovins, caprins, porcins)
- L'assemblage F, isolé chez le chat
- L'assemblage G, isolé chez le rat.

Ces données sont en faveur d'une grande complexité au sein de l'espèce *Giardia duodenalis* (MONIS *et al.*, 2003).

Cela inciterait donc à ne regrouper sous le terme de *Giardia duodenalis* que les souches à potentiel zoonotique et à nommer différemment les espèces spécifiques de leur hôte (THOMPSON *et al.*, 1993a ; THOMPSON, 2002a).

C) Morphologie

Giardia duodenalis se présente sous deux formes : le trophozoïte (stade végétatif) et le kyste.

1. Le trophozoïte (KREIER, 1978 ; THOMPSON *et al.*, 1993b)

Il a une forme de goutte à l'extrémité antérieure arrondie et postérieure effilée. Il mesure 6 à 10 μm de largeur sur 10 à 15 μm de longueur pour une épaisseur de 2 à 4 μm . En section, *Giardia* a une forme en croissant avec une face dorsale convexe et une face ventrale concave en raison de la présence d'un disque formant une ventouse.

Cette dépression ventrale joue un rôle dans la fixation du parasite aux cellules intestinales. Ce disque est constitué par des flagelles et des microtubules. Son fonctionnement est complexe. Il résulte d'une force d'aspiration créée par le flux de liquide généré par le mouvement des flagelles ventraux.

Le trophozoïte est actif et mobile grâce à quatre paires de flagelles. La cellule contient deux gros noyaux à contours ovalaires situés symétriquement dans le tiers antérieur, contenant chacun un caryosome de grande taille. Transversalement, deux structures parallèles en forme de bâtonnets plus ou moins incurvés, les corps médians, correspondent à des agrégats denses de microtubules et de protéines contractiles. Il ne contient ni mitochondrie, disparue au cours de son évolution, ni appareil de Golgi (BUSSIERAS et CHERMETTE, 1992 ; HASHIMOTO *et al.*, 1998). Lors de son observation à l'objectif à immersion (x100), il ressemble à un « visage de clown » (CONBOY, 1997).

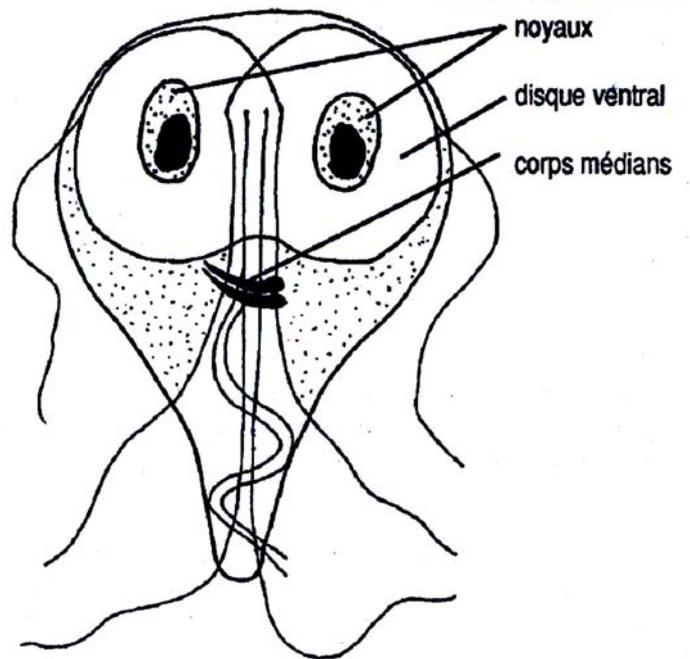


Figure 1 : *Trophozoïte de Giardia duodenalis* (27)

Le génome est constitué d'au moins 5 chromosomes dans chaque noyau correspondant à un total de 1.2×10^7 paires de bases (ADAM, 2000).

2. Le kyste

Le kyste est une forme de résistance émise dans les selles et est un élément de contamination. Il présente une forme ovale, une paroi à double contour d'épaisseur 0.3-0.5 μm (RIPERT, 1996). Il renferme 2 à 4 noyaux, des résidus de flagelles et de corps médians, donnant l'impression de contenir un S au centre et correspondant à deux trophozoïtes incomplètement séparés mais formés. Il mesure 7 à 10 sur 8 à 12 μm (BARR et BOWMAN, 1994 ; BOURDEAU, 1993).

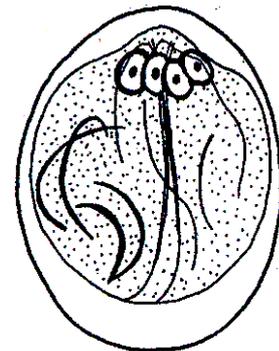


Figure 2 : *Kyste de Giardia* (27)

D) Biologie

1. Habitat

Le peu d'études portées sur l'habitat des *Giardia* chez les carnivores rendent sa connaissance controversée. Chez le chien, *Giardia duodenalis* semble coloniser préférentiellement le duodénum et le jéjunum. Certaines études ont décrit une colonisation du duodénum chez des chiens symptomatiques et du jéjunum chez des chiens asymptomatiques (BARR, 1998). Chez le chat, la répartition est différente avec un développement surtout net en partie distale de l'intestin grêle (KIRKPATRICK, 1986).

Cette répartition peut aussi varier en fonction des individus et selon l'alimentation de ceux-ci. Une alimentation riche en carbohydrates plutôt qu'en protéines semblerait favoriser l'infection et plus particulièrement la colonisation de la partie haute du tube digestif (BARR et BOWMAN, 1994).

Très rarement, les *Giardia* peuvent envahir la muqueuse, mais on ne connaît pas chez les carnivores de cas de remontée des voies biliaires, tels que décrits dans l'espèce humaine (BEUGNET *et al.*, 2000a ; TEKWANI et MEHLOTRA, 1999).

Les *Giardia* vivent fixés à la surface de la bordure en brosse des cellules intestinales, essentiellement à la base des villosités. La fixation est permise par le disque, dont le processus de succion est entretenu par les mouvements des flagelles mais aussi grâce à des mécanismes de reconnaissance cellulaire spécifique. La fixation est en partie liée à la présence d'une protéine (lectine) de la membrane plasmique, qui se lie à des résidus glycosylés de la cellule hôte (THOMPSON *et al.*, 1993b).

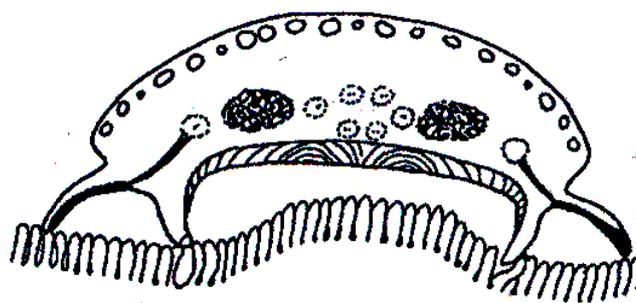


Figure 3 : *Fixation de Giardia à la surface des entérocytes (27)*

Les *Giardia* se multiplient par division binaire dans l'intestin grêle sous leur forme trophozoïtique et forment un véritable tapis en surface de l'épithélium digestif (KREIER, 1978). Quelques trophozoïtes peuvent passer dans les selles mais ils ne survivent pas longtemps en dehors de leur hôte (BARR et BOWMAN, 1994).

Moyens de défense

Il existe à la surface du trophozoïte des protéines à expression variable, ayant de multiples rôles. Elles seraient capables de protéger le parasite contre les enzymes de l'hôte en formant une sorte de barrière (THOMPSON *et al.*, 1993a). Le trophozoïte peut en effet se protéger de la digestion par l'hôte en neutralisant les enzymes pancréatiques, modifiant ainsi la couleur des selles (THOMPSON *et al.*, 1993b).

Elles seraient également une protection contre le système immunitaire de l'hôte. Les études ont montré qu'une variation antigénique est observée uniquement lorsque le clone de *Giardia* est donné à des souris immuno-compétentes. Lorsque les souris sont immuno-incompétentes, la variation antigénique est absente. L'existence d'une telle variation est un mécanisme connu d'échappement des parasites au système immunitaire de l'hôte. Mais il semble être d'une faible efficacité dans le cas de la giardiose (FAUBERT, 1996).

Métabolisme

Giardia est un organisme anaérobie (absence de mitochondrie). Il est cependant capable de survivre dans un environnement micro-aérobie grâce à la cystéine dont le rôle serait de le protéger contre les effets létaux de l'oxygène (BARR et BOWMAN, 1994).

Il se nourrit par pinocytose sur la face dorsale et au centre du disque ventral, les flagelles créant un flux liquidien mettant en mouvement les nutriments présents à la surface des villosités intestinales (THOMPSON *et al.*, 1993b).

Sa principale source d'énergie est le glucose mais il utilise également les acides aminés comme source de carbone. Il est incapable de synthétiser ses lipides cellulaires et utilise comme source de lipide les lipides biliaires (GIBSON *et al.*, 1999 ; LUJAN *et al.*, 1998).

4. Cycle évolutif

Le cycle de *Giardia* est très simple, monoxène, faisant alterner une phase de multiplication des trophozoïtes et un stade kyste.

L'infection se produit lors de l'ingestion puis de la maturation des kystes. Sous l'action des enzymes gastriques (*in vitro* : pH 2 et pepsine à 37 °C) ou duodénales (*in vitro* : pH 8 et trypsine à 37 °C), l'excystement est induit. La maturation des deux trophozoïtes immatures contenus dans chaque kyste s'achève par leur séparation (cytodierèse) et sont alors libérés dans le duodénum. Expérimentalement, cette phase est réalisée en 10 à 30 minutes (BARR et BOWMAN, 1994 ; BOURDEAU, 1993 ; THOMPSON *et al.*, 1999).

Par la suite, la reproduction des trophozoïtes se fait activement par simple fission binaire longitudinale en 5 à 40 heures selon les modèles étudiés (*in vivo* ou *in vitro*). Lorsque les conditions sont favorables (absence de réaction immunitaire de l'hôte, perturbation de la flore intestinale, association avec d'autres parasites), les *Giardia* pullulent (BOURDOISEAU, 1993 ; KREIER, 1978). Il n'existe pas de reproduction sexuée connue (BOURDEAU, 1993).

Certains trophozoïtes adhèrent à la bordure en brosse de la muqueuse intestinale, grâce à leur disque adhésif ventral et sont alors responsables de la maldigestion/malabsorption de l'hôte. Ils se déplacent d'un site à l'autre en utilisant leurs flagelles. D'autres trophozoïtes progressent dans le tube digestif et subissent l'enkystement (GILLIN *et al.*, 1987 ; THOMPSON *et al.*, 1999).

La formation des kystes se réalise de manière presque exclusive dans la partie distale de l'iléum et dans le gros intestin, par des mécanismes encore mal connus (LEIB et ZAJAC, 1999 ; LUJAN *et al.*, 1998). L'enkystement est favorisé par la perte de la capacité des trophozoïtes à se fixer à la muqueuse, ce qui augmente l'exposition aux facteurs d'enkystement et accélère le processus. Cette transformation peut être affectée par les variations de pH, concentration en sels biliaires et acides gras. Par exemple, la privation en cholestérol dans l'environnement du trophozoïte entraînerait une cascade de régulation aboutissant à l'expression de gènes responsables de l'enkystement (LUJAN *et al.*, 1998). L'acide lactique, produit majeur du métabolisme bactérien dans le colon, stimule l'enkystement. De même, le pH le plus favorable à l'enkystement est de 7,8 (BOURDEAU, 1993 ; GILLIN *et al.*, 1989).

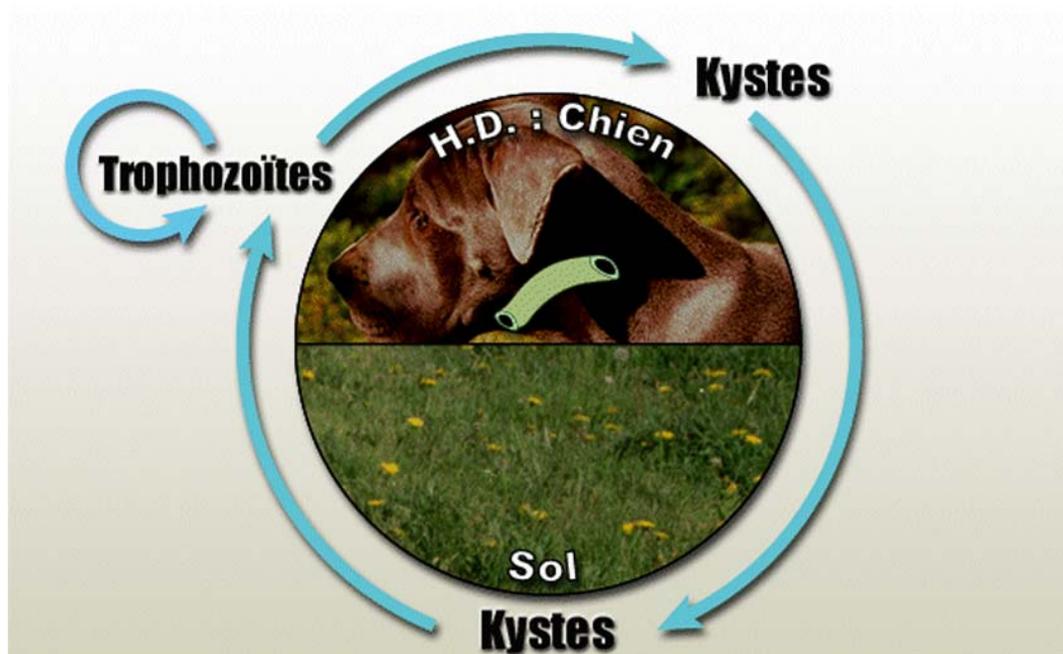


Figure 4 : Cycle évolutif de *Giardia duodenalis* (32)

Le trophozoïte s'ovalise, le disque adhésif se désorganise, les corps médians disparaissent. La paroi du kyste apparaît d'abord en partie dorsale jusqu'à recouvrir complètement l'organisme (KREIER, 1978). Il contient deux trophozoïtes incomplètement formés (2 à 4 noyaux peu visibles, fragments des disques ventraux en forme de croissant).

Les kystes sont éliminés avec les matières fécales et sont directement infectants. Ils peuvent survivre pendant des mois dans l'environnement, particulièrement si les conditions climatiques sont fraîches et humides. L'eau propre optimise la longévité des kystes alors qu'elle se trouve réduite en cas de contamination bactérienne. Occasionnellement des trophozoïtes peuvent être éliminés (en cas de selles liquides), ils sont alors tués si le milieu est sec (BARR et BOWMAN, 1994 ; BOURDOISEAU, 1993). La période prépatente est de l'ordre de une à deux semaines (5 à 12 jours chez le chien, 5 à 16 jours chez le chat) (BARR, 1998 ; LEIB et ZAJAC, 1999). La période patente est en moyenne de 4 à 5 semaines mais parfois beaucoup plus (BOURDOISEAU, 1993).

5. Culture

La multiplication de *Giardia duodenalis* par mise en culture est difficile à obtenir mais cependant réalisable sur certains milieux complexes tel que le milieu BIS 33 « Mexico », en utilisant la solution saline seule, additionnée de bile de bœuf desséchée. L'inoculum doit être massif (RIPERT, 1996).

II. La Giardiose canine

A) Définition

La giardiose est une parasitose digestive courante et cosmopolite. Elle a, par exemple, été mise en évidence chez les chiens dans des pays tels que la Chine, l'Espagne, les Etats-Unis, la France, l'Australie ou la Nouvelle-Zélande (JORDAN *et al.*, 1993 ; THOMPSON, 2000 ; TONKS *et al.*, 1991). Elle sévit généralement sous forme sporadique mais peut occasionnellement prendre une allure épizootique chez les jeunes animaux de chenil ; contexte dans lequel la maladie est généralement recherchée et reconnue (BOURDEAU, 1993).

B) Epidémiologie

1. Importance

La giardiose du chien est fréquente en France, touchant les animaux de tous âges, avec une prévalence plus élevée chez les jeunes à partir du sevrage jusqu'à 2 ans (BEUGNET, 1996). Une étude canadienne a montré que 73% des giardioses étaient constatées chez des animaux de moins de 1 an. Ces derniers sont en effet plus exposés à la contamination fécale, immatures au plan immunologique et donc plus sensibles à *Giardia* (BOURDEAU, 1993 ; JACOBS *et al.*, 2001). Dans les élevages, la prévalence de la giardiose peut atteindre 100% (BARR, 1998).

Une étude américaine a montré que le parasitisme intestinal chez le chien avait diminué pour toutes les espèces de parasites entre 1981 et 1990 excepté pour *Giardia*, qui augmente (JORDAN *et al.*, 1993).

Les résultats des analyses coproscopiques réalisées du 1^{er} septembre 97 au 31 août 1998 au laboratoire de parasitologie de l'ENVA ont montré l'importance du parasitisme des protozoaires au rang desquels se trouve la giardiose. Dans cette étude 77% des coproscopies positives correspondaient à une infestation par des helminthes contre 33% pour les protozoaires (BEUGNET, 1998).

Le laboratoire de l'ENVL a mis en évidence une giardiose dans 10 % des coproscopies réalisées à partir de selles de carnivores ayant une diarrhée et présentés en consultation à l'Ecole (80 coproscopies réalisées de septembre 1995 à janvier 1996) (BEUGNET *et al.*, 2000a).

