

Dynamique de *Cryptosporidium* et de *Giardia* en bassin versant agricole

Sylvain Quessy et coll.

Forum de transfert des travaux de recherche sur l'environnement rural

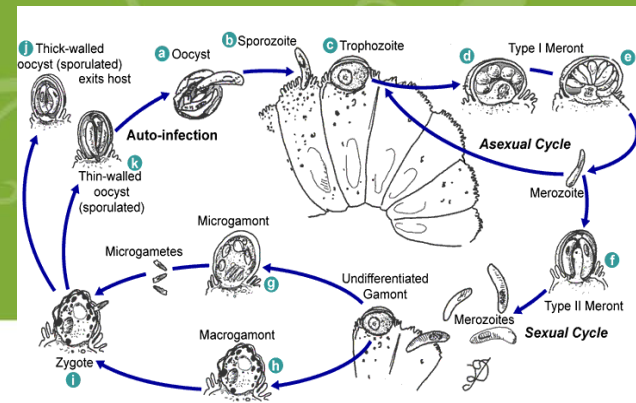
Introduction

- ***Cryptosporidium* spp et *Giardia* spp sont des parasites pouvant causer de sévères gastro-entérites chez l'humain.**
- ***Cryptosporidium* aussi responsable de pertes économiques importantes au Québec puisqu'il peut causer des mortalités chez le veau.**
- **Aucun traitement efficace de la cryptosporidiose n'est disponible au Canada pour traiter les humains ou les animaux.**
- **Une des problématiques de santé publique associée à ces microorganismes est qu'ils sont résistants à la chloration de l'eau.**
- **De plus, peu d'organismes sont nécessaires pour infecter l'humain.**

Introduction

- Les bovins sont actuellement reconnus comme étant le principal réservoir de *Cryptosporidium* et *Giardia*, mais ces parasites ont aussi été trouvés chez plusieurs espèces d'animaux sauvages et d'élevage tels que le porc, les cervidés, le castor et les autres rongeurs.
- Au Québec, les pourcentages de troupeaux de bovins laitiers positifs à *Cryptosporidium* et *Giardia* ont été évalués à 88,7 % et 45,7 % respectivement (1).
- Ces parasites sont par ailleurs fréquemment détectés dans les eaux de surface du Québec et d'Amérique du Nord (2, 3).

Introduction



- La faune pourrait agir comme source d'infection pour les animaux d'élevage lorsque ceux-ci s'abreuvent d'eau non-filtrée.
- D'un autre côté, les épandages de fumiers pourraient contribuer à la contamination des sources d'eau en milieu agricole.
- Par conséquent, le risque pour l'humain pourrait être accru.
- Des techniques de caractérisation génétique de *Cryptosporidium* et *Giardia* peuvent être utilisées afin de d'identifier la (les) espèce(s) animale(s) pouvant potentiellement agir comme source de contamination par ces parasites (5, 6).

Objectifs

Évaluer la dynamique des parasites en bassins versants agricoles

1. Caractériser des isolats provenant de matières fécales d'animaux d'élevage et sauvages de bassins versants agricoles
2. Détecter et caractériser les parasites dans les fumiers épandus et dans l'eau de bassins versants agricoles
3. Préciser le rôle de la faune et des fumiers comme source de parasites pour l'eau en milieu agricole
4. Préciser l'impact du passage de *Cryptosporidium* chez le veau sur le profil génotypique et phénotypique de ce parasite
5. Caractériser l'exposition aux parasites des résidents de bassins versants agricoles via l'eau de consommation provenant de puits privés

Méthodologie / Résultats

Objectifs 1 et 2

Détecter et caractériser les parasites chez les espèces animales, dans les fumiers et dans l'eau

Objectif 3

Préciser le rôle des fumiers et de la faune comme source de parasites



Méthodologie

Bassin versant de la Rivière-aux-Brochets

- 2 sous-bassins de 10 et 14 km²
- 23 fermes (lait, porc et volaille)
- Animaux de la faune et de compagnie
- 2 cours d'eau tributaires de la rivière

