

# Dynamique de *Cryptosporidium* et *Giardia* en bassins versants agricoles

## Introduction

*Cryptosporidium* spp et *Giardia* spp sont des parasites pouvant causer de sévères gastro-entérites chez l'humain. La cryptosporidiose peut être fatale chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli. Elle est aussi responsable de pertes économiques importantes au Québec puisqu'elle peut causer des mortalités chez le veau. Une des problématiques de santé publique associées 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.

Les bovins sont actuellement reconnus comme étant la principale source 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. Les bovins adultes peuvent excréter *Cryptosporidium* et *Giardia* via leurs matières fécales sans présenter les symptômes de la maladie. Au Québec, les pourcentages de troupeaux de bovins laitiers positifs à *Cryptosporidium* et *Giardia* ont été évalués à 88,7 % et 45,7 % respectivement <sup>(1)</sup>. Ces parasites sont par ailleurs fréquemment détectés dans les eaux de surface du Québec et d'Amérique du Nord <sup>(2, 3)</sup>. Ils peuvent aussi se retrouver dans les eaux souterraines après des inondations <sup>(4)</sup>. Une importante épidémie de cryptosporidiose survenue à Milwaukee, en 1993, a atteint près de 400 000 personnes, causant environ 70 mortalités, ce qui en fait la plus importante épidémie d'origine hydrique répertoriée aux États-Unis. Au Québec, on a rapporté 14,85 cas de giardiose par 100 000 habitants en 1999. De telles statistiques ne peuvent être compilées pour la cryptosporidiose puisqu'il ne s'agit pas d'une maladie à déclaration obligatoire au Canada.

La faune pourrait agir comme source d'infection pour les animaux d'élevage lorsque ceux-ci s'abreuvent d'eau non-filtrée (par exemple lorsque les producteurs agricoles donnent de l'eau de surface non-traitée aux bovins qui sont au champ, loin des sources d'eau potable). D'un autre côté, les épandages de fumiers pourraient contribuer à la contamination des sources d'eau en milieu agricole auxquelles les animaux sauvages ont accès, maintenant ainsi un cycle de transmission de ces parasites entre les animaux de la faune et les animaux d'élevage. Par conséquent, le risque pour l'humain pourrait être accru.

Des techniques de caractérisation génétiques 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 <sup>(5, 6)</sup>. À titre d'exemple, le gène COWP (*Cryptosporidium* oocyst wall protein), peut être amplifié et par la suite soumis à une l'enzyme de restriction *Rsal* pour produire des profils génotypiques caractéristiques de: *Cryptosporidium wrairi*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. bailey*, *C. parvum* génotype I (présent chez les bovins et l'humain) et 2 (spécifique à l'humain), ainsi que *C. parvum* spécifique au porc, au chien et à la souris <sup>5,7</sup>. En ce qui a trait à *Giardia*, 2 assemblages génétiques majeurs ont été rapportés dans la littérature <sup>8,9</sup>. L'assemblage A est constitué d'un ensemble d'isolats, dont le groupe A-I qui comprend des isolats animaux et humains et le groupe A-II constitué d'isolats humains <sup>9</sup>. L'assemblage B

comprend des isolats à prédominance humaine et certains animaux dont le castor<sup>8</sup>. À ces groupes se sont par la suite ajoutés les assemblages C et D (chien), E (bovins, mouton, chèvre, porc), F (chat) et G (porc). Une étude récente a montré que le PCR-RFLP ciblant un gène de la  $\beta$ -giardin soumis à l'enzyme de restriction *HaeIII* permettait de distinguer des isolats de *Giardia* appartenant à un même assemblage<sup>6</sup>. Les travaux antérieurs réalisés par notre équipe ont démontré que le séquençage du fragment de 384 pb du gène  $\beta$ -giardin permettait de distinguer les isolats provenant des porcs de ceux des bovins<sup>11</sup>.

**Problématique.** Peu de travaux avaient jusqu'à présent été effectués au Québec en utilisant des méthodes de caractérisation génotypique et phénotypique de *Cryptosporidium* et *Giardia*. De plus, on dispose de très peu de données dans la littérature en ce qui a trait à la caractérisation génotypique et phénotypique d'isolats de *Cryptosporidium* et *Giardia* provenant d'animaux sauvages. Nous connaissons donc mal la part de l'agriculture et des animaux de la faune comme source de contamination de l'eau par *Cryptosporidium* et *Giardia* en milieu agricole au Québec. Plusieurs évidences suggèrent que *Cryptosporidium* et *Giardia* peuvent être transmis entre plusieurs espèces animales et à l'humain. Nous n'avons cependant pas les moyens de déterminer si la présence d'empreintes génétiques différentes pour des isolats de parasites retrouvés chez différents hôtes signifie qu'ils peuvent varier leurs profils génétiques et/ou phénotypiques suite à un passage chez un nouvel hôte afin de mieux s'adapter à celui-ci, ou encore si les parasites sont spécifiques envers leur hôte et ne peuvent donc être transmis d'une espèce animale à l'autre. Il est aussi nécessaire de mieux connaître la voie agroenvironnementale de transmission de ces parasites.