Les résultats des coproscopies de chiens effectuées au laboratoire de parasitologie de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort en 1998/99 à partir de selles adressées par des vétérinaires praticiens ou par les services de l'Ecole montrent que 13% des chiens de propriétaires et 22.1 % des chiens d'élevage sont parasités par *Giardia duodenalis*, parasite le plus souvent observé (BEUGNET *et al.*, 2000b ; HERZOG, 2002). Ces résultats montrent également que 30,4% des chiens de moins de 6 mois sont infectés par les *Giardia* ; premier parasite digestif du jeune avec les coccidies. Les chiens adultes sont également parasités majoritairement par *Giardia*, à hauteur de 7,1% (BEUGNET *et al.*, 2000c). Une autre étude réalisée dans les mêmes conditions mais dans la région lyonnaise a abouti à des conclusions similaires (VILLENEUVE, 2000 ; VILLENEUVE *et al.*, 2000b).

Une étude réalisée en 2001 a trouvé que 59% des portées de chiots étaient infectées par *Giardia duodenalis*. De plus, l'excrétion des kystes semble augmenter à partir de la 5^{ème} semaine d'âge puis reste constante, sans subir l'influence du sevrage (ANDRE, 2001).

Une étude allemande réalisée entre 1998 et 2001 sur la population canine globale a montré que la prévalence de la giardiose dans ce pays a augmenté d'année en année (14% en 1998 ; 16,7% en 1999 ; 20,5% en 2000 ; 23,7% en 2001) (BARUTZKI D, 2001).

2. Sources

Les sources de contamination sont représentées par les animaux ou l'homme qui éliminent des kystes dans les matières fécales, qu'ils soient porteurs asymptomatiques ou

malades. La transmission entre espèces est possible mais fonction des génotypes (THOMPSON *et al.*, 2000). Il a été démontré récemment expérimentalement que des trophozoïtes issus de perroquets pouvaient coloniser le tube digestif de chatons ou de ruminants domestiques et engendrer la maladie (MCDONNELL *et al.*, 2003). Le parasite semble transmissible de l'animal à l'homme et vice-versa, même si certaines populations parasitaires sont plutôt spécifiques d'une espèce (THOMPSON *et al.*, 1993b ; THOMPSON *et al.*, 2000).

La source majeure de contamination est constituée par les jeunes animaux, plus réceptifs au parasite. Les adultes, par l'excrétion intermittente de kystes pendant une longue période, peuvent assurer une source pérenne et insidieuse de contamination, d'autant que les re-contaminations peuvent se produire indéfiniment (BOURDEAU, 1993 ; THOMPSON *et al.*, 1999).

L'eau de boisson et les aliments souillés sont fréquemment à l'origine d'infections. Le lamelibranche *Corbicula flumicola* constitue un excellent détecteur de la contamination du milieu aquatique par les kystes de *Giardia*. En effet, le parasite filtre les kystes présents dans l'eau douce, qui sont alors retrouvés dans ses tissus (GRACZYK *et al.*, 1999 ; HERZOG, 2002).

La détection des modifications morphologiques et physicochimiques des microorganismes par la technique d'électrorotation, permet de déterminer la viabilité des kystes dans les aliments et l'eau potable (DALTON *et al.*, 2001).

3. Mode de transmission

L'infection se fait par voie buccale par ingestion de kystes. Le rôle de la contamination fécale des aliments ou surtout de l'eau a été souligné chez l'homme. Une eau de boisson contaminée pouvant expliquer de nombreux cas de giardiose. De plus, chez les carnivores la transmission peut se faire soit directement par les selles, soit indirectement par un véhicule tel que la fourrure du chien, les bottes d'éleveurs, les mouches et autres insectes susceptibles de transporter les kystes (THOMPSON *et al.*, 1999).

Dix kystes peuvent suffire pour induire l'infection, mais des doses très supérieures peuvent tout aussi bien échouer (KREIER, 1978).

Le pouvoir infectieux des trophozoïtes paraît négligeable bien que l'on ait pu infecter expérimentalement des chiens à partir de trophozoïtes de culture (HELWETT *et al.*, 1982 cité par BOURDEAU, 1993).

4. Causes favorisantes

a. extrinsèques

Les saisons humides peuvent favoriser l'infection par la persistance accrue des kystes dans l'environnement. La saison estivale peut elle aussi favoriser l'infection, surtout chez l'homme, par l'augmentation de la prise de boisson et donc une exposition renforcée au parasite. L'alimentation glucidique est également un facteur favorisant, de même que le mode de vie qui joue un rôle très important. Les animaux vivant en collectivité sont

beaucoup plus exposés, d'autant plus si l'élevage est intensif (surpopulation, taux d'humidité élevé) ou si les conditions d'hygiène ne sont pas strictes (BARR et BOWMAN, 1994 ; BOURDOISEAU, 2000).

Si un faible nombre de *Giardia* persiste après un traitement, l'utilisation de corticoïdes à doses anti-inflammatoires (1 mg/kg/jour de prednisolone) pendant 10 jours peut provoquer la réémergence de kystes de *Giardia* (ZAJAC *et al.*, 1992).

b. intrinsèques

Chez les humains, *Giardia* est souvent associé aux gastrites atrophiques chroniques, entraînant une baisse de l'acidité gastrique (BARR, 1998).

D'autres facteurs interviennent puisque l'infection expérimentale n'entraîne souvent aucun symptôme chez le chien, et que un tiers à un quart seulement des animaux naturellement parasités présentent une giardiose clinique.

On évoque parmi ces facteurs le rôle d'une maldigestion-malabsorption préalable, notamment vis-à-vis des glucides et des lipides, ou, chez l'homme, celui des hypogammaglobulinémies (BOURDEAU, 1993). En effet, il semble qu'un système immunitaire intact soit important pour lutter contre l'infection et développer une immunité protectrice (rôle des IgA). Lors d'une étude menée sur des chiens de race Beagle déficients en IgA, on a remarqué que la prévalence de l'infection par *Giardia* était supérieure à la prévalence calculée pour des animaux immunocompétents (BARR, 1998).

Les jeunes animaux sont beaucoup plus sensibles. Ils sont en effet plus exposés à la contamination fécale et sont neufs au plan immunologique. Le sevrage est une période critique au plan expérimental chez la souris (modification des entérocytes) (BOURDEAU, 1993 ; LEIB et ZAJAC, 1999).

C) Résistance

La *résistance* des kystes varie considérablement de quelques jours à quelques semaines (4 jours à 37 °C, 1 mois à 21 °C, 2 mois à 8 °C) (KIRKPATRICK, 1986). Ils sont sensibles à la dessiccation ; ils sont tués par une température supérieure à 50°C (KREIER, 1978). Mais les milieux humides et frais favorisent leur survie (BARR, 1998). Le gel semble les détruire assez rapidement bien que cette opinion soit encore controversée (résistance partielle à -13 °C pendant 2 semaines). Les kystes résistent au traitement de l'eau potable par le chlore ou le permanganate de potassium. Par contre, l'eau de mer réduit leur viabilité (BOURDEAU, 1993 ; BROWN *et al.*, 1999). Les désinfectants à base d'ammonium quaternaire sont efficaces contre les kystes de *Giardia*, contrairement à l'eau de Javel. Leur utilisation aux concentrations recommandées détruit les kystes en 1 minute à température ambiante (BARR, 1998).

Les trophozoïtes sont quant à eux rapidement détruits dans le milieu extérieur (THOMPSON *et al.*, 1993b).

D) Symptômes

Les carnivores expriment des symptômes en moyenne 1 semaine après l'ingestion de kystes. La durée de l'incubation est cependant très variable d'un animal à l'autre, certains animaux n'exprimant aucun symptôme ; l'infection par *Giardia* est souvent asymptomatique (BARR et BOWMAN, 1994 ; BOURDEAU, 1993 ; LEIB et ZAJAC, 1999). En outre, l'infection peut durer des mois voire des années et certains animaux sont porteurs latents pendant de très longues périodes (HERZOG, 2002).

Lors de l'existence de signes cliniques, aucun symptôme n'est vraiment spécifique de la giardiose. Deux formes sont possibles, une forme aiguë, la plus rare, et une forme chronique, la plus fréquente (DANG et BEUGNET, 2000 ; BOURDEAU, 1993).

1. forme aiguë

Elle est caractérisée par l'apparition, parallèlement à une altération de l'état général (déshydratation, léthargie, hyporexie), d'une diarrhée aqueuse, rebelle à tout traitement, de coliques et de ballonnements. L'évolution reste généralement apyrétique (DANG et BEUGNET, 2000).

2. Forme chronique

La forme chronique est caractérisée par un syndrome de malabsorption-maldigestion pouvant évoluer pendant des semaines, des mois voire des années, et ressembler ainsi à s'y méprendre aux symptômes de l'insuffisance pancréatique exocrine (DANG et BEUGNET, 2000 ; BOURDEAU, 1993 ; BEUGNET et PIERSON, 1997):

- Décoloration des selles (couleur jaunâtre)
- Diarrhée pâteuse (parfois liquides) et malodorante
- Augmentation du volume et de la fréquence des défécations (5-6 fois par jour)
- Stéatorrhée donnant aux selles un aspect luisant, gras et mastac
- Amaigrissement malgré l'augmentation de l'appétit et de la soif.

A la différence de l'insuffisance pancréatique exocrine, les troubles digestifs s'observent le plus souvent par intermittence (alternance de périodes de diarrhées et de rémission) et prennent une allure pseudo-contagieuse (BOURDEAU, 1993 ; BEUGNET et PIERSON, 1997). De plus, selon la souche impliquée, *Giardia* peut affecter également les personnes en contact avec les animaux infectés (THOMPSON, 2002b).

D'autres signes peuvent être observés (ASTIAZARAN-GARCIA, 2000 ; BOURDEAU, 1993 ; LEIB et ZAJAC, 1999) :

- Douleur abdominale perceptible à la palpation

- Retards de croissance observés chez les jeunes, même en l'absence de signes cliniques
- Vomissements aigus ou chroniques pouvant se produire rarement, suite à une érosion sévère de la paroi duodénale
- Diarrhée hémorragique
- Coprophagie
- Pelage terne
- Léthargiques occasionnellement.

Il n'y a pas de syndrome fébrile associé. Les paramètres biologiques restent dans les limites des valeurs normales, même s'il y a tendance à l'éosinophilie et l'anémie. La giardiose du chien ne s'accompagne pas des signes hépatiques ou nerveux parfois décrits chez l'homme (BOURDEAU, 1993).

E) Lésions

Giardia duodenalis peut engendrer une inflammation modérée et réversible de la muqueuse duodénale et jéjunale. Les villosités sont raccourcies et amincies. Un infiltrat massif de lymphocytes et de polynucléaires neutrophiles est présent dans la *lamina propria*. Au niveau des zones d'inflammation, les entérocytes sont vacuolisés, compressés et certains sont sévèrement endommagés (KREIER, 1978).

F) Pathogénie

Les mécanismes pathogéniques de la giardiose ne sont pas encore parfaitement connus. Il est difficile d'expliquer la survenue de symptômes chez certains individus tandis que d'autres restent porteurs asymptomatiques. La maladie a sans doute une origine multifactorielle. La plupart des données proviennent d'une extrapolation de ce qui a été observé chez les humains. Des auteurs ont décrit des variations de virulence probablement liées à des variations de génotypes (BARR, 1998 ; THOMPSON *et al.*, 1993b).

1. Pathogénie de la malabsorption/maldigestion

Les trophozoïtes tapissent une grande partie de la muqueuse intestinale et provoquent (BURET *et al.*, 2002 ; LEIB et ZAJAC, 1999 ; THOMPSON *et al.*, 1993b) :

- Une diminution importante de la surface d'échange par atrophie des villosités
- Une baisse de l'activité enzymatique de l'intestin (lipase et disaccharidase)

- Une augmentation de la vitesse de remplacement des entérocytes par des cellules moins différenciées (déficiency du transport de glucose et d'acides aminés)
- Une hypersécrétion de mucus qui gêne les échanges au niveau des entérocytes
- Une infiltration lymphocytaire.

Ces phénomènes expliquent la malabsorption de vitamine B12, de fer et de folates (conduisant à l'anémie), de triglycérides, de lactose, et moins fréquemment de sucrose (BARR et BOWMAN, 1994 ; BARR, 1998).

L'atrophie des villosités et des microvillosités a été corrélée avec la déficiency enzymatique de la bordure en brosse, qui retrouve un niveau d'activité normal lors de la disparition de l'infection. De plus, il semble que des toxines produites par les trophozoïtes agissent sur les entérocytes en modifiant leur cytosquelette et en augmentant leur perméabilité (BURET *et al.*, 2002 ; THOMPSON *et al.*, 1993b).

2. Pathogénie de la diarrhée

La diarrhée observée est surtout due à des troubles de l'absorption plutôt qu'à une augmentation de la sécrétion (BOURDEAU, 1993). Elle s'explique par la desquamation des cellules épithéliales ainsi que par la perturbation des phénomènes osmotiques provoqués par la malabsorption. De plus, la réduction de la surface d'échange de la bordure en brosse altère la réabsorption des liquides et des électrolytes (KREIER, 1978 ; THOMPSON *et al.*, 1993b).

G) Immunité

Les manifestations cliniques observées sont le résultat d'une double action, celle du parasite et celle du système immunitaire.

Il existe en outre des différences importantes entre souches à propos de leur pouvoir pathogène, et entre les sujets quant à leur capacité de résister naturellement (immunité naturelle sous contrôle génétique) (BOURDOISEAU, 1993 ; LEIB et ZAJAC, 1999 ; THOMPSON *et al.*, 1993b). Les variations importantes de pathogénicité de *Giardia* chez différents hôtes peuvent s'expliquer également par le statut nutritionnel de l'hôte, la présence d'autres parasites et l'existence d'autres affections gastro-intestinales (LEIB et ZAJAC, 1999).

Les jeunes animaux sont généralement beaucoup plus sensibles que les adultes chez qui une auto-guérison peut se produire. Un système immunitaire performant est indispensable pour faire face à l'infection et développer une immunité protectrice (FAUBERT, 1996 ; BOURDEAU, 1993). La réponse immunitaire est complexe et fait intervenir des processus à la fois humoraux et cellulaires. De nombreuses études réalisées ont utilisé la souris comme modèle expérimental.

1. Immunité à médiation humorale

Les antigènes de surfaces au niveau du disque et des flagelles initialisent la réponse immunitaire à médiation humorale de l'hôte :

- Les IgM induisent la lyse des trophozoïtes par l'activation de la voie classique du complément (FAUBERT, 1996 ; RIPERT, 1996 ; WILLIAMSON *et al.*, 2000)
- Les IgA et IgG anti-*Giardia* semblent empêcher l'adhérence du parasite à la muqueuse intestinale (HEYWORTH, 1986 ; WILLIAMSON *et al.*, 2000), en masquant certains antigènes (RIPERT, 1996). Les IgA sont également des activateurs de la phagocytose des trophozoïtes par les macrophages (WILLIAMSON *et al.*, 2000).

Les anticorps atteignent l'intestin au cours de l'infection, soit par l'exsudation provoquée par l'atteinte de la paroi intestinale, soit par des transporteurs d'immunoglobuline. En effet, la sécrétion intestinale d'IgA, IgG et IgM a été démontrée dans des appareils digestifs normaux et malades. Des anticorps seraient aussi acheminés dans le tube digestif via la bile (OLSON *et al.*, 2000).

L'absence d'une réponse par des IgA à l'une des protéines heat shock de *Giardia* est associée à une infection persistante, en dépit d'une réponse IgG à ces protéines et de réponse IgA à d'autres protéines de *Giardia* (BARR, 1998). Il a été montré que la prévalence de la giardiose dans une colonie de beagles déficients en IgA était plus élevée que chez des animaux normaux (BARR, 1998). En médecine humaine, un tel déficit retrouvé chez des malades donne des formes de giardiose intractables qui persistent toute la vie (RIPERT, 1996).

Il a été récemment démontré chez le veau que le colostrum fournit une protection initiale contre la giardiose par sa teneur en IgG. L'absence d'une réponse immunitaire humorale forte et spécifique favorise une chronicité de la maladie (O'HANDLEY *et al.*, 2003).

La variation antigénique de certaines de ces protéines de surface ne semble pas suffisamment efficace pour permettre à *Giardia* d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (FAUBERT, 1996).

2. Immunité à médiation cellulaire

Les lymphocytes T sont également un pilier important de la réponse immunitaire vis à vis de *Giardia duodenalis* (SINGER et NASH, 2000). Mais les réactions immunologiques telles que l'infiltration lymphocytaire viennent compliquer le processus pathologique, occasionnant l'atrophie des villosités et la baisse d'activité disaccharidase. En effet, des souris immunodéficientes en lymphocytes T, bien que plus fortement

parasitées, présentent des tableaux lésionnels moins graves (BURET *et al.*, 2002).

Les polynucléaires neutrophiles interviennent en interférant avec l'adhérence des trophozoïtes, et en les tuant par la libération de peptides contenus dans leurs granulations (FAUBERT, 1996).