Méthodologie

2004

Matières fécales



bovin, porc, poulet et dindon

chien et chat

rat musqué

raton laveur

castor

oie blanche

chevreuil

2005 & 2006

Fumiers et lisiers



semaine précédant l'épandage

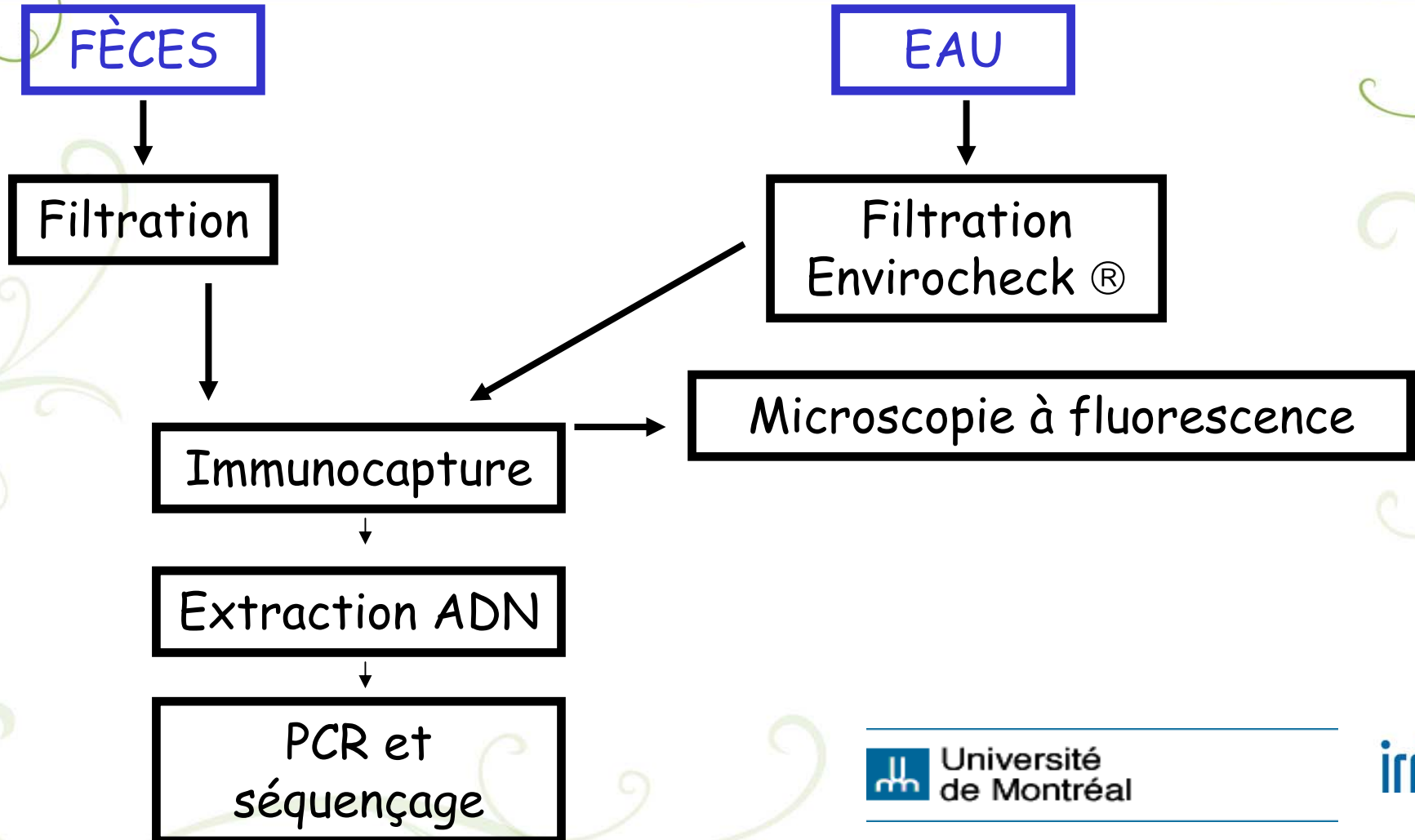
Eau de surface



5 sites

échantillonnage aux 2
semaines et aux
événements pluviaux

Méthodologie - détection



Méthodologie



Méthodes diagnostiques sur matières fécales : PCR et séquençage

- Choix de gène(s) d'intérêt
 - Besoin d'un gène d'intérêt suffisamment **polymorphe** pour discriminer les différents isolats du parasite
 - Besoin de régions **moins variables** et complémentaires à des amorces adéquates