**Objectifs.** Face à cette problématique, les objectifs initiaux de ce projet étaient de :

- 1- Caractériser des isolats de *Cryptosporidium* et de *Giardia* provenant de matières fécales d'animaux d'élevage et sauvages de bassins versants agricoles.
- 2- Détecter et caractériser *Cryptosporidium* et *Giardia* 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 *Cryptosporidium* et *Giardia* 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 à *Cryptosporidium* et *Giardia* des résidents de bassins versants agricoles via l'eau de consommation provenant de puits privés.

**Méthodologie et résultats.** Trois bassins versant agricoles (6-9 km<sup>2</sup>) tributaires de la rivière aux brochets (Montérégie est) ont été ciblés dans le cadre de cette étude. Les bassins versants du ruisseau aux castors et 2 sous-bassins du ruisseau Wallbridge ont été ciblés.

**Objectif 1.** Caractériser des isolats de *Cryptosporidium* et de *Giardia* provenant de matières fécales d'animaux d'élevage et sauvages de bassins versants agricoles. Un total de 167 échantillons ont été analysés, dont la moitié représentant les animaux d'élevage et l'autre moitié les animaux sauvages. La détection de *Cryptosporidium* et *Giardia* a été faite par IC-PCR (immunocapture et réaction de polymérase en chaîne) et immunofluorescence. La détection de *Cryptosporidium* par PCR a été faite en utilisant les amorces CRY-9 et CRY-15 amplifiant le gène COWP (*Cryptosporidium oocyst wall protein*), selon les conditions d'amplification décrites dans la littérature<sup>5</sup>. Le gène amplifié a été par la suite soumis à l'enzyme de restriction *RsaI*. Les profils de restriction

obtenus suite à cette digestion ont été comparés selon les espèces animales à l'origine des isolats de *Cryptosporidium* détectés.

Pour la détection de *Giardia lamblia*, un gène de 384 pb de la  $\beta$ -giardin a été amplifié selon les conditions décrites dans la littérature<sup>6</sup>. Le gène amplifié a été soumis à l'enzyme de restriction *HhaI* pour produire les patrons de restriction correspondant aux isolats de *Giardia* provenant des différentes espèces animales.

Pour chaque échantillon de matière fécale, une technique d'immunofluorescence a été faite parallèlement au PCR pour la détection de *Cryptosporidium* et *Giardia*.

**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                                  | 18             |
| Porcines        | 5  | 3                                   | 3              |
| Avicoles        | 1  | 1                                   | 1              |

**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>Crypto.</i>                        | <i>Giardia</i> | <i>Crypto.</i>                         | <i>Giardia</i> |
| <b>Bovin laitier (≥ 1 an)</b>    | <b>36</b>                   | 3                                     | 2              | 20                                     | 30             |
| <b>Bovin laitier (&lt; 1 an)</b> | <b>32</b>                   | 1                                     | 6              | 16                                     | 28             |
| <b>Porc</b>                      | <b>10</b>                   | 9                                     | 3              | 4                                      | 3              |
| <b>Volaille</b>                  | <b>11</b>                   | -                                     | -              | 5                                      | 9              |
| <b>Chevreuril</b>                | <b>39</b>                   | 1                                     | 5              | 4                                      | 4              |
| <b>Oie blanche</b>               | <b>12</b>                   | -                                     | -              | -                                      | -              |
| <b>Raton laveur</b>              | <b>12</b>                   | -                                     | 1              | 1                                      | 4              |
| <b>Rat musqué</b>                | <b>4</b>                    | 1                                     | 3              | -                                      | 1              |
| <b>Castor</b>                    | <b>5</b>                    | -                                     | -              | -                                      | 1              |
| <b>Chat</b>                      | <b>3</b>                    | -                                     | 1              | 2                                      | 2              |
| <b>Chien</b>                     | <b>3</b>                    | -                                     | -              | 2                                      | 2              |

**Objectif 2. Détecter et caractériser *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les fumiers épandus et dans l'eau de bassins versants agricoles.**

Au cours des deuxièmes et troisième années de projet, la détection et la caractérisation de *Cryptosporidium* et *Giardia* a été faite à partir des fumiers épandus sur les champs des bassins à l'étude. Des échantillons d'eau de surface d'un volume de 10 litres ont été prélevés dans chaque bassin à toutes les deux semaines de mai à octobre, ainsi que lors des événements de ruissellement (suite à des pluies importantes). La mesure des débits de l'eau permettait d'obtenir des charges ponctuelles de parasites retrouvés dans l'eau (débit x concentration).