H) Diagnostic

1. Diagnostic clinique et épidémiologique

Le diagnostic de la giardiose ne peut reposer sur la seule clinique. Une suspicion doit être évoquée, en s'appuyant sur (BEUGNET et PIERSON, 1997 ; BOURDOISEAU, 1993) :

- La symptomatologie: entérite diarrhéique non hyperthermisante ou syndrome malabsorption-malassimilation caractérisé par des signes tels que stéatorrhée et diarrhée chronique intermittente de l'intestin grêle, évoluant depuis plusieurs jours à plusieurs semaines ou récidivant malgré l'utilisation d'antibiotiques
- Des éléments épidémiologiques : sujet jeune, allure d'une maladie contagieuse, animal provenant d'un élevage où des cas similaires ont été relevés.

2. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel doit être fait avec la coccidiose, avec les entérites bactériennes, généralement pyrétiques, et, chez le jeune chien, avec une insuffisance pancréatique exocrine donnant un tableau clinique tout à fait similaire.

Mais dans la grande majorité des cas la giardiose ne sera que suspectée: aussi est-il indispensable de recourir à un examen de laboratoire. Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du protozoaire dans les selles ou dans des échantillons prélevés dans le tractus intestinal (BEUGNET *et al.*, 2000a ; BOURDOISEAU, 1993).

3. Diagnostic de laboratoire

a. Observation directe

Lors de suspicion de giardiose, un vétérinaire peut faire, en premier lieu, un

examen microscopique direct avec recherche de trophozoïtes ou de kystes. Les trophozoïtes passent plus souvent dans les selles très liquides, alors que les kystes passent surtout dans les selles formées ou semi-formées (CONBOY, 1997 ; ZAJAC, 1992).

Une goutte de l'échantillon de selles est mixée avec une même quantité de solution saline dans un tube à hémolyse, puis étalée sur une lame et immédiatement examinée au grossissement x40 (BEUGNET *et al.*, 2000a). Pour une détection optimale des trophozoïtes, l'observation devrait être réalisée dans les 20 minutes après le prélèvement des selles (CONBOY, 1997). Les trophozoïtes sont aisément reconnus grâce à leur rapide mobilité et leur disque ventral (BARR et BOWMAN, 1994). L'addition de lugol tue les trophozoïtes mais augmente les chances de reconnaître leur structure interne (ZAJAC, 1992).

D'autres trophozoïtes de protozoaires flagellés peuvent être retrouvés dans des selles diarrhéiques. Ils doivent être différenciés de *Giardia*. La présence d'un flagelle avec une membrane ondulante (durant le mouvement cela donne l'apparence d'une vague sinusoïdale le long du corps du trophozoïte), une rapidité du mouvement (difficulté à l'avoir dans le champs du microscope), ou la présence de disque adhésif ventral concave permettra de reconnaître le trophozoïte de *Giardia* (CONBOY, 1997 ; BARR et BOWMAN, 1994). Exemple : *Pentatrichomonas* : un seul noyau, une membrane ondulante, absence de disque concave (BOURDEAU, 1993).

Ce procédé peut être utilisé dans le dépistage de routine mais ne constitue pas une méthode de recherche fiable (BOURDEAU, 1993). Un résultat négatif doit amener à la réalisation d'une technique d'enrichissement (ZAJAC, 1992 ; BARR et BOWMAN, 1994).

b. Coproscopie après enrichissement

Elle a pour objectif d'éliminer la majorité des débris issus de la digestion et de concentrer les éléments parasitaires dans un faible volume pour ainsi favoriser fortement leur observation. L'élimination des kystes est généralement massive, et ils sont facilement mis en évidence après enrichissement.

1) *Technique de flottation*

La technique de flottation, qui utilise un liquide de forte densité, est la plus usitée. Des liquides de flottation faciles à réaliser, tels que le sulfate de magnésium à saturation de densité 1,28 ou le sulfate de zinc à saturation de densité 1,33, conviennent (BEUGNET *et al.*, 2000a).

Il existe des kits du commerce qui fournissent le matériel et le liquide de flottation. Ils utilisent la technique classique, mais ont bien souvent des liquides peu denses

et donc une moindre sensibilité que les techniques employant du sulfate/acétate de zinc ou du sulfate de magnésium (BEUGNET, 2000). La méthode de flottation la plus employée est la technique de coproscopie par flottation en sulfate de zinc à saturation (BOURDEAU, 1993).

La méthode est simple et utilisable pour le dépistage de tous les parasites digestifs. Elle consiste à mélanger 1 g de matières fécales à 10 ml de solution dense dans un tube à hémolyse classique et à poser une lamelle sur le tube, en contact avec le liquide. Il faut préférer les tubes siliconés ou en polypropylène plutôt qu'en verre ou polystyrène aux parois desquels adhèrent les parasites (BOURDEAU, 1993). Au bout de dix minutes, les éventuels kystes de protozoaires ou œufs d'helminthes se sont collés sur la face inférieure de la lamelle. Il n'y a plus qu'à récupérer cette lamelle et à la poser sur une lame en vue d'une observation microscopique (BEUGNET *et al.*, 2000a).

Il est possible d'utiliser une centrifugeuse. Il faut alors poser la lamelle sur le tube, centrifuger, puis récupérer la lamelle (BEUGNET *et al.*, 2000a). La lecture devrait être réalisée dans les 10 minutes suivant l'enrichissement car les kystes rétrécissent et perdent leur apparence morphologique interne caractéristique, nécessaire pour les différencier des autres parasites (BARR et BOWMAN, 1994). Il a été montré que la centrifugation améliore significativement les chances d'observation des kystes de *Giardia*. Par ailleurs, en l'absence de centrifugation il n'y a pas de différence significative entre une attente de 5 minutes ou 10 minutes avant la lecture de la lamelle (ZAJAC *et al.*, 2002).

2) *Techniques de sédimentation*

Pour les selles riches en graisse, il est possible d'utiliser la méthode de sédimentation dite de Telemann-Rivas. Son principe est de diluer le prélèvement dans un solvant de densité réduite afin de concentrer les éléments parasitaires (kystes de *Giardia*), de densité supérieure, dans le culot du tube à essai (BOURDEAU, 1993 ; ZAJAC, 1992).

L'échantillon de selles est d'abord mélangé à du sérum physiologique formolé à 10 %, puis il est mélangé, tamisé et placé dans des tubes à centrifuger (10 ou 15 ml). La moitié des tubes est remplie avec ce mélange tandis que l'autre est complétée avec de l'éther (ou de l'acétate d'éthyle). Les tubes sont agités, puis mis à centrifuger. L'éther dégraisse le prélèvement. Le culot est récupéré à l'aide de l'embout d'une pipette Pasteur, puis observé au microscope entre lame et lamelle. Cette technique laisse plus de débris que la technique par flottation. Elle apparaît cependant plus efficace que la technique de flottation et tout aussi efficace que la technique de flottation-centrifugation pour la

détection des kystes de *Giardia* (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 2002).

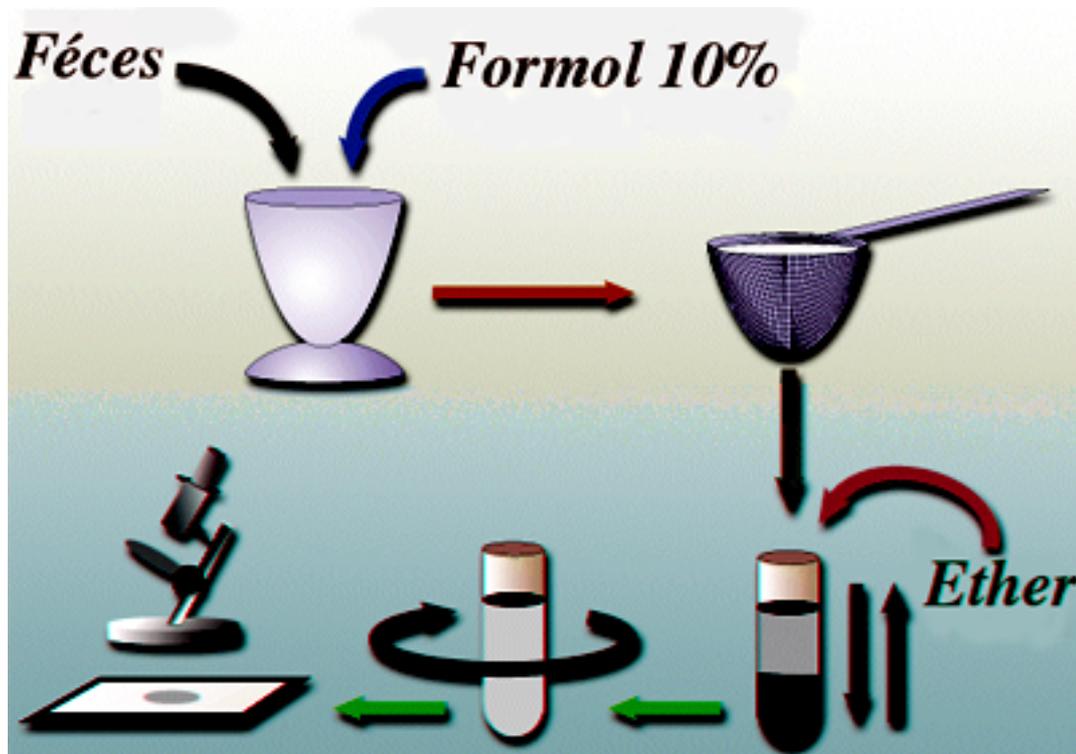


Figure 5 : *Coproscopie par sédimentation (32)*

3) Reconnaissance des kystes

Les kystes de *Giardia* sont plus ou moins arrondis, ils mesurent environ 8 x 12 μm , et sont donc peu visibles à l'objectif x10 utilisé pour les œufs d'helminthes. Ils doivent être recherchés avec l'objectif x40 avec un éclairage bien réglé (BOURDEAU, 1993).

Ils sont assez clairs, ont une coque lisse et mince, et renferment divers éléments parfois peu discernables qui correspondent à 2 à 4 noyaux et des fragments de flagelles. Occasionnellement des

trophozoïtes peuvent être trouvés (parfois entraînés dans les selles liquides) (BEUGNET *et al.*, 2000a).

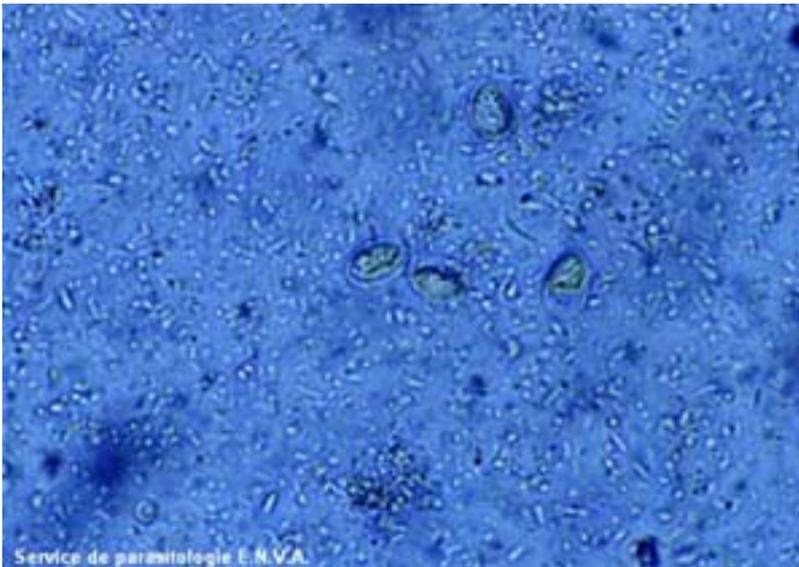


Photo 1 : *Kystes de Giardia duodenalis sans coloration (32)*



Photo 2 : *idem photo 1 (32)*

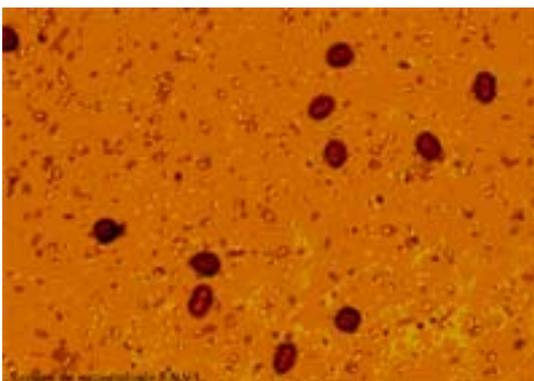


Photo 3 : *Kystes colorés au lugol (32)*

Afin de mieux les repérer, il est

possible d'utiliser des colorants se fixant dans la paroi tels que la solution iodo-iodurée ou lugol (constitution : iode sublimé 10 g, iodure de potassium 50 g, eau qsp 100 ml) (BEUGNET *et al.*, 2000a ; BOURDEAU, 1993). Leur structure interne est alors plus nette et on peut les discerner dès l'observation de la lame au faible grossissement (objectif x10). Il suffit d'ajouter une goutte au bord de la lamelle et d'observer le prélèvement à l'endroit où le colorant se répand. Ce dernier confère une teinte orangée très nette aux kystes de *Giardia*. La coloration au lugol permet de mieux distinguer les trophozoïtes éventuellement présents mais elle les immobilise (BARR et BOWMAN, 1994, BOURDEAU, 1993). Le lugol ne colore ni les ookystes coccidiens ni les sporocystes de *Sarcocystis*, et permet donc de faciliter la diagnose des kystes de *Giardia* (BEUGNET *et al.*, 2000a ; BOURDOISEAU, 1993)

d'helminthes présentes dans les selles (BEUGNET *et al.*, 2000a).

Un autre colorant utilisable, également à base d'iode et employé en médecine humaine, est le M.I.F. (Methriolate, Iode, Formol). Sa préparation nécessite de verser la solution de Mertriolate-Formol dans la solution de lugol et non l'inverse (BEUGNET, 2000).

4) *Interprétation des techniques de flottation et sédimentation*

Si chez la souris le nombre de kystes est relativement représentatif du degré de l'infection il n'en est pas de même chez les carnivores. Les signes cliniques peuvent précéder la fin de la période prépatente. L'élimination des kystes est intermittente et d'intensité très variable, un animal pouvant excréter 500 000 à 1 million de kystes par gramme de matières fécales un jour et aucun kyste deux jours plus tard. Les pics d'excrétion sont souvent espacés de 2 à 10 jours. Quelques kystes dans les matières fécales peuvent correspondre à une population de 10^5 à 10^9 trophozoïtes dans le tube digestif (DOUGLAS *et al.*, 1988. cité par BOURDEAU, 1993). Il n'y a donc pas nécessairement de relation entre l'intensité d'excrétion de kystes dans les selles et la clinique (BARR, 1998).

De plus, de nombreux anti-diarrhéiques peuvent interférer avec l'excrétion. Les résultats de l'analyse sont également étroitement liés à la technique et la qualification de travail du personnel du laboratoire (BOURDEAU, 1993).

Dans ces conditions, l'absence de kystes ou de trophozoïtes ne signifie pas que le diagnostic est négatif. Une seule coproscopie ne suffit donc pas pour exclure la giardiose. Il a été préconisé de réaliser au moins trois examens espacés de 48 heures ou de faire de multiples prélèvements dans la journée pour améliorer les résultats (THOMPSON *et al.*, 1993b). 70 % des chiens infectés peuvent être détectés avec un examen coproscopique unique, 93 % peuvent l'être avec deux (BARR et BOWMAN, 1994 ; ZAJAC *et al.*, 1992) et 3 coproscopies permettent d'obtenir une sensibilité d'environ 96% (BEUGNET *et al.*, 2000a ; BOURDOISEAU, 1993 ; THOMPSON *et al.*, 1993b ; JACOBS *et al.*, 2001).

Bien que plus sensible que l'observation directe, la coproscopie après enrichissement demande plus de temps et une disponibilité importante de la part du client si trois échantillons de selles sont nécessaires. C'est pourquoi cette technique est rarement utilisée lors d'études épidémiologiques (JACOBS *et al.*, 2001).

Les prélèvements de selles doivent être conservés à + 4 °C pour assurer une conservation des kystes d'au moins deux jours. Ils peuvent également être conservés dans une solution formolée à 10 % (BARR, 1998).

c. Examen du liquide d'aspiration duodénale

Les trophozoïtes de *Giardia* peuvent être recherchés dans le liquide d'aspiration duodénale lorsqu'une endoscopie est réalisée. La technique d'aspiration duodénale consiste à réaliser un prélèvement sous endoscopie digestive. Une faible quantité de sérum salé

(environ 15 ml) est injectée dans le tube digestif puis immédiatement réaspirée. On peut également récupérer directement le jus duodénal ou jéjunal (ROUDEBUSH, 1985). Le même type de prélèvement peut être réalisé à la faveur d'une laparotomie. Enfin l'exploration endoscopique permet aussi de rechercher les trophozoïtes dans une biopsie de la paroi digestive.

Le prélèvement est ensuite centrifugé à 150 g pendant 10 minutes puis les parasites sont recherchés dans le culot de sédimentation. (BEUGNET *et al.*, 2000a ; BOURDEAU, 1993).

Cette technique est plus sensible que la technique de flottation lorsque les chiens ont des signes cliniques de la giardiose (BARR et BOWMAN, 1994). Elle est équivalente lorsque les prélèvements proviennent de chiens asymptomatiques (ZAJAC *et al.*, 1992). Cette disparité peut s'expliquer par le fait que *Giardia duodenalis* ne colonise par nécessairement la partie duodénale de l'intestin grêle chez les chiens asymptomatiques (BARR et BOWMAN, 1994).