Méthodologie

- caractérisation génétique -

PCR et séquençage d'ADN

2004 & 2005 → gène COWP chez *Cryptosporidium* (550 pb)
gène β -giardin chez *Giardia* (384 pb)

2006 → gène HSP70 chez *Cryptosporidium* (1 950 pb)
gène β -giardin chez *Giardia* (511 pb)

Tableau 1. Présence des parasites au sein des fermes des bassins versants en 2005

Types de fermes	Total des fermes dans les bassins versants	Nombre de fermes trouvées positives	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
Laitières	17	12	17*
Porcines	5	3	3
Avicoles	1	1	1

Faune: Chevreuil, Raton laveur, Castor, Rat musqué, Oie blanche

Tableau 2. *Cryptosporidium* et *Giardia* détectés par immunofluorescence (IF) et PCR dans les matières fécales fraîches provenant de différentes espèces animales

Espèces animales	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs par IF		Nombre d'échantillons positifs par PCR	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
Bovin laitier (≥ 1 an)	36	3	2	20	30
Bovin laitier (< 1 an)	32	1	6	16	28
Porc	10	9	3	4	3
Volaille	11	-	-	5	9
Chevreuril	39	1	5	4	4
Oie blanche	12	-	-	-	-
Raton laveur	12	-	1	1	4
Rat musqué	4	1	3	-	1
Castor	5	-	-	-	1
Chat	3	-	1	2	2
Chien	3	-	-	2	2

Résultats - PCR -

	échantillons analysés	PCR +	
		<i>Crypto</i>	<i>Giardia</i>
2004	160 fèces	49	56
2005	38 eaux	9	8
	28 fumiers	4	6
2006	27 fumiers	1	0
	55 eaux	0	0



Résultats - immunofluorescence -

2006	fumiers ((oo)kystes/g)	eau de surface ((oo)kystes/100mL)
<i>Cryptosporidium</i>	8 / 27 [6 - 44] (15)	18 / 55 [100 - 1 800] (500)
<i>Giardia</i>	13 / 27 [6 - 138] (35)	41 / 55 [100 - 12 400] (980)

Résultats - séquençage -

Cryptosporidium

Analyse du gène COWP : 1 seul génotype détecté

45% de similarité avec *Cryptosporidium sp. porc*

chez le bovin laitier, le poulet, le dindon et dans l'eau de surface

Analyse du gène HSP70 : 2 génotypes détectés

Cryptosporidium parvum bovin chez le bovin et le chevreuil

Cryptosporidium parvum porc chez le porc (100%)

Très grande stabilité génotypique *Cryptosporidium*:

Impossibilité de déterminer la source de contamination

Résultats - séquençage -

Giardia

Analyse du gène β - giardin : 16 génotypes détectés

chez le bovin laitier, le poulet, le chevreuil, le dindon, le raton laveur et l'eau de surface

33 à 66% similaires à *Giardia lamblia* Assemblage A du chien

Étant donné que des génotypes différents ont été observés chez différentes espèces animales dont celles d'origine faunique, il n'est pas possible d'établir de lien entre les parasites détectés chez les animaux de la faune et ceux retrouvés dans l'eau