La détection des parasites dans les fumiers a été faite tel que décrit à l'objectif 1. La détection des parasites dans l'eau se fera dans un premier temps en concentrant les (oo)kystes par filtration avec le filtre Envirocheck tel que recommandé par l'EPA<sup>10</sup> et immunocapture. Après l'éluion, les (oo) kystes ont été détectés par immunofluorescence et PCR, en utilisant les amorces ciblées à l'objectif 1.

**Tableau 3 : Nombre d'isolats détectés par IF et PCR dans les échantillons de fumiers épandus en 2005**

| Espèces animales     | Nombre total d'échantillons | Nombre d'échantillons positifs par IF |                |
|----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|----------------|
|                      |                             | <i>Cryptosporidium</i>                | <i>Giardia</i> |
| <b>Bovin laitier</b> | <b>18</b>                   | 2                                     | 6              |
| <b>Porc</b>          | <b>9</b>                    | 6                                     | 6              |

**Tableau 4 : Nombre d'isolats détectés par IF dans les échantillons de fumiers épandus en 2006**

| Espèces animales     | Nombre total 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> |
| <b>Bovin laitier</b> | <b>21</b>                 | 6                                     | 6              | 5                                      | 6              |
| <b>Porc</b>          | <b>6</b>                  | 4                                     | 4              | 1                                      | 3              |
| <b>Volaille</b>      | <b>1</b>                  | 1                                     | -              | -                                      | 1              |

**Tableau 5. Isolats de *Cryptosporidium* et de *Giardia* détectés dans l'eau de surface**

| Date d'échantillonnage <sup>1</sup>  | Ruisseau aux Castors |                 | Ruisseau Wallbridge |        |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------|---------------------|--------|
|                                      | IF                   | PCR             | IF                  | PCR    |
| 5 avril 2005                         |                      | G+ <sup>2</sup> |                     | C+, G+ |
| 6 juin 2005                          | G+                   | C+, G+          |                     |        |
| <b>15 juin 2005</b>                  | C+                   |                 |                     |        |
| 27 juin 2005                         | C+                   |                 | G+                  |        |
| 13 juillet 2005                      | G+                   | C+, G+          | G+                  | C+, G+ |
| 20 juillet 2005                      | G+                   | G+              | G+                  | C+     |
| 10 août 2005                         | G+                   |                 | G+                  | C+, G+ |
| 24 août 2005                         |                      |                 | G+                  |        |
| <b>1<sup>er</sup> septembre 2005</b> |                      |                 |                     |        |
| <b>26 septembre 2005</b>             |                      | G+              |                     | G+     |
| <b>17 octobre 2005</b>               |                      |                 |                     |        |
| <b>16 novembre 2005</b>              |                      |                 |                     |        |
| <b>10 avril 2006</b>                 | G+                   |                 |                     |        |
| 1 <sup>er</sup> mai 2006             | C+, G+               |                 | G+                  |        |
| 15 mai 2006                          | G+                   |                 | C+, G+              |        |
| <b>23 mai 2006</b>                   |                      |                 | G+                  |        |
| <b>12 juin 2006</b>                  | G+                   |                 | C+, G+              |        |
| 26 juin 2006                         | C+, G+               |                 | G+                  |        |
| 18 juillet 2006                      | C+, G+               |                 | G+                  |        |
| 8 août 2006                          | G+                   |                 | C+, G+              |        |
| 22 août 2006                         |                      |                 | C+, G+              |        |
| 11 septembre 2006                    | C+, G+               |                 | C+, G+              |        |
| 25 septembre 2006                    | C+, G+               |                 | C+, G+              |        |
| 10 octobre 2006                      |                      |                 | C+, G+              |        |
| <b>24 octobre 2006</b>               | C+, G+               |                 | G+                  |        |

<sup>1</sup> Les dates inscrites en caractère gras signifient que l'échantillonnage s'est effectué suite à un événement de ruissellement

<sup>2</sup> Un résultat positif à *Giardia* s'inscrit G+ tandis qu'un résultat positif à *Cryptosporidium* s'inscrit C+. Les résultats sont des combinaisons des 2 et 3 sites d'échantillonnage pour les bassins aux Castors et Wallbridge, respectivement.