Cette méthode présente les inconvénients d'être plus invasive, coûteuse et longue que la technique de flottation. Son utilisation ne sera donc faite uniquement à la faveur d'une endoscopie réalisée pour des raisons autres que l'existence de signes cliniques de giardiose (BARR et BOWMAN, 1994 ; LEIB et ZAJAC, 1999 ; LEIB *et al.*, 1999).

d. Entero-test®

Historiquement utilisée en médecine humaine, cette méthode a été essayée chez le chien. Il s'agit d'une mèche de nylon (1 m 40 de longueur, ou 90 cm pour le modèle pédiatrique adapté aux animaux de petit format) emballée dans une capsule de gélatine. Tandis que l'extrémité est fixée à la mâchoire de l'animal par une bande, la capsule est déglutie avec un peu d'eau. Elle est entraînée par le péristaltisme et la mèche se déroule dans le tube digestif. Après quatre heures environ la mèche est récupérée délicatement et la portion duodénale repérée grâce à un papier indicateur de pH (zone à pH alcalin après la zone à pH acide de l'estomac). On recherche les trophozoïtes dans le liquide de la portion duodénale, par examen au microscope à contraste de phase ou optique après coloration au lugol (BOURDEAU, 1993).

Cette méthode n'a pas fourni les résultats escomptés dans une étude où aucun des 18 chiens infectés par *Giardia duodenalis* n'a été trouvé positif. En raison de son manque de sensibilité, sa difficulté d'utilisation et les risques de rupture de la mèche de nylon, ce test n'est pas recommandé (BARR *et al.*, 1992 ; BARR et BOWMAN, 1994).

e. Techniques immunologiques

1) *Immunofluorescence directe*

Cette technique utilise un anticorps monoclonal fluorescent pour détecter les kystes de *Giardia* dans les selles. Chez les humains elle est très sensible (100%) et très spécifique (99,8%) (ZIMMERMAN, 1995 ; BARR, 1998). Chez les bovins et les ovins,

elle s'est avérée plus sensible que la méthode de flottation, spécialement quand le nombre de kystes est faible. On peut espérer des résultats similaires sur les selles des petits animaux. Un microscope à fluorescence est nécessaire, ce qui limite ce test aux laboratoires de diagnostic. Les selles doivent être prélevées fraîches et conservées dès que possible dans du formol 10% ou de l'acétate de sodium - acide acétique - formol (SAF) (BARR et BOWMAN, 1994 ; BEUGNET *et al.*, 2000a).

Sur les selles, l'immunofluorescence ne semble pas être une technique amenée à remplacer les méthodes de concentration habituellement utilisées dans les laboratoires de parasitologie. Elle peut cependant représenter un moyen diagnostique supplémentaire intéressant lorsque les méthodes conventionnelles restent négatives (BAIXENCH *et al.*, 1993).

2) ELISA : copro-antigène

De nombreux tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ont été développés et commercialisés en médecine humaine pour diagnostiquer le giardiose. En utilisant des anticorps monoclonaux, ils mettent en évidence un antigène spécifique de *Giardia* de 65 kDa (GSA 65). Cet antigène est une glycoprotéine produite précocement par les trophozoïtes lors de l'enkystement, et retrouvé dans les matières fécales des individus infectés (BEUGNET *et al.*, 2000a ; BOONE *et al.*, 1999 ; SCHIEVEN, 1990). La GSA 65 est produite en grande quantité par toutes les espèces identifiées de *Giardia*. Son excrétion se fait alors de manière continue dans les selles, contrairement aux kystes qui y sont retrouvés par intermittence (THOMPSON *et al.*, 1999). La GSA 65 possède les qualités nécessaires à un antigène fécal détectable (ROSOFF, 1989):

- Spécifique de *Giardia duodenalis*
- Stable dans le tractus gastro-intestinal de l'hôte
- Présent en quantités immunologiquement détectables
- Stable dans les fixateurs de laboratoires standards (SAF, formol 10%)
- Antigène de *Giardia duodenalis* probablement majoritaire dans les selles.

Une étude parue en 1999 (BOONE *et al.*) a montré que la protéine détectée par le test ELISA ProspectT® *Giardia* ne faisait pas 65 kDa mais 26 kDa nommée CPW1 (protéine de paroi du kyste 1). Cette protéine de paroi du kyste, synthétisée et libérée par les trophozoïtes au cours de leur enkystement, serait capable de se lier avec une autre protéine CPW2, non reconnue par le test. Cet hétérodimère de 65kDa serait à l'origine de la confusion avec la GSA 65. Cela ne change en rien les qualités attribuées à la GSA 65 qui peuvent l'être à la CPW1. Dans les articles parus après cette étude, on continue à parler de GSA 65 de même que dans la notice du test ELISA ProspectT® *Giardia*.

Les selles doivent être fraîches ou réfrigérées depuis vingt quatre à quarante-huit heures (BEUGNET *et al.*, 2000a). La conservation dans du formol ou la congélation à -20°C sont également possibles (BARR et BOWMAN, 1994).

(a) Utilisation chez l'humain (ROSOFF *et al.*, 1989)

Sur des échantillons de selles humaines, le test ProspectT® *Giardia* est reconnu pour avoir une spécificité de 100%, une sensibilité de 96% ainsi qu'une détection de cas de giardiose environ 30% supérieure à la technique de flottation au sulfate de zinc (BARR et BOWMAN, 1994 ; ROCHA, 1999). Une étude a même conclu à une spécificité de 99,2% et une sensibilité de 100% (SCHIEVEN et HUSSAIN, 1990). A l'opposé, une étude a conclu à la nécessité de tester deux prélèvements différents chez le même patient afin d'obtenir une sensibilité supérieure à 90% (HANSON et CARTWRIGHT, 2001).

Après dilution du milieu de fixation contenant les selles dans le tampon de dilution du kit ELISA, le pH de l'ensemble doit être supérieur à 7. A ce pH, les interactions antigène/anticorps nécessaires à l'apparition d'un résultat positif peuvent se produire. Les fixateurs SAF et Formol 10% permettent l'obtention d'un tel pH et sont donc compatibles avec l'analyse immunologique. De plus il a été montré que l'utilisation de ces fixateurs n'altérerait pas la sensibilité du test.

Il a été observé une relation inverse entre le nombre de kystes et de trophozoïtes excrétés, et la densité colorimétrique observée lors du test ELISA.

Les kystes de *Giardia* dans des selles non traitées dégénèrent rapidement lorsqu'elles sont stockées à 4°C pendant quelques jours, entraînant également une baisse de GSA 65 retrouvée dans les selles. Par contre, lors de la conservation des selles à 4°C mais préalablement traitées par un fixateur, le taux de GSA 65 retrouvé dans les selles augmente.

Par ailleurs, il semble que la quantité de GSA 65 soit excrétée de manière plus importante dans les selles de patients symptomatiques que chez les patients asymptomatiques.

La GSA 65 est une protéine stable pendant une longue période dans les selles traitées par un fixateur. Des selles positives à *Giardia*, fixées dans du formol 10% et conservés à température ambiante, sont encore positives 6 mois plus tard. De même des selles non traitées mais conservées à -20°C restent positives pendant au moins une année.

Les anticorps anti-GSA 65 n'ont jamais montré de réaction croisée avec les autres parasites intestinaux (THOMPSON *et al.*, 1999).

Ce test ELISA ne se substitue pas à la coproscopie dont la réalisation permet de détecter n'importe quel autre parasite intestinal. Mais la réalisation du test ELISA permet un diagnostic très fiable de l'infection à *Giardia*, une cause fréquente de diarrhée. Il peut détecter au moins 30% plus de cas que par coproscopie (ROSOFF *et al.*, 1989).

(b) Utilisation chez le chien

Dans une étude préliminaire du test ProspectT® *Giardia* en 1992, LEIB *et al.* ont observé des résultats similaires à la technique de flottation dans 84% des selles de chiens examinées. Cependant, dans 15% des cas, l'ELISA était positif alors que la flottation était négative. Lors d'une seconde observation par flottation sur ces 15%, *Giardia* a finalement été observé dans la moitié des cas. Le 1% des cas restants était positif par flottation mais négatif par ELISA.

Par contre, une autre étude réalisée également en 1992 avec le même test avait trouvé 14% de négatif avec ELISA alors qu'ils étaient positifs avec la flottation. Dans cette même étude, 10% étaient à l'inverse positifs par ELISA et négatifs par flottation. Les résultats indiquaient également une faible sensibilité du test ELISA chez les chiens asymptomatiques (BARR *et al.*, 1992).

Ces deux études précisent ainsi que des faux négatifs peuvent se produire avec l'ELISA et qu'un résultat négatif ne peut donc pas exclure une giardiose. Des résultats positifs à l'ELISA qui seraient faussement négatif par flottation sont également possibles.

Un autre test ELISA, le test CELISA® mettant également en évidence GSA 65, a montré des résultats décevants chez le chien avec une sensibilité de 55-64% alors qu'elle était de 100% dans cette même étude sur des échantillons humains. Par contre aucune réaction croisée avec d'autres parasites n'a été observée et la spécificité était de 95% (HOPKINS *et al.*, 1993).

D'autres études sont donc nécessaires pour affiner la sensibilité et la spécificité du test ELISA fécal chez le chien (LEIB et ZAJAC, 1999).

Une étude récente a montré que la réalisation du test ELISA ProspectT® *Giardia* donne une sensibilité supérieure à 90%, semblable à celles obtenues par la réalisation de deux ou trois enrichissements par la technique de flottation. Cette dernière technique n'ayant une sensibilité que de 77% si elle n'est réalisée qu'une seule fois. Les résultats positifs par ELISA et négatifs par coproscopie ne sont donc pas de faux positifs. La spécificité du test est ainsi probablement très bonne chez le chien (DECOCK *et al.*, 2003).

f. Techniques de biologie moléculaire : copro-ADN

L'application de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a permis d'amplifier et de détecter l'ADN de *Giardia* dans les selles d'humains. Les premières études ont utilisé le gène de la giardine comme cible pour la PCR. Une faible sensibilité avait alors été obtenue avec cette technique, probablement en raison de la présence d'une seule copie du gène. L'amplification de la région ITS (inter-transcripteur spacing) des gènes de l'ARN ribosomal de *Giardia* a été choisie par une étude récente et a donné d'excellents résultats.

La méthode s'est révélée être plus spécifique et plus sensible que les méthodes microscopiques et immunologiques. Son utilisation s'avère être rapide et fiable pour la

détection de *Giardia* dans les selles d'humains et pourrait être utilisée en routine (GHOSH *et al.*, 2000). Une étude similaire réalisée chez le chat a obtenu des résultats avec une prévalence de 80% par la PCR alors qu'elle n'était que de 5% par microscopie après flottation (MCGLADE *et al.*, 2003). L'utilisation de selles conservées dans du formol semble diminuer la sensibilité de la technique (SMITS et HARTSKEERL, 1995). Cette technique n'est cependant pas développée pour le diagnostic de routine et reste utilisée pour la recherche.

g. Autres méthodes

Chez l'homme, des méthodes immunologiques (utilisant notamment la technique ELISA) permettant de détecter les anticorps chez les patients ont été mises au point. Leur fiabilité fait encore l'objet de controverses. La recherche des IgG ne paraît pas très intéressante car elle ne permet pas de différencier les infections actives des traces sérologiques. Celle des IgM fournit de meilleures informations (disparition 2 à 3 semaines après le traitement) (BOURDEAU, 1993).

D'autres méthodes telles que des techniques d'immunoélectrophorèse (lapins immunisés vis à vis des kystes), de fixation du complément (positif au 1/10) ou bien encore des méthodes immunochromatographiques ont été mises au point en médecine humaine pour détecter des antigènes de *Giardia* (BOURDEAU, 1993 ; GARCIA et SHIMIZU, 2000).

4. Conclusion

L'utilisation de techniques spécifiques permettent de révéler la présence de kystes ou de trophozoïtes dans le tube digestif. La clinique et les examens paracliniques ne permettent pas à eux seuls de poser un diagnostic de certitude. La giardiose reste sous-diagnostiquée pour différentes raisons :

- Giardiose non-inclue dans le diagnostic différentiel
- Non-reconnaissance de l'organisme au microscope
- Méthode d'analyse des selles inappropriée
- Excrétion intermittente du parasite dans les selles.

I) Traitement

Le traitement doit être mis en œuvre dans tous les cas de giardiose, qu'il y ait ou non des symptômes associés. En effet:

- Il n'existe pas de rapport entre le niveau d'élimination des kystes et le risque de maladie
- Les animaux sont sources pour leurs congénères

- Certaines souches de *Giardia duodenalis* observées chez les carnivores sont zoonotiques (THOMPSON, 2002b).

Aucun médicament utilisé pour traiter la giardiose chez le chien n'a d'AMM pour cette indication (BARR, 1998). En référence au décret n° 2003-138 (« cascade hors AMM »), un certain nombre de médicaments sont utilisables à cet effet.

1. Quinacrine

Elle est active à la dose de 6,6 mg/kg deux fois par jour pendant 5 jours chez le chien. Au quart de cette dose l'efficacité clinique persiste mais l'excrétion des kystes n'est pas stoppée (BOURDEAU, 1993). A forte dose (9 mg/kg), elle est efficace à 100% mais est dans 50% des cas à l'origine de vomissements, anorexie, abattement, fièvre (ces effets secondaires disparaissent en 2-3 jours avec l'arrêt du traitement). Elle est contre-indiquée chez la femelle gestante (BARR, 1998).

Une étude réalisée en 1992 a montré que des chiens traités avec du métronidazole ou de la quinacrine ont tous été observés positifs à *Giardia* au moins une fois après le traitement. Cela peut être dû soit au fait que le traitement ne supprime pas totalement le parasite, laissant un niveau résiduel susceptible de se redévelopper, soit à l'absence de la mise en place d'une immunité après une première infection (ZAJAC *et al.*, 1992).

2. 5-nitro-imidazolés

a. Ipronidazole

Il a été utilisé avec succès chez le chien en chenil. Il est administré dans l'eau de boisson (125 mg/L) pendant 7 jours. On renouvelle le produit tous les jours. Peu d'études ont été réalisées sur cette molécule. Elle n'est pas commercialisée en France (BOURDEAU, 1993).

b. Furazolidone

A la posologie de 4mg/kg deux fois par jour pendant 5 à 7 jours. Il n'a pas été étudié chez le chien. Il semble moins efficace que le métronidazole. Il est contre-indiqué chez la femelle (BOURDEAU, 1993 ; BARR, 1998)

c. Métronidazole

Ce composé est utilisé depuis de nombreuses années en médecine humaine dans le traitement des infections par les protozoaires flagellés (trichomonose et giardiose). La forme orale du métronidazole (Flagyl® en médecine humaine et Stomorgyl® [en association avec de la spiramycine] en médecine vétérinaire) a été beaucoup utilisée ces trente dernières années pour traiter la giardiose du chien et du chat. Le métronidazole est administré à la posologie de 20 mg/kg *per os* deux fois par jour pendant dix jours (BEUGNET *et al.*, 2000a). Il entraîne une amélioration des symptômes et l'arrêt de

l'excrétion des kystes (BOURDEAU, 1993). Certains essais ont cependant conclu à une

Dans l'étude de DECOCK (2002) contrôlée par coproscopie et ELISA, il a été constaté une efficacité maximale de 50% au 8^{ème} jour après la dernière administration.

4. Association fébantel praziquantel et pyrantel

Il existe une différence entre les comprimés américains et européens concernant la proportion de chaque constituant. L'utilisation 5 jours de suite des comprimés américains contenant 68 mg de praziquantel, 68 mg de pyrantel et 340 mg de febantel utilisés à la posologie commerciale, s'est révélée efficace chez 73% des chiens (11 sur 15) naturellement infectés. Les chiens étaient de plus lavés après la dernière administration et déplacés dans des cages propres. Au 24^{ème} jour après le traitement les chiens étaient toujours négatifs à la coproscopie et l'ELISA. Le même protocole sans lavages ni changement d'environnement ne stérilisait pas les chiens. Aucun effet secondaire n'a été constaté (PAYNE *et al.*, 2002). L'utilisation de comprimés de fabrication européenne contenant 50 mg de praziquantel, 50 mg de pyrantel et 150 mg de febantel, sans lavages associés, s'est révélée efficace dans 100% des cas lors de leur utilisation pendant 2 ou 3 jours de suite à la posologie de l'AMM, chez des chiens naturellement infectés (GIANGASPERO *et al.*, 2002). L'étude de DECOCK, contrôlée par coproscopie et ELISA et réalisée dans les mêmes conditions que GIANGASPERO a obtenu une efficacité maximale de 50% le lendemain de l'arrêt du traitement.

5. Conclusion

Aucun médicament n'a prouvé une efficacité totale contre *Giardia*. On ne sait pas si le parasite persiste dans le tube digestif ou si il y a une recontamination. Il est possible que ces molécules n'éliminent pas les parasites mais diminuent seulement la production de kystes pendant un temps. L'association de la technique ELISA à la coproscopie semble démontrer une moins grande efficacité des différents traitements.

On ne sait pas si les animaux traités peuvent toujours être source d'infection par la suite. Très certainement, l'auto-infection existe en raison de kystes viables présents dans les matières fécales et qui se retrouvent sur les poils du chien ou qui persistent dans un environnement favorable. Puisque la période prépatente de *Giardia* est très courte, il est possible pour un chien d'être recontaminé et devenir excréteur à nouveau 5 jours après le dernier traitement (BARR, 1998). Le lavage et le changement d'environnement semblent fondamentaux pour prévenir la réapparition de l'excrétion (PAYNE *et al.*, 2002).