Méthodologie / Résultats

Objectif 4

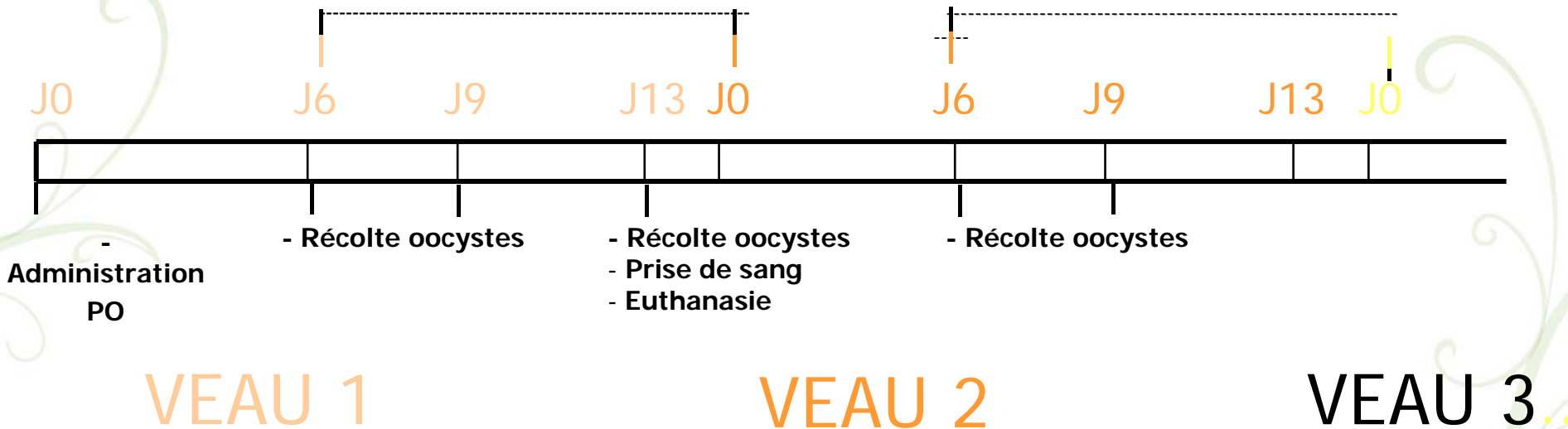
Préciser l'impact du passage de *Cryptosporidium* chez le veau sur le profil génotypique et phénotypique de ce parasite



Plan expérimental (partie *in vivo*)

Jour 0	<ul style="list-style-type: none">Administration <i>per os</i> du pathogène à un veau âgé de 24 à 72 heures (entre 10^4 et 10^6 oocystes dilués dans 1 litre de lait selon la quantité obtenue du veau précédent)
Jour 6	<ul style="list-style-type: none">Récolte d'oocystes (via les fèces) et concentration et purification par immunocapture pour infection expérimentale du prochain veau (pic d'excrétion entre 6 et 8 jours post-infection selon Fayer et coll., 1998)
Jour 9	<ul style="list-style-type: none">Récolte d'oocystes (via les fèces)
Jour 13	<ul style="list-style-type: none">Récolte d'oocystes (via les fèces)Prise de sangEuthanasie

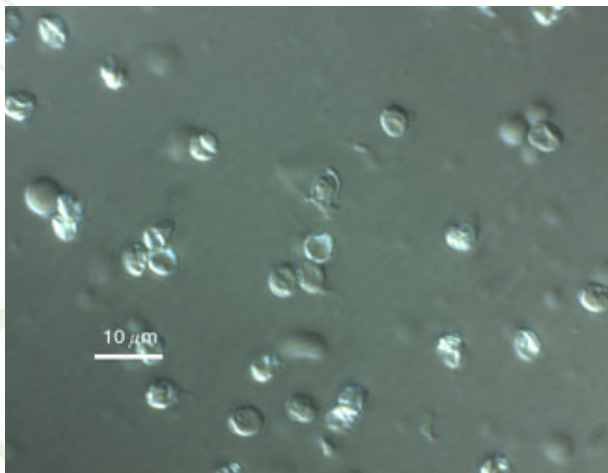
Plan expérimental (partie *in vivo*)