**Objectif 3.** Préciser le rôle de la faune et des fumiers comme source de *Cryptosporidium* et *Giardia* pour l'eau en milieu agricole. Le PCR-RFLP décrit à l'objectif 1 pour *Cryptosporidium* et *Giardia* a été utilisé pour caractériser génétiquement les isolats trouvés dans l'eau afin de cibler la(les) espèce(s) animale(s) ayant potentiellement agi comme source de parasites dans l'eau. Étant donné que des génotypes différents ont été observés en 2005 chez différentes espèces animales dont celles d'origine faunique, il n'a pas été possible d'établir de lien entre les parasites détectés chez les animaux et ceux retrouvés dans l'eau. L'analyse des échantillons prélevés en 2006 a été modifiée afin de tenter de d'améliorer la caractérisation. En effet, l'analyse d'un fragment d'ADN plus grand chez *Cryptosporidium* et de gènes différents pour les deux parasites a permis une meilleure discrimination entre les isolats provenant d'espèces animales différentes. Les résultats issus de l'analyse de ces nouveaux gènes n'a toutefois pas

permis de lier les isolats à une source précise de contamination étant donné la grande stabilité du phénotype observé entre les différentes espèces.

**Objectif 4.** Préciser l'impact du passage de *Cryptosporidium* chez le veau sur le profil génotypique et phénotypique de ce parasite. Cet objectif visait à déterminer si le phénotype et le génotype de *Cryptosporidium* est stable chez l'hôte. Si oui, lorsque l'on retrouve plusieurs génotypes dans l'environnement cela indiquerait des sources de contamination diverses et non une adaptation de la souche à l'hôte. Effectivement, après une série de 10 passages de *C. parvum* in vivo chez des veaux, l'isolat retrouvé possédait, au niveau du séquençage de 2 gènes (gp60, hsp70) réputés variables, exactement la même séquence nucléotidique qu'au début, alors qu'au niveau du phénotype, tel qu'évalué par Western blot, une très faible variation dans l'intensité de certaines protéines (probablement causée par un changement dans leur expression) a été notée. Ceci indique que le génotype de *C. parvum* est très stable. À noter que malgré plusieurs essais, il n'a pas été possible de produire une infection permettant au parasite de se reproduire chez le bovin en utilisant des souches de *C. muris*, ce qui suggère que cette espèce n'a pas de pouvoir pathogène ou d'adaptation chez le bovin.

**Objectif 5.** Caractériser l'exposition à *Cryptosporidium* et *Giardia* des résidents de bassins versants agricoles via l'eau de consommation provenant de puits privés. L'analyse de l'eau provenant de 11 puits situés chez 6 producteurs agricoles a permis de démontrer la présence des parasites dans l'eau de consommation. 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. Étant donnée la présence importante des parasites dans les puits échantillonnés, il est permis de suggérer que l'exposition des résidents des bassins versants est non-négligeable. L'échantillonnage de l'eau provenant d'un plus grand nombre de puits permettrait toutefois de mieux décrire la situation réelle.

**Références** 1- Ruest, N., G. M. Faubert, and Y. Couture. 1998. *Can. Vet. J.* 39 : 697-700. ; 2- Wallis, P.M., S.I. Erlanderson, J.I. Issac-Renton, M.E. Olson, W.J. Robertson et H. Van Keulen. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8) : 2789-2797. ; 3- Payment, P., A. Berte, M. Prévost, B. Ménard et B. Barbeau. 2000. *Can. J. Microbiol.* 46 : 565-576. ; 4- Moe, C. L. 2001. Waterborne transmission of infectious agents. Tiré de : *Manual of environmental quality* (Hurst, ed.) ASM Press, Washington. ; 5- Spano, F., L. Putignani, J. McLauchlin, D.P. Casemore et A. crisanti. 1997. *FEMS microbiol. Lett.* 150 : 209-217. ; 6- Caccio, S., W. Homan, K. van Dijk et E. Pozio. 2002. *Int. J. Parasitol.* 32: 1023-1030.; 7- Xiao, L., J. Limor, U.M. Moragn, I.M. Sulaiman, R.C.A. Thompson et A.A. Lal. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (12): 5499-5502.; 8-Adam, R.D. 2001. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 447-475.; 9- Thompson, R.C., R.M. Hopkins, W.L. Homan. 2000. *Parasitol. Today.* 16: 210-213.; 10-EPA. 1999. Method 1623, EPA-821-R-99-006; 11- Guay, K. 2003. Mémoire de maîtrise. 80 p. Université de Montréal.