J) Prophylaxie

1. sanitaire

La prophylaxie de la giardiose des carnivores est délicate dans la mesure où toutes les conditions de contamination ne sont pas connues. Compte tenu de la contamination fécale, il conviendra d'insister sur les mesures sanitaires (BOURDOISEAU, 2000):

- Concevoir des locaux en tenant compte des contaminations et des techniques de nettoyage ; isoler les locaux à risque
- Préférer des sols dont la nature empêche la persistance d'eau, de matières fécales et de formes de dissémination de parasites
- Respecter le principe de marche en avant
- Respecter une quarantaine avant l'introduction d'un animal de l'extérieur
- Définir un protocole strict de nettoyage : garder les cages sèches et propres par un ramassage et une élimination fr

supplémentaires sont cependant encore nécessaires (OLSON *et al.*, 2000 ; BEUGNET *et al.*, 2000a).

Ce vaccin est donc utile dans les populations à risque (chenils expérimentaux, animaux de l'armée, élevages...), dans les zones d'endémie et pour les chiens exposés à des recontaminations fréquentes (OLSON *et al.*, 2002). Ce vaccin n'est cependant pas commercialisé en France.

K) Autres espèces animales

Le genre *Giardia* est retrouvé chez un grand nombre d'espèces animales. *Giardia agilis* affecte les batraciens, *Giardia muris* affecte les rongeurs, *Giardia psittaci* et *Giardia ardae* affectent les oiseaux, *Giardia duodenalis* affecte de nombreux mammifères et oiseaux.

Chez toutes les espèces, les symptômes sont semblables à ceux observés chez le chien. *Giardia* peut ainsi être responsable de pertes économiques importantes chez les animaux de rente.

L) Santé publique vétérinaire

1. potentiel zoonotique

Il est prouvé que des animaux cliniquement sains peuvent excréter des kystes. Il a alors été suggéré que des animaux infectés asymptomatiques pourraient servir de porteurs potentiels d'une infection chez des humains et autres animaux, par l'intermédiaire des selles, de l'eau ou de la nourriture contaminés (DENG et CLIVER, 1999 ; SLIFKO *et al.*, 2000).

Une étude portant sur l'analyse des génotypes de *Giardia* retrouvés chez des chiens et des humains d'une communauté Aborigène vivants sur le même site, a montré que la transmission entre chiens et humains ne se produisait pas couramment ; presque tous les chiens étaient porteurs du génotype spécifique de leur espèce (HOPKINS *et al.*, 1997). Au contraire, les chiens vivants en zone urbaine sont susceptibles d'être infectés par les génotypes zoonotiques appartenant aux assemblages A et B (THOMPSON, 2000).

Cela s'explique par le fait que la compétition est plus forte entre les souches de *Giardia* lorsque le taux d'infection est plus important. Dans cette communauté Aborigène la prévalence de la maladie étant plus forte qu'en zone urbaine, les souches les plus adaptées à l'hôte prennent l'avantage (THOMPSON, 2000).

Les assemblages A et B sont largement répandus dans la nature. Ils peuvent être retrouvés chez les humains, le bétail, les animaux de compagnie, certains animaux sauvages, ainsi que dans l'environnement (VAN KEULEN, 2002).

Le plus grand risque zoonotique devrait provenir des souches de *Giardia* appartenant à l'assemblage A, et plus particulièrement ceux appartenant au groupe A-1, et dans une moindre mesure aux souches appartenant à l'assemblage B. Les génotypes

apparaissant adaptés à leur hôte, restreints au bétail, chien, chat et rongeurs, n'ont jamais été retrouvés chez les humains et ne semblent pas représenter un risque de santé publique (THOMPSON, 2000). Mais lorsque l'on considère le potentiel zoonotique, le fait de trouver des génotypes similaires chez différentes espèces d'hôtes ne permet pas de conclure à la certitude d'une transmission zoonotique (THOMPSON, 2000).

Les animaux de compagnie peuvent donc être considérés comme source de contamination. Les enfants en bas âge et les individus atteints du HIV sont particulièrement à risque. Il convient donc de conseiller aux propriétaires d'animaux de prendre certaines mesures pour éviter de se contaminer (SPAIN *et al.*, 2001) :

- Se laver les mains après chaque contact avec l'animal ou ses selles
- Laver régulièrement les animaux pour débarrasser leur pelage d'éventuels éléments parasitaires (ROBERTSON *et al.*, 2000).

Il est cependant probable que les humains soient le principal réservoir de la giardiose humaine. Il est également probable que la transmission d'homme à homme soit beaucoup plus importante que la transmission zoonotique (ROBERTSON *et al.*, 2000).

Cependant, tous les animaux, domestiques ou sauvages, doivent être considérés comme des réservoirs potentiels de la maladie chez l'homme, sans que cela ait été prouvé pour autant (THOMPSON, 2000).

2. La giardiose chez l'homme (GENTILINI, 1993)

L'homme se contamine en ingérant des kystes avec l'eau de boisson, les aliments crus ou à la faveur des « mains sales ». La transmission semble souvent directe d'homme à homme et les mouches peuvent véhiculer passivement des kystes à distance. La giardiose se voit à tout âge mais surtout chez l'enfant. Elle est cosmopolite et c'est la maladie transmise par l'eau la plus fréquemment diagnostiquée.

Chez l'homme, la giardiose à *Giardia duodenalis*, engendre des manifestations cliniques extrêmement variables. C'est la caractéristique du tableau clinique des infections à *Giardia*, car la symptomatologie observée découle d'un ensemble de facteurs qui interagissent (statut immunitaire, statut nutritionnel, infections concomitantes, virulence et pathogénicité de la souche de *Giardia* responsable).

Il existe de nombreuses formes asymptomatiques au cours desquelles la découverte du parasite est fortuite. La plupart des infections à *Giardia* restent latentes. Les formes à manifestation digestives de type colite sont les plus fréquentes, se traduisant par une diarrhée subaiguë ou chronique avec des selles fréquentes, liquides ou pâteuses, jaunâtres. Parfois, le début de la maladie est brutal évoquant une gastro-entérite aiguë : anorexie, nausées, malaise abdominal, diarrhée aqueuse, température normale.

Il peut-être observé une perte de poids, des réactions d'hypersensibilité. A côté de cette forme diarrhéique pouvant persister des mois ou des années, rebelle à tous les traitements symptomatiques, d'autres formes, moins évocatrices, sont observables: troubles hépato-biliaires avec des douleurs pseudo-vésiculaires, céphalées, épigastralgies pseudo-ulcéreuses, stéatorrhée, troubles neuro-végétatifs, syndromes fébriles. *Giardia* a également été impliqué dans des réactions d'allergie alimentaire, des synovites et des arthrites (OLSON *et al.*, 2000).

Chez l'enfant les signes gastro-intestinaux sont constants, plus marqués que chez l'adulte et les troubles nerveux sont fréquents (instabilité, sommeil agité avec terreur nocturne, baisse de l'attention). Les enfants de moins de 10 ans semblent être la cible la plus touchée, en particulier dans les pays en voie de développement.

Il existerait un lien entre la symptomatologie et le génotype de *Giardia* retrouvé. L'assemblage A serait impliqué dans des diarrhées intermittentes, alors que l'assemblage B serait impliqué dans des diarrhées de type persistantes (HOMAN, 2001). L'assemblage B serait plus souvent retrouvé chez les enfants asymptomatiques que l'assemblage A (READ *et al.*, 2002).

PARTIE EXPERIMENTALE

Les objectifs de cette expérimentation étaient de :

- Comparer la coproscopie par sédimentation et le test ELISA ProspectT® *Giardia* pour le diagnostic de la giardiose chez le chien.
- Etudier la conservation de la positivité des selles dans le temps à température ambiante, pour la coproscopie et pour l'ELISA.

I. Matériel et méthodes

A) Les chiens

Les selles provenaient de chiens de particuliers ou d'élevages adressées par un vétérinaire. Des élevages ont également été contactés pour participer à l'étude.

Les selles ont été envoyées au laboratoire de parasitologie de l'ENVA et analysées dans les 48h après leur prélèvement par une méthode de sédimentation (formol-ether). Elles ont été prélevées dans des pots sans conservateur.

Nous avons ainsi obtenu:

- 38 chiens positifs (au moins un kyste observé).
- 34 chiens négatifs appartenant à des élevages positifs ou suspects (aucun kyste observé).

Les échantillons négatifs sélectionnés ont été congelés à -20°C le jour de leur lecture.

Chaque prélèvement positif et observé dans les 48h a été séparé en 4 tubes :

- Le tube J1 correspondant au jour de lecture et congelé le jour même à -20°C .
- Le tube J4 correspondant au quatrième jour après la lecture, conservé à $+20^{\circ}\text{C}$.
- Le tube J8 correspondant au huitième jour après la lecture, conservé à $+20^{\circ}\text{C}$.
- Le tube sédimentation, conservé à $+20^{\circ}\text{C}$.

Les tubes J4 et J8 ont été à leur tour congelés à -20°C , respectivement au quatrième jour et au huitième jour après la lecture.

Le tube sédimentation a été utilisé pour une nouvelle coproscopie par sédimentation à J4 ou J8 selon les prélèvements.

Tous les prélèvements J1, J4 et J8 congelés à -20°C ont ensuite été testés par le test ELISA ProspectT® *Giardia* (Alexon-Trend).

B) Etude des selles

1. Coproscopie par sédimentation (Telemann-Rivas)

La recherche de selles de chiens positives à la giardiose a été réalisée à l'aide de cette technique. La coproscopie par sédimentation est recommandée pour la recherche des kystes de *Giardia* et permet de dégraisser les selles.

Détail du protocole :

1. Mettre un peu de selles dans l'éprouvette (environ 0,5 grammes)
2. Ajouter 10 ml de formol à 10%
3. Mélanger
4. Mettre un tamis sur un bécher et ajouter deux épaisseurs de gaze sur le tamis
5. Verser dans le tamis
6. Verser 7 ml du liquide filtré dans une petite éprouvette
7. Ajouter dans 3 ml d'éther (compléter à 10 ml)
8. Bien agiter en secouant énergiquement l'éprouvette fermée
9. Verser dans un tube
10. Centrifuger 5 minutes à 500 g
11. Mettre une goutte du culot entre lame et lamelle et lire à l'objectif x 40 pour rechercher les kystes de *Giardia*.

Les lames ont été lues par un technicien expérimenté et moi-même.

La coproscopie est positive à partir du moment où un kyste est observé sur la lame.

2. Test ELISA ProspectT® *Giardia* Microplate Assay

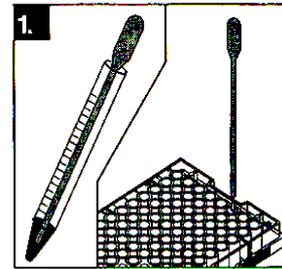
Les échantillons de selles dilués sont déposés dans les puits d'une microplaque, dans lesquels sont fixés les anticorps anti-GSA 65. Si la GSA 65 est présente, elle se fixe aux anticorps. Après plusieurs lavages, un anticorps monoclonal anti-GSA sur lequel est conjugué une enzyme peroxydase est ajouté dans chaque puit. Les puits sont mis à incuber. Ils sont ensuite lavés afin d'éliminer l'excès de conjugué. Le substrat de l'enzyme est finalement ajouté. La réaction colorée jaune se produit alors et peut être lue visuellement ou au spectrophotomètre.

Détail du protocole :

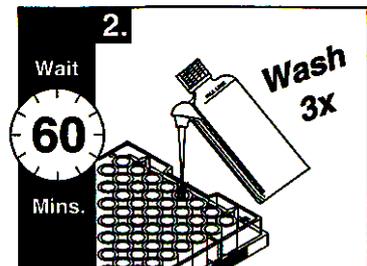
Préparation de chaque échantillon :

Dans un tube à dilution, mélanger une quantité de selles équivalente au contenu d'une anse de platine dans 1 mL de solution de dilution (Specimen dilution Buffer). Agiter

1. Ajouter 4 gouttes de contrôle négatif dans le puit 1
2. Ajouter 4 gouttes de contrôle positif dans le puit 2
3. Ajouter 200 μ L de chaque échantillon dilué dans un puit



4. Incubation à température ambiante pendant 60 min.
5. Réaliser 3 lavages

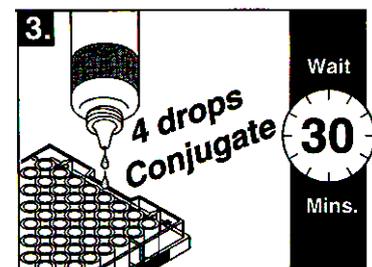


Réalisation du lavage des puits :

Vider tous les puits en retournant la plaque. Laver en remplissant complètement chaque puit avec 400 μ L/puit environ du tampon de lavage (Wash Buffer). Vider à nouveau tous les puits en retournant la plaque après chaque lavage. Après le dernier lavage, vider le contenu et frapper sur du papier absorbant propre. Retirer le plus possible le tampon de lavage mais sans jamais laisser le puit devenir sec

Il faut prendre soin de ne pas contaminer les puits entre eux soit lors du retournement de la plaque, soit lors du remplissage avec le tampon. Pour empêcher les contaminations efficacement il est possible d'aspirer les puits plutôt que de les retourner.

6. Ajouter 4 gouttes d'enzyme conjuguée (Enzyme Conjugate) dans chaque puit
7. Incuber 30 minutes à température ambiante



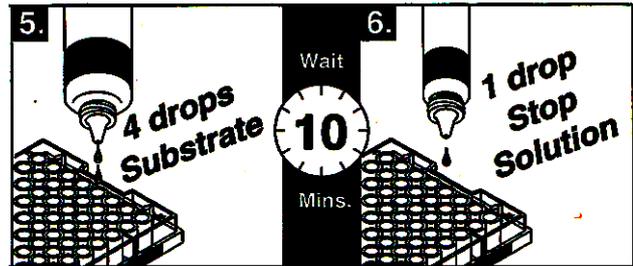
8. Réaliser 5 lavages



9. Ajouter 4 gouttes de substrat coloré (Color Substrate) dans chaque puit

10. Incuber 10 minutes à température ambiante

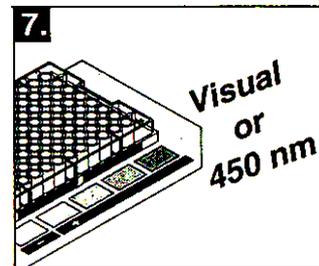
11. Ajouter 1 goutte de solution d'arrêt (Stop Solution) dans chaque puit



12. Afin d'arrêter réellement la réaction, il faut placer la plaque sur un agitateur de plaque ELISA ou la taper doucement jusqu'à ce que la couleur jaune soit uniforme.

Lecture de la plaque :

Elle doit être lue dans les 10 minutes après l'ajout de la solution d'arrêt. On peut lire à l'œil nu ou au spectrophotomètre à 450 nm.



Figures 6 : Protocole ELISA

Interprétation des résultats visuels :

Elle se fait à l'œil nu en comparant la couleur des puits à un panel de couleurs fourni par le fabricant, allant de 0 à 4+. Le témoin négatif doit correspondre au 0 et le témoin positif doit correspondre au moins au 2+.



Interprétation des résultats spectrophotométriques :

La densité optique (DO) du contrôle négatif doit être inférieure à 0.100.

La DO du contrôle positif doit être supérieure à 0.300.

Il faut ensuite soustraire la DO du contrôle négatif à toute la plaque. On annule ainsi le bruit de fond.

Après cette soustraction, le résultat d'un échantillon est positif si sa DO est supérieure à 0.05. Le résultat est négatif si sa DO est inférieure à 0.05.

C) Analyse statistique des résultats

Afin de comparer et interpréter les résultats obtenus, nous avons utilisé le test du χ^2 . Celui-ci permet de comparer les résultats obtenus à ceux attendus dans l'hypothèse ou il n'y aurait pas de différence entre ces résultats (hypothèse nulle). Les résultats ont été considérés comme significativement différents quand le risque α était inférieur ou égal à 5%. Les χ^2 ont été calculés avec le tableur Excel de Microsoft Office 2000 et nous avons utilisé la table du χ^2 (TOMA *et al.*, 1997).

II Résultats

Lors de cette étude, il a été obtenu 38 coproscopies par sédimentation qui étaient positives à *Giardia*.

- Les échantillons positifs ont de nouveau été testés par coproscopie 4 ou 8 jours après la première lecture
- Les selles positives ont été divisées en 2 ou 3 échantillons congelés à différentes échéances puis testées par ELISA. Il a ainsi été réalisé 107 ELISA sur les selles positives.

Les 34 selles négatives à la coproscopie par sédimentation, issues d'élevages suspects ou contaminés par la giardiose ont également été testées par ELISA.

A) Résultats des échantillons positifs

Les résultats sont présentés dans le tableau 1 en positif ou négatif pour le test ELISA. Les résultats en DO sont présentés en annexe 1, 2 et 3.