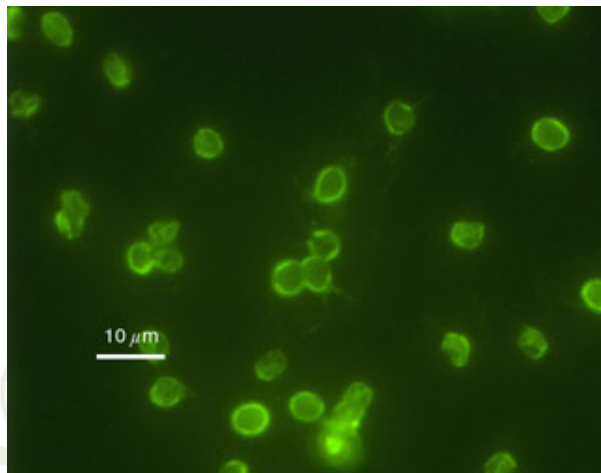
Détection et dénombrement par immunofluorescence directe à l'aide du kit Merifluor®

- Colorant **FITC** (Fluorescéine Iso Thio Cyanate) pour la détection et le dénombrement des oocystes totaux
- Évaluation de la viabilité des oocystes à l'aide du colorant **DAPI** (4,6 – diamidino – 2 – phenylindole)

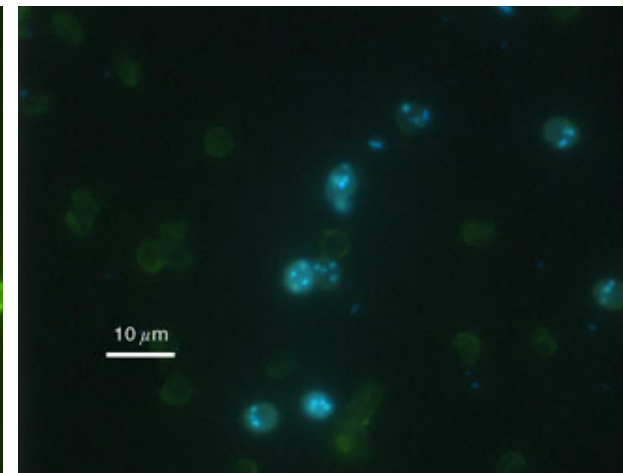
Sans coloration



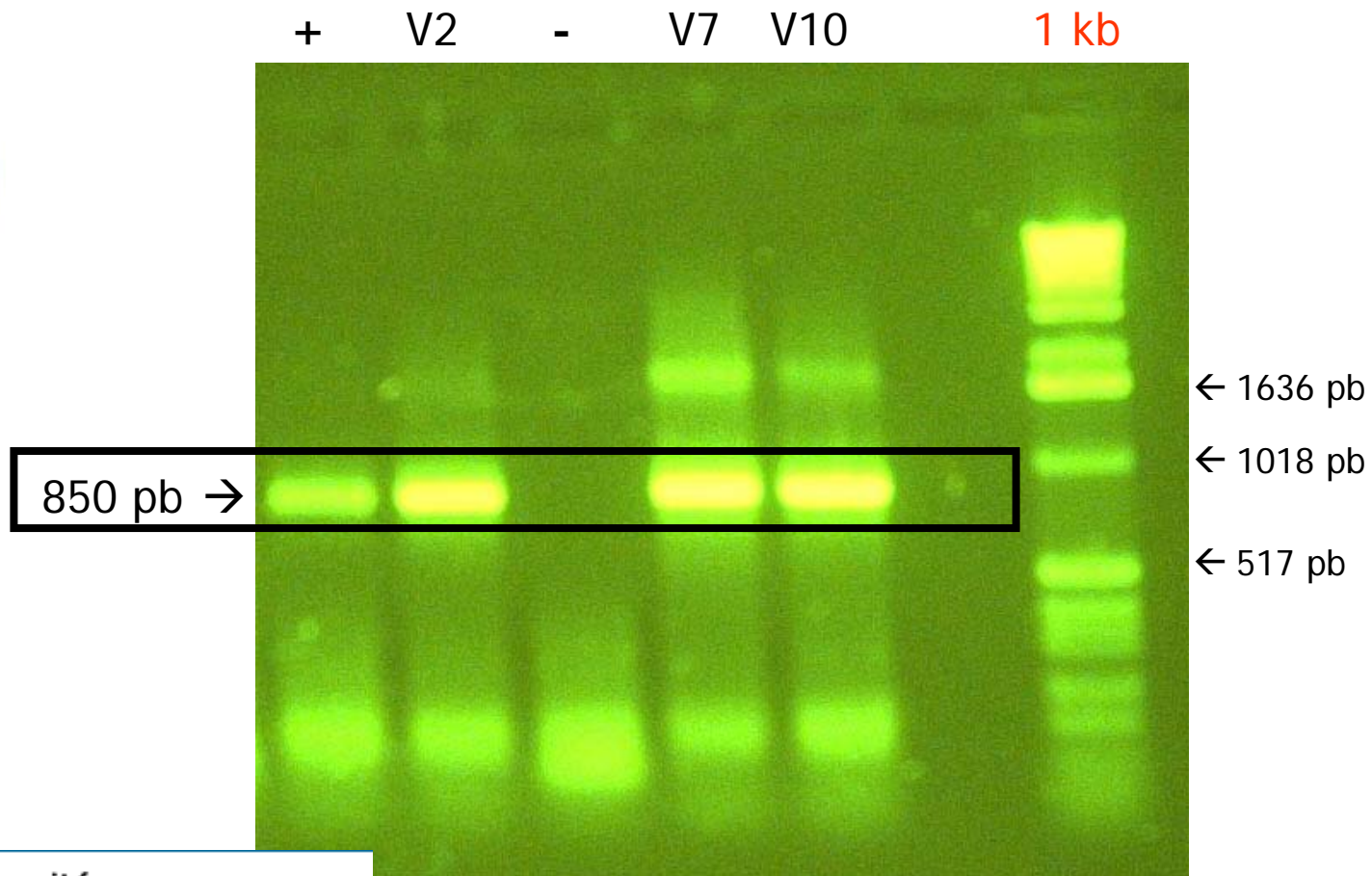
FITC (oocystes totaux)