Tableau 1 : Résultats des coproscopies et ELISA réalisés sur les coproscopies positives

Echantillons	Coproscopie par sédimentation			ELISA ProspectT® <i>Giardia</i>		
	J1	J4	J8 ou +	J1	J4	J8 ou +
1	+	NE	-	+	+	+
2	+	NE	-	+	+	+
3	+	NE	+	+	NE	+
4	+	NE	J21 :-	+	+	J21 : +
5	+	+	NE	+	+	+
6	+	+	NE	+	+	+
7	+	+	NE	+	+	+
8	+	+	NE	+	+	+
9	+	+	NE	+	+	+
10	+	+	NE	+	+	+
11	+	+	NE	+	+	+
12	+	+	NE	+	+	+
13	+	NE	-	+	+	+
14	+	NE	-	+	+	+
15	+	NE	-	+	+	+
16	+	NE	-	+	+	+
17	+	NE	-	+	+	+
18	+	NE	-	+	-	+
19	+	NE	-	+	+	+
20	+	NE	-	+	+	+
21	+	NE	-	+	+	+
22	+	NE	-	+	+	+
23	+	NE	-	+	+	+
24	+	NE	-	+	+	+
25	+	NE	-	+	+	+
26	+	NE	-	+	+	+
27	+	NE	-	+	+	+
28	+	NE	-	+	+	+
29	+	NE	-	+	+	+
30	+	+	NE	+	+	NE
31	+	+	NE	+	+	NE
32	+	+	NE	+	+	NE
33	+	+	NE	+	+	NE
34	+	+	NE	+	+	NE
35	+	D	NE	-	-	NE
36	+	D	NE	-	-	NE
37	+	NE	-	+	+	+
38	+	NE	D	+	+	+

NE= non effectué

D= kystes dégénérés

B) Résultats des échantillons négatifs

Les résultats sont présentés dans le tableau 2 en positif ou négatif pour le test ELISA. Les résultats en DO sont présentés en annexe 3 et 4.

Tableau 2 : Résultats des ELISA réalisés sur les coproscopies négatives

Echantillons	Coproscopie par sédimentation	ELISA ProspectT® <i>Giardia</i>
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	+
5	-	-
6	-	+
7	-	-
8	-	-
9	-	+
10	-	-
11	-	-
12	-	+
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	+
18	-	+
19	-	+
20	-	+
21	-	+
22	-	+
23	-	-
24	-	-
25	-	+
26	-	+
27	-	-
28	-	+
29	-	+
30	-	-
31	-	+
32	-	+
33	-	+
34	-	+

C) Analyse des résultats

1. Synthèse

Un échantillon est considéré comme positif si la coproscopie ou l'ELISA sont positifs.

Un échantillon est considéré comme négatif si la coproscopie et l'ELISA sont négatifs.

Tableau 3 : Synthèse des résultats obtenus

Echantillons	Coproscopie par sédimentation						ELISA ProspectT® <i>Giardia</i>					
	J1		J4		J8 ou +		J1		J4		J8 ou +	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Positifs par coproscopie à J1	38	0	15	0	2	21	36	2	34	3	31	0
Négatifs par coproscopie à J1	0	34	NE	NE	NE	NE	18	16	NE	NE	NE	NE

NE= non effectué

Sur l'ensemble des 72 échantillons :

- La coproscopie et l'ELISA sont en accord sur 36 échantillons positifs et sur 16 échantillons négatifs
- La coproscopie a détecté 2 échantillons positifs non détectés par l'ELISA
- L'ELISA a détecté 18 échantillons positifs non détectés par la coproscopie
- La coproscopie a détecté 38 prélèvements positifs contre 54 pour l'ELISA
- Il y a 56 échantillons positifs et 16 négatifs détectés par les 2 méthodes confondues.

On observe donc en premier lieu l'importance du nombre de faux négatifs obtenus par la coproscopie. Si l'ELISA retrouve presque tous les résultats obtenus par la coproscopie, le contraire n'est pas vrai. En effet, 94% (36 sur 38) des échantillons trouvés positifs par coproscopie sont retrouvés positifs par ELISA. Alors que 33% (18 sur 54) des échantillons trouvés positifs par ELISA ne sont pas retrouvés positifs par coproscopie.

L'étude de la positivité dans le temps montre que la coproscopie ne la conserve pas longtemps. Toutes les coproscopies réalisées à J4, c'est à dire environ 6 jours après leur récolte, ont permis de retrouver les kystes (avec parfois des kystes dégénérés). Par

contre, seules 2 coproscopies sur les 23 réalisées à J8 ont donné un résultat positif, soit environ 10 jours après leur récolte.

Le test ELISA ProspectT® *Giardia* conserve lui aussi cette positivité à J4. Mais à la différence de la coproscopie, il la conserve également à J8. Un échantillon, le n°4, a été laissé à température ambiante 21 jours à l'issue desquels une coproscopie par sédimentation a été réalisée, donnant un résultat négatif. Cet échantillon a alors été congelé à -20°C. Il a ensuite été testé par ELISA avec les autres, donnant un résultat positif. Recongelé puis testé de nouveau par ELISA lors d'une manipulation suivante, ce résultat positif a été reconfirmé. En outre, les DO des selles à J0, J4 et J8 sont très voisines (cf. annexe 1, 2 et 3) ce qui confirme la grande stabilité de l'antigène GSA dans les fèces.

La coproscopie perd sa positivité dans le temps alors que l'ELISA la conserve.

2. Etude statistique des résultats

a. Sensibilités

Pour la coproscopie, la sensibilité est de 68% (38 sur 56).

Pour l'ELISA, la sensibilité est de 96% (54 sur 56).

b. Valeurs prédictives

1. *Coproscopie*

Tableau 4 : Réponse de la coproscopie face à la situation réelle

		Situation Réelle	
		+	-
Réponse de la coproscopie	+	38	0
	-	18	16

La valeur prédictive positive de la coproscopie est de 100%.

La valeur prédictive négative de la coproscopie est de 47%.

2. *ELISA*

Tableau 5 : Réponse de l'ELISA face à la situation réelle

		Situation Réelle	
		+	-
Réponse de l'ELISA	+	54	0
	-	2	16

La valeur prédictive positive de l'ELISA est de 100%.

La valeur prédictive négative de l'ELISA est de 88%.

c. Tests du Chi²

3. *Comparaison entre les deux méthodes*

Tableau 6 : Calculs statistiques de Chi² pour la comparaison entre la méthode ELISA et la coproscopie par sédimentation

		ELISA		
		+	-	
Coproscopie par sédimentation	+	36	2	38
	-	18	16	34
		54	18	72

La valeur du Chi² est de 16,7. Les résultats obtenus par ELISA sont très significativement différents de ceux obtenus par coproscopie par sédimentation au risque 1% (16,7 > 10,827 à 1ddl). La technique ELISA est donc supérieure à la coproscopie par sédimentation.

4. *Comparaison entre coproscopies*

Tableau 7: Calculs statistiques de χ^2 pour la comparaison des coproscopies réalisées sur les échantillons positifs

Coproscopies				
	J1	J4	J8	
+	38	15	2	55
-	0	0	21	21
	38	15	23	76

La valeur du χ^2 est de 66,29. Les variations des résultats obtenus par coproscopie sont significatifs à 1‰ ($66,29 > 13,815$ à 2 ddl). La sédimentation n'est donc pas une bonne méthode pour l'étude d'échantillons prélevés il y a plus de 6 jours.

5. Comparaison entre ELISA

Tableau 8: Calculs statistiques de χ^2 pour la comparaison des ELISA réalisées sur les échantillons positifs

ELISA				
	J1	J4	J8	
+	36	34	31	101
-	2	3	0	5
	38	37	31	106

La valeur du χ^2 est de 2,64. La variation des résultats obtenus par ELISA n'est pas significative à 5% ($2,64 < 5,991$ à 2 ddl). Cela signifie que la différence observée entre les résultats obtenus par ELISA aux différents jours est due au hasard. La technique ELISA est donc une bonne méthode pour l'étude d'échantillons prélevés il y a plus de 6 jours.

III. Discussion

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par DECOCK *et al.* en 2002. En effet leur étude montrait que la sensibilité de la coproscopie par flottation est de 77%, alors que celle du test ELISA ProspectT® *Giardia* est de 96%. La différence concernant la coproscopie vient peut-être de la différence de technique coproscopique utilisée. Dans le cas présent la coproscopie par flottation apparaît plus sensible que la coproscopie par sédimentation pour le diagnostic de giardiose chez le chien.

Notre étude apporte donc la confirmation que le test ELISA a une très bonne sensibilité chez le chien.

A J4, les résultats obtenus par chacune des techniques restent fidèles à ceux obtenus à J1. Seules les coproscopies réalisées à J4 sur les échantillons 35 et 36 ont montré des kystes dégénérés. De plus, ces mêmes échantillons sont les deux seuls à n'avoir pas été positifs à J1, J4 ou J8 par ELISA. Ces particularités retrouvées uniquement pour ces deux échantillons sont difficilement interprétables. Ces échantillons faisant partie du même lot que les échantillons 30 à 34, leur protocole de prélèvement étant le même, il n'est pas possible d'attribuer cette différence d'observation à des variations liées à l'envoi ou la conservation.

La positivité de l'échantillon laissé à température ambiante 21 jours laisse à penser que la GSA 65 se conserve bien plus longtemps que 10 jours à température ambiante. Ce résultat isolé reste cependant à confirmer par l'étude d'un plus grand nombre d'échantillons.

Nous avons été confronté à une contamination du témoin négatif lors d'une des premières manipulations (28/11/03, cf. annexes). Cela est certainement dû à une erreur de manipulation lors de lavages. Le reste des puits ne semble pas avoir été concerné par ces contaminations puisque il existe une homogénéité au sein de chaque échantillon entre les J1, J4 et J8. Quand bien même il y aurait également eu contamination de certains puits, cela n'aurait aucun effet sur l'interprétation des résultats puisque les DO sont bien trop élevées pour être le fait de contaminations.

L'échantillon J4 du n°18 est négatif probablement en raison d'une erreur dans la préparation de l'échantillon (pas suffisamment de selles mélangées à la solution de dilution), et non pas en raison d'un manque de sensibilité du test. En effet, les J1 et J8 du n°18 sont eux positifs. A cela s'est ajouté le problème de contamination du témoin négatif, qui lors de sa soustraction a rendu J4 du n°18 négatif, alors qu'il aurait probablement été positif avec un témoin négatif normal.

Les résultats positifs à l'ELISA mais négatifs à la coproscopie sont considérés comme de vrais positifs. Les études de LEIB *et al.* en 1992, tout comme celle de DECOCK *et al.* en 2002 confirment cette hypothèse. En effet la réalisation d'une ou deux nouvelles coproscopies sur les selles de ces chiens finit par révéler leur positivité dans la majorité des cas. De plus, il n'y a pas de réactions croisées de ce test avec d'autres parasites que *Giardia* ni chez l'homme ni chez le chien (HOPKINS *et al.*, 1993). Lors de notre étude, des échantillons positifs à *Trichuris vulpis*, *Toxocara canis* et *Uncinaria stenocephala* mais négatifs à *Giardia duodenalis* (échantillons négatifs n° 3, 7 et 8) sont restés négatifs lors du test ELISA. La réalisation de la technique de polymérisation en chaîne (PCR) sur les selles positives à l'ELISA mais négatives par coproscopie permettrait de confirmer définitivement la réalité de ces positifs, tout en déterminant la nature des souches de *Giardia duodenalis* impliquées dans ces infections.

Les résultats positifs par ELISA étant donc considérés comme étant réellement positifs, les valeurs prédictives positives sont de 100% pour les deux méthodes. Par contre, un résultat négatif par coproscopie a moins de chance d'être réellement négatif que par ELISA, du fait de l'excrétion intermittente des kystes. Ainsi la valeur prédictive négative de l'ELISA est de 40% supérieure à celle de la coproscopie (88% contre 47%).

Au cours de l'étude le prix de kit ELISA ProspectT® *Giardia* Microplate Assay 96 puits a baissé. En l'espace de 3 mois son prix est passé de 950 € à 550 € hors taxe (HT) environ. Soit actuellement un coût de 17,19 € HT (au lieu de 29,69 €) pour l'étude d'un échantillon (2 puits pour les témoins + et -), et 6,88 € HT par échantillon lorsque 10 sont réalisés en même temps.

Conclusion

Notre étude a permis d'étudier et de comparer deux techniques de diagnostic de la giardiose canine. Deux résultats importants ont été observés.

Premièrement, nous avons observé que si les selles ne sont pas analysées rapidement après la récolte, le risque de faux négatifs à la coproscopie par sédimentation est important. Il est donc nécessaire de prévoir un système de conservation des selles, compatibles avec la coproscopie et éventuellement l'ELISA, pour leur acheminement au laboratoire.

Deuxièmement, notre étude a confirmé le réel intérêt du test ELISA dans le diagnostic de la giardiose chez le chien. De plus, il reste fiable au moins 10 jours après la récolte des selles. Le temps nécessaire à sa réalisation est compensé par sa très bonne sensibilité face à une seule coproscopie par sédimentation. D'autant plus que la possibilité de tester plusieurs échantillons à la fois, sans réellement allonger la durée de la manipulation, permet finalement un gain de temps. Enfin, la récente baisse de son coût rend ce test abordable et possible à proposer en pratique courante.

Son inconvénient majeur par rapport à la coproscopie réside dans l'absence d'identification d'autres parasites et donc son diagnostic exclusif de la giardiose.

La méthode ELISA nous paraît donc intéressante. Nous recommandons son utilisation pour le diagnostic de la giardiose chez le chien, principalement lorsque plusieurs échantillons sont à analyser en même temps mais également sur des selles prélevées il y a plus de 6 jours ou lorsque la coproscopie est négative.

La PCR va probablement se développer puis devenir un outil intéressant et abordable dans le diagnostic de la giardiose. En outre, cette technique permet de déterminer le type de la souche de *Giardia duodenalis* impliquée dans l'infection. Elle pourrait ainsi permettre une éventuelle comparaison entre une souche donnée et une expression clinique comme cela a été montré chez l'homme.

Références bibliographiques

1. ADAM RD : The *Giardia lamblia* genome - *Int.J.Parasitol.*- 2000, **30** (4) : 475-484.
2. ANDRE H: La coccidiose à *Isospora* spp. Chez le chiot en élevage. - *Th. Méd. Vét.*- 2001, Créteil, n°72
3. ASTIAZARAN-GARCIA H, ESPINOSA-CANTELLANO M, CASTANON G, CHAVEZ-MUNGUIA B, MARTINEZ-PALOMO A : *Giardia lamblia* : effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of Gerbils (*Meriones unguiculatus*) - *Exp.Parasitol.*- 2000, **95** (2) : 128-135.
4. BAIXENCH MT, MAGNAVAL JF, ALBAREDE S, OLIVES JP : Comparaison de l'immunofluorescence, de la coprologie et de la biopsie jéjunale dans le diagnostic des infections à *Giardia intestinalis* - *Méd. Mal. Infect.* - 1993, **23** : 557-560.
5. BARR SC, BOWMAN DD : Giardiasis in dogs and cats – *Compend. of Cont. Educ.*- 1994, **16** (5) : 603-610.
6. BARR SC, BOWMAN DD, ERB HN : Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs - *Am. J. Vet. Res.*- 1992, **53** (11) : 2028-2031.
7. BARR SC, BOWMAN DD , HELLER RL, ERB HN : Efficacy of albendazole against giardiasis in dogs - *Am. J. Vet. Res.* - 1993, **54** (6) : 926-928.
8. BARR SC, BOWMAN DD , HELLER RL : Efficacy of fenbendazole against giardiasis in dogs- *Am. J. Vet. Res.*- 1994, **55** (7) : 988-990.
9. BARR SC: Enteric protozoal infections. In: GREENE CE, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders - 1998, 482-486.
10. BARR SC, BOWMAN DD , FRONGILLO MF, JOSEPH SL : Efficacy of a drug combination of praziquantel, pyrantel pamoate and febantel against giardiasis in dogs - *Am. J. Vet. Res.*- 1998, **59** (9) : 1134-1136.
11. BARUTZKI D: Prevalence of *Giardia* spp. In dogs and cats in Germany - Bayer - 2001: 24-25
12. BARUTZKI D, SCHIMMEL A, SCHAPER R: Efficacy of pyrantel embonate, febantel and praziquantel against *Giardia* in dogs - Bayer - 2001: 26-27.
13. BEUGNET F : Une entérite sous-estimée chez les carnivores domestiques : la giardiose à *Giardia duodenalis* - *Action Vét.*- 1996, **1357** : 13-18.
14. BEUGNET F : Le parasitisme digestif des carnivores domestiques - *Action Vét.*- 1998, **1453** : 12-18.
15. BEUGNET F : Diagnostic coproscopique en pratique - *Action Vét.*- 2000, **1510**, cahier clinique n°41.