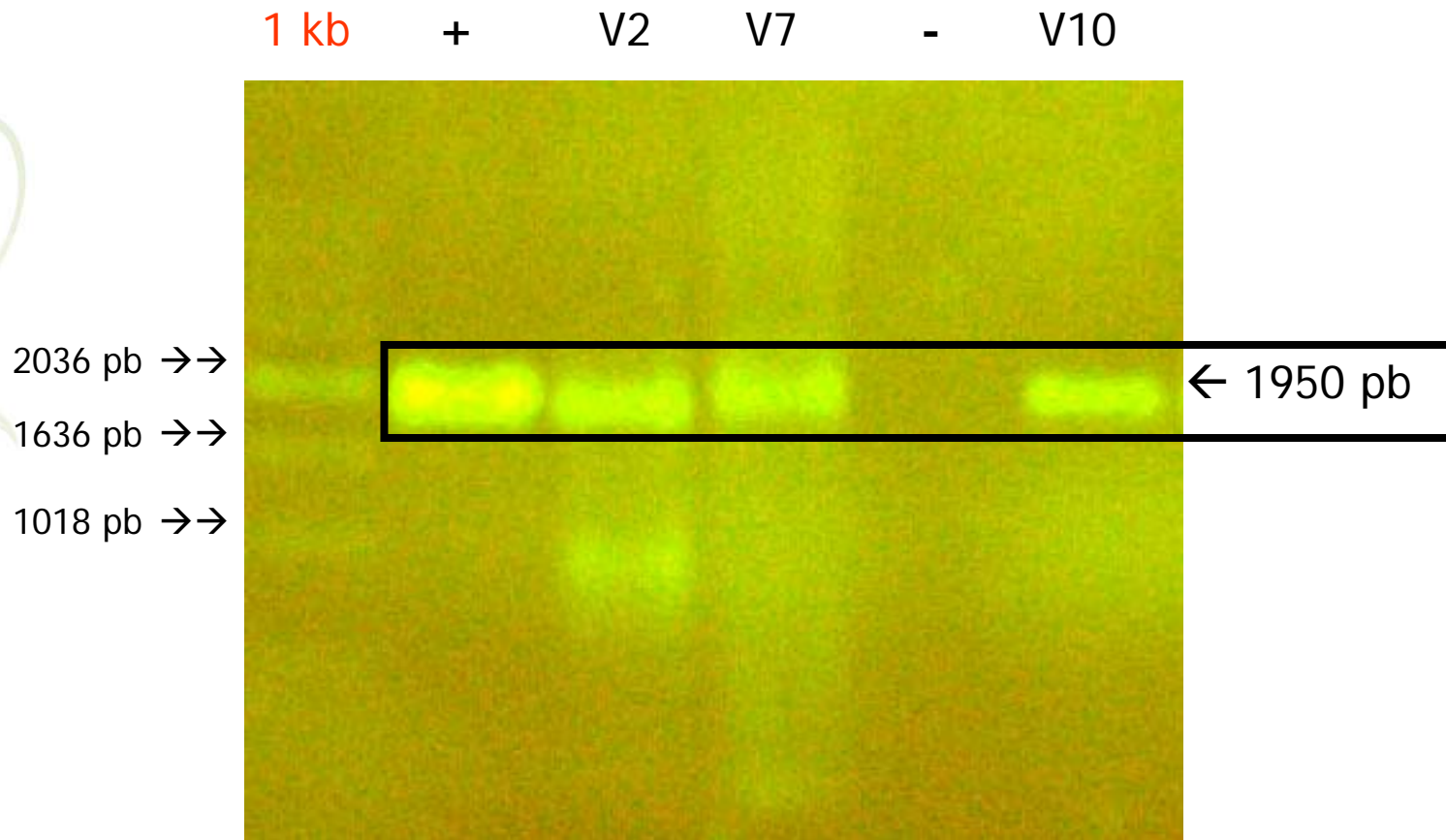
DAPI (unités viables)



Migration du fragment de 850 pb du gène GP60 sur gel d'agarose 1%



Migration du fragment de 1950 pb du gène HSP70 sur gel d'agarose 1%



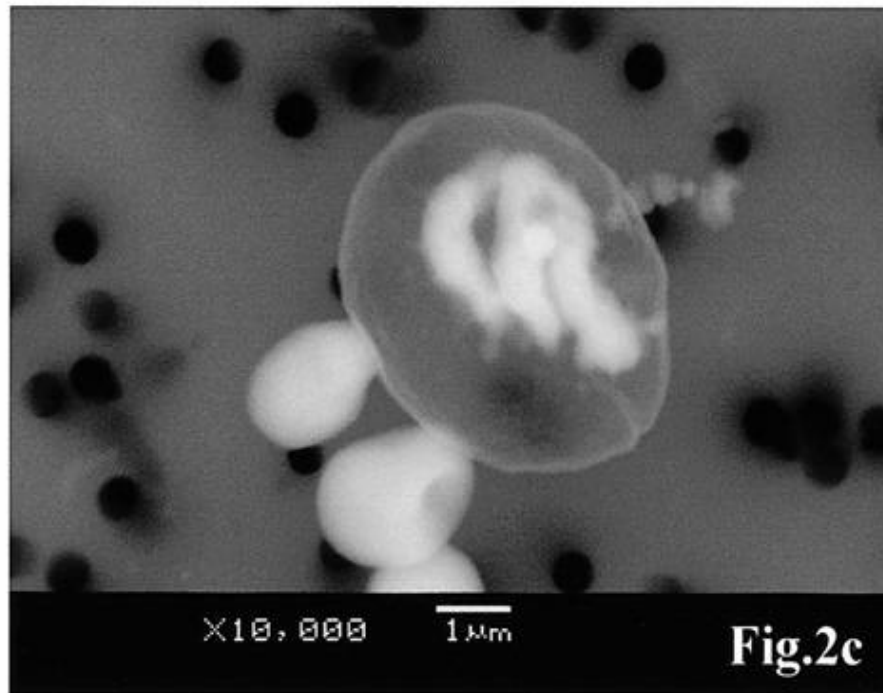
Résultats du séquençage

Homologie de 100 % observée entre les *Cryptosporidium parvum* provenant de WaterBorne® et ceux récoltés à partir des veaux infectés

- Aucun nucléotide différent entre les oocystes obtenus après 2, 7 et 10 passages
- Même conclusion pour les deux gènes d'intérêt étudiés

Étude des modifications du phénotype de *Cryptosporidium parvum* après 10 passages

Étude du profil protéique par SDS-PAGE/Western blots: pas de différence après 10 passages (!)