16. BEUGNET F , BOURDOISEAU G, VILLENEUVE V : La giardiose des carnivores domestiques - *Action Vét.*- 2000a, **1518**, cahier clinique n°49.
17. BEUGNET F, GUILLOT J, POLACK B, CHERMETTE R : Enquête sur le parasitisme des chiens et des chats de particuliers de la région parisienne - *Rev. Méd. Vét.*- 2000b, **151** (5) : 443-446.
18. BEUGNET F, GUILLOT J, POLACK B, CHERMETTE R : Le parasitisme digestif des carnivores domestiques en région parisienne - *Action Vét.*- 2000c, **1514**: 12-16.
19. BEUGNET F, PIERSON P : Proposition de lutte contre la giardiose à *Giardia duodenalis* en élevage canin - document UMES-ENVA – 1997
20. BOONE JH, WILKINS TD, NASH TE, BRANDON JE, MACIAS EA, JERRIS RC, LYVERLY DM: TechLab and Alexon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1 - *Journ. Clinic. Microb.*- 1999: 611-614.
21. BOURDEAU P : Les giardioses des carnivores - *Rec. Méd. Vét.*- 1993, **169** (5/6) : 393-400.
22. BOURDOISEAU G : Les protozooses digestives - *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.* - 1993, **28** : 295-303.
23. BOURDOISEAU G : Le parasitisme de chenil - *Point Vét* - 1994, **25** (158) : 935-950.
24. BOURDOISEAU G : Elevage et collectivité : les maladies parasitaires du chien – *Nouv. Pratic. Vét.* – 2000, **2** : 137-139.
25. BROWN TJ, DONAGHY MJ, KEYS EA, IONAS G, LEARMONTH JJ, MCLENACHAN PA, CLARKE JK : The viability of *Giardia intestinalis* and *Giardia muris* cysts in seawater - *Int. J. Env. Health Res.*- 1999, **9** (2) : 157-161.
26. BURET AG, SCOTT KGE, CHIN AC Giardiasis: pathophysiology and pathogenesis. *In: OLSON BE, OLSON ME, WALLIS PM* : Editors. *Giardia, the cosmopolitan parasite*. New York : CABI Publishing - 2002, 109-123.
27. BUSSIERAS J, CHERMETTE R : Protozoologie Vétérinaire, Abrégé de Parasitologie Vétérinaire, Fascicule II, Ed Service de Parasitologie ENVA - 1992- 186p.
28. CAMPBELL JD , FAUBERT GM : Recognition of *Giardia lamblia* cyst-specific antigens by monoclonal antibodies - *Parasite Immunology* - 1994, **16** : 211-219.
29. CONBOY G: *Giardia* - *Can. Vet. Jour.*- 1997, **38** (4): 245-247.
30. COX FEG: Systematics of the parasitic Protozoa - *Trends in Parasitol.*- 2002, **18** (3): 108.
31. DALTON C, GOATER AD, PETHIG R, SMITH HV : Viability of *Giardia intestinalis* cysts and viability and sporulation state *Cyclospora cayetanensis* oocysts determined by electrorotation - *Appl. Environ. Microbiol.*- 2001, **67** (2) : 586-590.

32. DANG H, BEUGNET F : Parasitologie interne du chien - *CD-rom Merial* - 2000.
33. DECOCK C :Essai de traitement de la giardiose canine par le fébantel, le fenbendazole, l'oxfendazole et le métronidazole – *Th. Med. Vet* - 2002, ENVV, n°4177.
34. DECOCK C, CADIERGUES MC, LARCHER M, VERMOT S, FRANC M : Comparison of two techniques for diagnosis of giardiasis in dogs - *Parasite* - 2003, **10**: 69-72.
35. DENG MQ, CLIVER DO : Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals - *Parasitol. Res.*- 1999, **85**: 733-736.
36. EY PL, BRUDERER T, WEHRLI C, KOHLER P : Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analysis of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia - *Par. Res.*- 1996, **82** : 52-60.
37. FAUBERT GM : The immune response to *Giardia* - *Parasitol. Today* - 1996, **12** (4) : 140-145.
38. FILICE FP : Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat - *Univ. California Pub. Zool.*- 1952, **57** : 53–146.
39. GARCIA LS, SHIMIZU RY : Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPac combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay - *J. Clin. Microbiol.*- 2000, **38** (3) : 1267-1268.
40. GENTILINI M: *Giardiase In :Médecine tropicale*. Paris : Flammarion – 1993, 173-174.
41. GIANGASPERO A, TRALDI G, PAOLETTI B, TRAVERSA D, BIANCIARDI P: Efficacy of pyrantel embonate, febantel and praziquantel against *Giardia* species in naturally infected adult dogs - *Vet Rec.*- 2002, **150** (6): 184-186.
42. GIBSON GR, RAMIREZ D, MAIER J, CASTILLO C, SIDDHARTHA D : *Giardia lamblia* : incorporation of free and conjugated fatty acids into glycerol-based phospholipids - *Exp. Parasitol.* -1999, **92** (1): 1-11.
43. GILLIN FD, REINER DS, GAULT MF, DOUGLAS H, SIDDHARTHA D, WUNDERLICH A, SAUCH JF: Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* *in vitro* - *Science* - 1987, **235**: 1040-1044.
44. GILLIN FD, BOUCHER SE, ROSSI SS, REINER DS: *Giardia lamblia* : the roles of bile, lactic acid and pH in the completion of the life cycle *in vitro* - *Exp. Parasitol.*- 1989, **69**: 164-174.

45. GHOSH S, DEBNATH A, SIL A, DE S, CHATTOPADHYAY DJ, DAS P: PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene - *Molec. Cell. Prob.*- 2000, **14** (3), 181-189.
46. GRACZYK TK, FAYER R, CONN DB, LEWIS EJ: Evaluation of the recovery of waterborne *Giardia* cysts by freshwater clams and cyst detection in clam tissue - *Parasitol. Res.*- 1999, **85** (1): 30-34.
47. HANSON KL, CARTWRIGHT CP: Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyse multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia* - *J. Clin. Microbiol.*- 2001, **39** (2): 474-477.
48. HASHIMOTO T, SANCHEZ LB, SHIRAKURA T, MULLER M, HASEGAWA M: Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl t-RNA synthetase phylogeny -

59. LEIB MS, HAHN N, KING S, MATZ M: Comparison of diagnostic tests in dogs experimentally infected with *Giardia* - *Journ. Vet. Intern. Med.*- 1992, **6** (2): 129.
60. LEIB MS, DALTON MN, KING SE, ZAJAC AM: Endoscopic aspiration of intestinal contents in dogs and cats: 394 cases - *Journ. Vet. Intern. Med.*- 1999, **13** (3): 191-193.
61. LEIB MS, ZAJAC AM: Giardiasis in dogs and cats - *Vet. Med.*- 1999: 793-802.
62. LEJEUNE C: Le genre *Giardia* en médecine vétérinaire - *Th. Méd. Vét.*- 1997, Nantes, n°9
63. LUJAN HD, MOWATT MR, NASH TE: The molecular mechanisms of *Giardia* encystation - *Parasitol. Today* - 1998, **14** (11): 446-450.
64. MCDONNELL PA, SCOTT KGE, TEOH DA, OLSON ME, UPCROFT JA, UPCROFT P, BURET AG: *Giardia duodenalis* trophozoites isolated from a parrot (*Cacatua galerita*) colonize the small intestinal tracts of domestic kittens and lambs - *Vet. Parasitol.*- 2003, **111** (1): 31-46.
65. MCGLADE TR, ROBERTSON ID, ELLIOT AD, THOMPSON RCA: High Prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR - *Vet. Parasitol.*- 2003, **110** (3-4), 197-205.
66. MCINTYRE L, HOANG L, ONG CSL, LEE P, ISAAC-RENTON JL: Evaluation of molecular techniques to biotype *Giardia duodenalis* collected during an outbreak - *J.Parasitol.*- 2000, **86** (1): 172-177.
67. MELONI BP, LYMBERY AJ, THOMPSON RCA: Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy and epidemiology - *J. Parasitol.*- 1995, **81** (3): 368-383.
68. MONIS PT *et al.*: Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase gene - *Parasitology* - 1996, **112**: 1-12.
69. MONIS PT, ANDREWS RH, MAYRHOFER G, EY PL: Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin - *Infec.Gen.and Evol.*- 2003, **3** (1): 29-38.
70. O'HANDLEY RM, CERI H, ANETTE C, OLSON ME: Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections - *Vet. Parasitol.*- Available online 7 March 2003.
71. OLIVEIRA-SEQUEIRA TCG, AMARANTE AFT, FERRARI TB, NUNES LC: Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil - *Vet. Parasitol.*- 2002, **103** (1-2): 19-27.
72. OLSON ME, CERI H, MORCK DW: *Giardia* vaccination - *Parasitol. Today* - 2000, **16** (5):213-217.

73. OLSON ME, CERI H, MORCK DW: *Giardia* immunoprophylaxis and immunotherapy. In: OLSON BE, OLSON ME, WALLIS PM : Editors. *Giardia, the cosmopolitan parasite*. New York : CABI Publishing - 2002, 139-155.
74. PAYNE PA, RIDLEY RK, DRYDEN MW, BATHGATE C, MILLIKEN GA, STEWART PW: Efficacy of a combination febantel-praziquantel-pyrantel product, with or without vaccination with a commercial *Giardia* vaccine, for treatment of dogs with naturally occurring giardiasis - *Journ. Am. Vet. Med. Assoc.*- 2002, **220** (3): 330-333.
75. PONCE-MACOTELA M, MARTÍNEZ-GORDILLO MN, BERMÚDEZ-CRUZ RM, SALAZAR-SCHETTINO PM, ORTEGA-PIERRES G, EY PL: Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico - *Int. J. Parasitol.*- 2002, **32** (9): 1201-1202.
76. READ C, WALTERS J, ROBERTSON ID, THOMPSON RCA: Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea - *Int. J. Parasitol.*- 2002, **32** (2): 229-231.
77. RIPERT C: *Epidémiologie des maladies parasitaires* - Tome 1: Protozooses - Ed médicales internationales - Cachan - 1996 - 393p.
78. ROBERTSON ID, IRWIN PJ, LYMBERY AJ, THOMPSON RCA: The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses - *Int. J. Parasitol.*- 2000, **30** (12-13): 1369-1377.
79. ROSOFF JD, SANDERS CA, SONNAD SS, DE LAY PR, HADLEY WK, VINCENZI FF, YAJKO DM, O'HANLEY PD: Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65) - *Journ. Clin. Micro.*- 1989, **27** (9):1997-2002.
80. ROUDEBUSH P, DELIVORIAS MH: Duodenal aspiration via flexible endoscope for diagnosis of Giardiasis in a dog - *Journ. Am. Vet. Assoc.*- 1985, **18**: 162-163.
81. SCHIEVEN BC, HUSSAIN Z: Evaluation of an enzyme-immunoassay test kit for diagnosing infections with *Giardia lamblia* - *Sero. Imm. Infec. Dis.*- 1990, **4**: 109-113.
82. SINGER SM, NASH TE: T-cell dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice - *Infect. Immun.*- 2000, **68** (1): 170-175.
83. SLIFKO TR, SMITH HV, ROSE JB: Emerging parasite zoonoses associated with water and food - *Int. J. Parasitol.*- 2000, **30** (12-13): 1379-1393.
84. SMITS HL, HARTSKEERL RA: PCR amplification reactions in parasitology - *Journ. Microb. Meth.*- 1995, **23** (1), 41-54.
85. SPAIN CV, SCARLETT JM, WADE SE, MC DONOUGH P: Prevalence of enteric zoonotic agents in cats less than one year old in Central NewYork State - *J. Vet. Int. Med.*- 2001, **15** : 33-38.

86. TEKWANI BL, MEHLOTRA RK: Molecular basis of defence against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* - *Microbes Infect.*- 1999, **1** (5): 385-394.
87. THOMPSON RCA : Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential - *Int. J. Parasitol.*- 2000, **30** (12-13): 1259-1267.
88. THOMPSON RCA : Presidential address: rediscovering parasites using molecular tools – towards revising the taxonomy of *Echinococcus*, *Giardia* and *Cryptosporidium* - *Int. J. Parasitol.*- 2002a, **32** (5) : 493-496
89. THOMPSON RCA. Towards a better understanding of host specificity and the transmission of *Giardia*: the impact of molecular epidemiology. In: OLSON BE, OLSON ME, WALLIS PM : Editors. *Giardia, the cosmopolitan parasite*. New York : CABI Publishing – 2002b, 55-68.
90. THOMPSON RCA, REYNOLDSON JA, LYMBERY AJ: *Giardia*: from molecules to disease and beyond - *Parasitol. Today* - 1993a, **9** (9): 313-315.
91. THOMPSON RCA, REYNOLDSON JA, MENDIS AHW: *Giardia* and giardiasis - *Adv. Parasitol.*- 1993b, **32**: 71-160.
92. THOMPSON RCA, SCHANTZ P, LEIB MS, OLSON ME, TWEDT D: Update *Giardia* - *Roundtable discussion proceedings* - Fort Dodge animal health – 1999, 18p.
93. THOMPSON RCA, HOPKINS RM, HOMAN WL: Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals - *Parasitol. Today* - 2000, **16** (5): 210-213.
94. TOMA B, DUFOUR B, SANAA M: *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. Maisons-Alfort : AEEMA, 1996, 551p.
95. TONKS MC, BROWN TJ, IONAS G: *Giardia* infection of cats and dogs in New Zealand - *N.Z. Vet. J.*- 1991, **39**: 33-34.
96. VAN KEULEN H, MACECHKO T, WADE S, SCHAAF S, WALLIS P, ERLANDSEN SL: Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis - *Veterinary Parasitology* – 2002, **108** (2): 97-107.
97. VILLENEUVE V: Essai de l'oxfendazole dans le traitement de la giardiose canine - *Th. Med. Vet.*- 2000, ENVL, n°23.
98. VILLENEUVE V, BEUGNET F, BOURDOISEAU G: Efficacy of oxfendazole for the treatment of giardiasis in dogs - Experiments in dog breeding kennels - *Parasite* - 2000a, **7** (3): 221-226.
99. VILLENEUVE V, BEUGNET F, BOURDOISEAU G: Enquête épidémiologique sur les parasitoses digestives du chien en élevage - *Action Vét.*- 2000b, **1532**: 16-21.

100. WILLIAMSON AL, O'DONOGHUE PJ, UPCROFT JA, UPCROFT P: Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice - *Int. J. Parasitol.* - 2000, **30** (2): 129-136.
101. ZAJAC AM : Giardiasis - *The Compendium of Cont. Educ.*- 1992, **14** (5): 604-609.
102. ZAJAC AM, LEIB MS, BURKHOLDER WJ: *Giardia* infection in a group of experimental dogs - *J. Small An. Pract.*- 1992, **33**: 257-260.
103. ZAJAC AM, LABRANCHE TP, DONOGHUE AR, CHU TC: Efficacy of fenbendazole in the treatment of experimental *Giardia* infection in dogs - *Am. J. Vet. Res.*- 1998, **59** (1): 61-63.
104. ZAJAC AM, JOHNSON J, KING SE: Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations - *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*- 2002, **38** (3): 221-4.

Rapport-Gratuit.com

ANNEXES

ANNEXE 1 : Résultats spectrophotométriques des échantillons positifs 19 et 37

TEST NO. : W/L MODE : SINGLE DATE : 25/11/2003
 TEST NAME : gayet1 TEST FILTER : 450 nm TIME : 17:58:34
 PLATE : gayet1 REF. FILTER : * OPERATOR :

: 3.600 OVER limit
 : Endpoint Calculation mode
 mode selected. Blank mode has been modified. WARNING | Invalid blank
 150 Average blank value = 0.0

DATA MATRIX/TABLE : OD

	1		
A	BLANK		1
B	1.493	A	-
C	0.647	B	+
D	0.200	C	37 J1
E	0.076	D	37 J4
F	0.757	E	37 J8
G	0.282	F	19 J1
H	0.452	G	19 J4
		H	19 J8

ANNEXE 2 : Résultats spectrophotométriques des échantillons positifs 1 à 18 et 20

TEST NO. : W/L MODE : SINGLE DATE : 28/11/2003
 TEST NAME : Giardia TEST FILTER : 450 nm TIME : 15:37:57
 PLATE : Giardia REF. FILTER : * OPERATOR :

OVER limit : 3.600
 Calculation mode : Endpoint

WARNING | Invalid blank mode selected. Blank mode has been modified.

Average blank value = 0.366

DATA MATRIX/TABLE : OD

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	BLANK	1.511	2.050	2.038	2.036	1.947	1.913	1.941
B	1.139	0.822	1.460	0.830	0.735	1.258	1.239	1.064
C	2.018	1.891	1.857	0.670	0.841	0.711	0.506	0.490
D	0.786	0.398	0.478	0.347	0.501	0.690	0.528	1.896
E	1.754	1.798	1.575	1.183	0.980	1.685	1.500	1.648
F	1.458	1.384	1.299	1.573	1.385	1.558	1.244	1.275
G	1.199	1.223	0.835	0.791	-0.053	1.744	1.715	0.649
H	1.091	0.786						

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	-	+	1 J1	1 J4	1 J8	2 J1	2 J4	2 J8
B	3 J1	3 J8	4 J1	4 J4	4 J21	5 J1	5 J4	5 J8
C	6 J1	6 J4	6 J8	7 J1	7 J4	7 J8	8 J1	8 J4
D	8 J8	9 J1	9 J4	9 J8	10 J1	10 J4	10 J8	11 J1
E	11 J4	11 J8	12 J1	12 J4	12 J8	13 J1	13 J4	13 J8
F	14 J1	14 J4	14 J8	15 J1	15 J4	15 J8	16 J1	16 J4
G	16 J8	17 J1	17 J4	17 J8	18 J4	18 J1	18 J8	20 J8
H	20 J1	20 J4						

ANNEXE 3 : Résultats spectrophotométriques des échantillons positifs 21 à 36 et 38, et des échantillons négatifs 33 et 34

TEST NO. : W/L MODE : SINGLE DATE : 17/12/2003
 TEST NAME : Giardia171203II TEST FILTER : 450 nm TIME : 13:55:21
 PLATE : REF. FILTER : * OPERATOR :

OVER limit : 3.600
 Calculation mode : Endpoint

WARNING ! Invalid blank mode selected. Blank mode has been modified.

Average blank value = 0.036

DATA MATRIX/TABLE : OD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.545		2.973		2.073		2.878		0.454	0.007		2.356
B	0.470		2.803		1.754		1.932		1.755	0.965		
C	0.503		2.857		1.738		1.375		1.543	0.791		
D	0.285		2.834		1.341		2.080		1.255	0.599		
E	0.209		2.263		0.954		1.834		1.202	1.797		
F	0.289		2.180		0.158		0.636		0.032	0.964		
G	2.923		1.821		0.131		0.521		0.007	1.810		
H	2.956		2.403		0.104		0.624		0.014			BLANK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	21 J1		23 J8		26 J4		29 J1		32 J4	36 J4		+
B	21 J4		24 J1		26 J8		29 J4		33 J1	38 J1		
C	21 J8		24 J4		27 J1		29 J8		33 J4	38 J4		
D	22 J1		24 J8		27 J4		30 J1		34 J1	38 J8		
E	22 J4		25 J1		27 J8		30 J4		34 J4	4 J21		
F	22 J8		25 J4		28 J1		31 J1		35 J1	33		
G	23 J1		25 J8		28 J4		31 J4		35 J4	34		
H	23 J4		26 J1		28 J8		32 J1		36 J1			-

ANNEXE 4 : Résultats spectrophotométriques des échantillons négatifs 1 à 32

TEST NO. :
 TEST NAME : Dim2
 PLATE :

W/L MODE : SINGLE
 TEST FILTER : 450 nm
 REF. FILTER : *

DATE : 11/12/2003
 TIME : 14:05:27
 OPERATOR :

OVER limit : 3.600
 Calculation mode : Endpoint

WARNING ! Invalid blank mode selected. Blank mode has been modified.

Average blank value = 0.040

DATA MATRIX/TABLE : OD

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	BLANK	0.031		0.116		2.181		0.393
B		-0.003		-0.003		0.470		0.246
C		-0.000		0.033		1.266		0.027
D		0.077		0.999		0.065		0.598
E		-0.004		0.018		1.304		1.011
F		2.051		0.008		2.124		0.010
G		0.001		0.012		-0.006		0.976
H	1.516	0.037		-0.001		-0.003		0.368

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	-	1		9		17		25
B		2		10		18		26
C		3		11		19		27
D		4		12		20		28
E		5		13		21		29
F		6		14		22		30
G		7		15		23		31
H	+	8		16		24		32

ANNEXE 5 : Notice du test ProspectT® Giardia Microplate Assay



Advancing
the Diagnosis
of Intestinal Infections

An Enzyme Immunoassay for the Detection of *Giardia* Specific Antigen

ProSpecT®
Giardia Microplate
Assay

**PACKAGE
INSERT**

For *IN VITRO* Diagnostic Use
24/96 Tests

Catalog #2458024/2458096
U.S. Patent No. 5,503,983

Alexon-Trend 14000 Unity St. NW, Ramsey, MN 55303

Made in the USA
4195-L

ProSpect® Giardia Microplate Assay

INTENDED USE

ProSpect® Giardia Microplate Assay uses monoclonal antibody for the qualitative detection of *Giardia* Specific Antigen (GSA 65) in aqueous extracts of fecal specimens.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Giardiasis is now recognized as an important human intestinal disease in most areas of the world. The causative organism, *Giardia lamblia*, is the most frequently identified protozoan parasite in stool specimens submitted to U.S. public health laboratories (3). This parasite has been implicated in a number of epidemics (4, 5) and the endemicity in the U.S. is well-recognized. Prevalence in adults is estimated at 4-7% (8). Higher prevalence rates have been reported in children (1, 15) and in homosexual males (6, 7). Acute symptoms of giardiasis may include diarrhea, malabsorption, abdominal cramps, anorexia, nausea, weight loss, flatulence, anemia, and general weakness lasting from several weeks to several months (16). Chronic infections can also occur with or without an acute phase, are often associated with treatment failure, and may result in recurrent symptoms. Infection with *Giardia* may also be asymptomatic (2).

Giardia Specific Antigen (GSA 65) is a macromolecule that has been found in association with *Giardia* infections and has been used as the basis of immunoassays (9,10,11,12). GSA 65 is a 65,000 molecular weight glycoprotein that is produced in abundant quantities by the *Giardia lamblia* protozoa as they multiply within the host intestinal tract. The antigen is present only when *Giardia* infection is present and it is possible to find GSA 65 in stool specimens without visible signs of cysts or trophozoites. (9,10,11). GSA 65 is a *Giardia* Specific Antigen and anti-GSA 65 antibodies have not been found to cross react with other enteric parasites (1,10). GSA65 is stable to transport through the host intestinal tract as well as to most routine procedures used to collect and transport stool specimens for ova and parasite (O&P) microscopic examination (1,11,12,13).

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

ProSpect® Giardia Microplate Assay is a solid phase immunoassay for the detection of GSA 65 (14). Diluted stool specimens are added to

Substrate
which it is
by reason

break-away microplate wells in which the substrate is already immobilized. If GSA 65 is present, it is 'captured' by the bound antibody. The wells are incubated and then washed to remove unbound material. The enzyme

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The ProSpect® Giardia Microplate Assay is intended for in vitro diagnostic use by professionals only. The assay is a qualitative assay for the detection of *Giardia lamblia* Specific Antigen. The intensity of color development does not correlate with the level of antigen or degree of infection.

Specimens, specimen dilutions, Positive Controls, Negative Controls and microplate test strips should be handled using standard guidelines for biohazard materials. Proper handling and disposal methods should be established by the laboratory.

Wash Buffer, Enzyme Conjugate, Specimen Dilution Buffer and Positive and Negative Controls contain thimerosal which may be irritating to skin, eyes and mucous membranes. In case of contact, flush eyes or skin with copious amounts of water.

Stop Solution is corrosive and should be handled with care. If this solution comes into contact with skin or clothing, it should be washed off immediately.

Color Substrate is sensitive to light exposure. If the reagent is exposed to light and develops color, the reagent must be discarded.

Persons who are color blind or visually impaired may not be able to read the test visually and should use spectrophotometric readings to interpret results.

DO NOT CONCENTRATE SPECIMENS BEFORE TESTING.

PREPARATION OF REAGENTS

Before use, bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) and mix gently. Return the unused reagents to the refrigerator after use.

All reagents, except the Wash Buffer, are supplied ready-to-use in dropper bottles. Reagents can be dispensed directly from the dropper bottles or poured out for use with multichannel pipets. If excess reagent has been poured, the excess should be discarded. Do not pour excess reagent back into the dropper bottle.

Dilute 10x Wash Buffer concentrate to 1x by adding 1 part concentrate to 9 parts distilled or deionized water. Diluted Wash Buffer is stable for 1 month when stored at 2 - 8°C.

STORAGE AND HANDLING

The expiration date of each kit is stated on the package label. Store all components at 2-8°C. Unused microplate strips should be stored in the foil pouch containing desiccant to exclude moisture. The Color Substrate should be stored in and used from the light protected bottle in provided. If an aliquot is removed from the original bottle for an

TEST PROCEDURE

Required materials provided:

Reagents
Microplate Stripwell Holder

Required materials not provided:

Stool specimen collection containers
Wash bottle or dispenser for Wash Buffer
Timer that measures minutes
Distilled or deionized water

Optional materials not provided:

Microplate reader (spectrophotometer)
Cotton or rayon tipped applicator sticks
Micropipet to deliver volumes to 200µl
Plastic or glass disposable test tubes
Vortex mixer with plate adapter or shaker

Procedure:

1. Open the foil pouch, remove the required number of microplate strips and place into a microplate strip holder. Use one well for the Negative Control and one well for the Positive Control. If using less than 8 wells, break off the required number of wells from a strip and return the rest to the foil pouch. RESEAL POUCH TIGHTLY TO EXCLUDE MOISTURE AND RETURN TO THE REFRIGERATOR.
2. Specimens can be added directly into the wells or pre-diluted in tubes before adding to the wells. Pre-diluted specimens can be held at room temperature (20 - 25°C) for 8 hours or at 2-8°C for 48 hours prior to testing (see below). Choose one of these two methods: See Box **A** for dilution in wells; See Box **B** for pre-dilution in tubes.

A Dilution in Wells

3. **Unpreserved Solid Specimens:** Label one tube for each specimen. Add 0.4 ml Specimen Dilution Buffer (SDB) to each tube. Coat 1 swab with specimen and vigorously mix into SDB. Express as much fluid as possible and discard the swab. Put a transfer pipet into the tube.
4. **Preserved or Watery Unpreserved Specimens:** Mix by shaking specimen collection containers. No further preparation is necessary.
5. Add 4 drops Negative Control to well A1. Add 4 drops Positive Control to well B1.
6. Add 100 µl SDB to each specimen well.
7. Using transfer pipets add 1 drop of each specimen to a well.

Note: Place the opening of the transfer pipets just inside the wells to avoid splashing into adjacent wells.

PROCEED TO STEP 8

B Dilution in Tubes

3. **Unpreserved Solid Specimens:** Label one tube for each specimen. Add 1 ml Specimen Dilution Buffer (SDB) to each tube. Coat 1 swab with specimen and vigorously stir into SDB. Express as much fluid as possible and discard the swab. Put a transfer pipet into each tube.
4. **Preserved or Watery Unpreserved Specimens:** Label one tube for each specimen. Add 1 ml SDB to each tube. Mix samples by shaking specimen collection containers. Using transfer pipets draw up 0.3 ml (third mark from the tip of the pipet). Expel sample into SDB. Mix by drawing up and down once. Leave transfer pipets in the tubes.

Diluted specimens may be held for 8 hours at room temperature or 48 hours at 2-8°C.

5. Add 4 drops Negative Control to well A1.
6. Add 4 drops Positive Control to well B1.
7. Using transfer pipets add 0.2 ml (second mark from the tip of the pipet) of each specimen to a well.

Note: Place the opening of the transfer pipets just inside the wells to avoid splashing into adjacent wells.

PROCEED TO STEP 8

8. Incubate the microplate at room temperature (20 - 25°C) for 60 minutes. Begin timing after the addition of the last specimen.
9. Shake out or aspirate the contents of the wells. Wash by completely filling each well with diluted Wash Buffer (~350-400 µl/well). Shake out or aspirate all fluid from wells after each wash. Wash a total of 3 times. After the last wash dump out contents and bang on clean paper towels or aspirate. Remove as much Wash Buffer as possible but do not allow the wells to dry out at any time.
10. Add 4 drops (200 µl) of Enzyme Conjugate (blue cap) to each well.
11. Incubate the microplate at room temperature (20 - 25°C) for 30 minutes.
12. Decant and wash each well 5 times as in step 9.
13. Add 4 drops (200 µl) of Color Substrate to each well.
14. Incubate the microplate at room temperature (20 - 25°C) for 10 minutes.
15. Add 1 drop (50 µl) of Stop Solution to each well. Gently tap or vortex the wells until the yellow color is uniform. Read reactions within 10 minutes after adding Stop Solution. Read visually or spectrophotometrically at 450 nm.

QUALITY CONTROL

Positive and Negative Controls must be included each time the test is performed. The Positive and Negative Controls serve as both reagent and procedural controls.

RESULTS

Refer to the enclosed Procedure Card for color interpretations.

Visual:

1. Read the Negative Control. The reaction should be colorless. If yellow color equal to 1+ or greater is present, the test should be repeated with careful attention to the wash procedure. Call for technical assistance.
2. Read the Positive Control. The intensity of color in the Positive Control should be equal to or greater than the 2+ reaction on the procedure card. If there is less color, call for technical assistance.
3. Read the test results by comparing with the reaction colors on the procedure card.

Positive: yellow color of at least 1+ intensity
Negative: colorless

4. Interpretation of visual results:

Positive: If yellow color of at least 1+ intensity develops in the test well, the sample contains GSA 65 and the test is positive.

Note: Tests with faint yellow color (less than 1+) should be repeated.

Negative: A colorless reaction is a negative result and indicates that no GSA 65 or an undetectable level of GSA 65 is present in the sample tested.

Spectrophotometric:

1. Set the spectrophotometer (microplate reader) to read at 450 nm.
2. Read the optical density (O.D.) for the Negative Control. For a valid test, the O.D. of the Negative Control should be 0.100 or less. If the O.D. is greater than 0.100, the results are invalid and the test should be repeated with careful attention to the wash procedure. Call Alexon for technical assistance.
3. Subtract the O.D. of the Negative Control well from the O.D. readings of the Positive Control well and the test wells before interpreting results.
Note: Readers may be set to blank on the Negative Control well so that the Negative Control well O.D. is automatically subtracted from all of the other readings. If the reader does not have this capability, blank on air and subtract the O.D. of the Negative Control well from the O.D. readings of the Positive Control well and test wells before interpreting results.
4. The O.D. for the Positive Control should be 0.300 or greater after the O.D. of the blank is subtracted. If the O.D. is less than 0.300, the test should be repeated. Call for technical assistance.

5. Read the test results:
- Positive:** O.D. of ≥ 0.050 blanked value (i.e. after the O.D. of the Negative Control is subtracted)
- Negative:** O.D. of <0.050 blanked value (i.e. after the O.D. of the Negative Control is subtracted)
6. Interpretation of spectrophotometric results:
- Positive:** If the blanked O.D. reading is equal to or greater than 0.050 in the test well, the sample contains GSA 65 and the test is positive.
- Negative:** A blanked O.D. reading less than 0.050 is a negative result and indicates that no GSA 65 or an undetectable level of GSA 65 is present in the sample tested.

Limitations of the Procedure

A single diagnostic assay or test result should not be used as the only basis for forming a clinical conclusion. Results should be supported by correlation with patient symptoms and the overall clinical picture.

ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay has been classified high complexity and assigned analyte identifier code 2222 and test system codes 04557 (spectro) and 04558 (visual).

EXPECTED VALUES

The prevalence of *Giardia* infection varies in different populations and geographic areas. In the U.S., the incidence of *Giardia* is approximately 4-7% with higher prevalence rates in children (12) and in homosexual males (5,6).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity and Specificity

Clinical studies were conducted to evaluate the performance of the ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay. Specimens were obtained from a large reference laboratory which performed O&P testing. A total of 248 unpreserved specimens were tested; 101 were positive for *Giardia* by O&P and 147 were negative. Forty-seven of the *Giardia* negative specimens contained parasites other than *Giardia* by O&P. All of the O&P positive specimens were positive in the microplate assay and all of the negative specimens were negative. The performance of the ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay in this study is presented below.

		O&P		
		+	-	
ProSpecT	+	101	0	248
<i>Giardia</i>	-	0	147	
Sensitivity		101/101 = 100% (96-100%)		
Specificity		147/147 = 100% (98-100%)		

Numbers in parentheses are 95% confidence intervals.

the dilution in wells procedure the mean CV of the negative samples was 7.66% (range 4.22% to 16.19%) and the mean CV for the positive samples was 7.76% (range 4.12% to 11.26%).

The intra-assay or within-run CV was evaluated with 5 positive and 5 negative samples assayed at least ten times in a single run. For the dilution in tube procedure the mean CV of the negative samples was 4.47% (range 3.30% to 5.39%) and the mean CV for the positive samples was 5.61% (range 2.53% to 10.12%). For the dilution in wells procedure the mean CV of the negative samples was 4.51% (range 2.73% to 5.36%) and the mean CV for the positive samples was 9.58% (range 4.78% to 13.8%).

Cross-Reactivity

The ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay has been tested with stool specimens found to be positive for a number of fecal organisms. No cross-reactivity was observed with any of the infectious agents listed below.

Ascaris lumbricoides (5) *Entamoeba hartmanni* (5) *Isospora belli* (5)
Cryptosporidium parvum (10) *Endolimax nana* (6) *Strongyloides*
Dientamoeba fragilis (10) *Hymenolepis nana* (2) *stercoralis* (1)
Entamoeba coli (13) *Iodamoeba butschlii* (9) *Trichuris trichiura* (2)

Numbers in parentheses indicate the numbers of specimens tested.

ORDERING

ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay catalog number is 2458096 (96 test) and 2458024 (24 test). For ordering or customer and technical assistance please call 913-888-0939 or **800-255-6730** or FAX 913-888-0939.

BIBLIOGRAPHY

1. Addiss, D.G., 1991. "Evaluation of a commercially available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Giardia lamblia* antigen in stool." *J Clin Micro* **29**(6):1137-1142.
2. Black, R.E. et al., 1977. "Giardiasis in day care centers: evidence of person to person transmission." *Pediatrics* **60**:486-491.
3. Center for Disease Control, Atlanta, GA, 1978. "Intestinal parasite surveillance United States 1976." *Morb Mort Week Rep* **27**:167-168.
4. Garon, C.F., 1970. "Intestinal giardiasis in the United States: a review." *J Publ Health* **69**:817-819.
5. Craun, G.F., 1986. "Waterborne giardiasis in the United States 1965-84." *Lancet* **i**:513-514.
6. Kean, B.H. et al., 1979. "Epidemic of amoebiasis and giardiasis in a biased population." *Brit J Ven Dis* **55**:375-378.
7. Meyers, J.D. et al., 1977. "*Giardia lamblia* infection in homosexual men." *Brit J Ven Dis* **53**:54-55.
8. Rendtorff, R.C., 1979. "The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects in Waterborne Transmission of Giardiasis" (Jakubowski, W., and Hoff, J.C., eds); pp. 64-81. EPA, U.S., Cincinnati, OH.
9. Rosoff, J.D. and Stibbs, H.H., 1986. "Isolation and identification of a