Méthodologie / Résultats

Objectif 5

Caractériser l'exposition aux parasites des résidents de bassins versants agricoles via l'eau de consommation provenant de puits privés

Résultats - eau de consommation -

Année	Nombre total d'échantillons prélevés	Nombre d'isolats détectés par IF		Nombre d'isolats détectés par PCR	
		<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia</i>
2005	33	1	1	9	8
2006	33	0	1	-----	-----

En 2005, chacun des 11 puits a été trouvé positif à *Cryptosporidium* et/ou *Giardia* au moins une fois dans l'été.

En 2006, un seul puits a été trouvé positif à *Giardia* par immunofluorescence.

10 puits artésiens (62 à 200 ') et 1 puits de surface (8 ')
2 puits chlorés, 9 non-traités

Discussion

- **Détection & caractérisation génétique difficiles**

- quantité d'ADN
- présence importante d'inhibiteurs
- spécificité des amorces

- **Génotypes « inconnus »**

- pathogénéicité ?
- variabilité géographique ?
- 100 % = même génotype ?

-Augmentation des connaissances de la distribution des génotypes dans la région et au Québec:

-Méthode très discriminante pour *Giardia*: utilisation potentielle lors d'investigation épidémiologique avec espace/temps plus réduit

Conclusions

- ***Cryptosporidium*** et ***Giardia*** sont omniprésents dans plusieurs niches écologiques dans les régions étudiées.
- L'utilisation de techniques de caractérisation génétique (PCR-RFLP, séquençage de gènes variables) déjà utilisées dans d'autres études pour attribuer des sources de contamination n'a pas permis l'identification des sources de contamination des eaux dans cette étude
 - *Cryptosporidium* très stable
 - *Giardia* très (trop) variable
- Les parasites sont fréquemment retrouvés dans l'eau de consommation pour l'humain dans la région étudiée
 - Grande variabilité selon les années



Merci !

irda

10 années fertiles en
solutions !

Les gènes d'intérêts de *Cryptosporidium*

- GP60

- Gène codant pour un précurseur des glycoprotéines gp15 et gp40, impliquées toutes deux dans l'attachement et l'invasion du parasite dans l'entérocyte



Les gènes d'intérêts de *Cryptosporidium*



- GP60

- Très polymorphe

- Amplification d'un fragment de 900 pb et d'un autre de 800 à 850 pb par la suite (Nested PCR)



Les gènes d'intérêts de *Cryptosporidium*



- HSP70

- Gène codant pour la « Heat Shock Protein » 70
- Très polymorphe
- Possibilité d'amplifier un fragment de 2015 pb puis un autre de 1950 pb (Nested PCR) selon la méthode de Xiao
- Efficacité des amorces compromise à cause de leur grande hétérogénéité

Stage à Perth - Australie



Dr. Andrew Thompson



Plan expérimental

1. Infection successive de bovins nouveau-nés (10 passages) par *C. parvum* et *C. muris*
 - Souches provenant de la compagnie privée WaterBorne™, Inc.®
2. Traitement des échantillons :
 - Récolte des fèces de veaux infectés
 - Filtration sur gaze : retrait des débris fécaux
3. Immunocapture : concentration des oocystes
 - (kit Dynal® d'immunobilles)
4. Détection par immunofluorescence
 - (Kit Merifluor® et colorants FITC et DAPI)
5. Amplification par PCR
 - Extraction d'ADN (Kit Qiagen® ; sur colonnes)
 - Nested-PCR (HSP70 et GP60)
6. Séquençage et comparaison de l'homologie