

SOMMAIRE

Sommaire.....	7
Liste des figures	9
Liste des tableaux	10
Introduction	11

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation du parasite	13
A. Morphologie	13
B. Classification	14
C. Biologie	16
D. Cycle évolutif	17
E. Résistance dans l'environnement.....	19
II. Epidémiologie	19
A. Prévalence	19
B. Sources et modalités de l'infestation	20
C. Facteurs prédisposants	20
III. La maladie.....	20
A. Aspects cliniques	20
B. Lésions.....	21
C. Physiopathologie et pathogénie.....	21
D. Diagnostic	23
E. Traitement.....	25
F. Prophylaxie	25
G. Aspects zoonotiques	26

PARTIE EXPERIMENTALE

I.	Matériels et méthodes	29
A.	Elevage et gestion des chiens	29
B.	Collecte des selles	29
C.	Score fécal	30
D.	Recherche de <i>Giardia</i>	30
E.	Recherche d'autres agents.....	32
F.	Traitement des données.....	32
II.	Resultats	33
A.	Prévalence de <i>Giardia</i>	34
B.	Pathogénicité de <i>Giardia</i>	37
III.	Discussion et perspectives	39
A.	Méthode diagnostique	39
B.	Caractéristiques des chiots	41
C.	Résultats	41
	Conclusion	456
	Références bibliographiques	46
ANNEXES		
	Annexe 1 : Protocole pour l'utilisation du kit ProSpecT® <i>Giardia</i> Microplate Assay.....	57
	Annexe 2 : Grille de scoring fécal appliquée aux selles de l'étude.....	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Giardia</i> , forme trophozoïte d'après BARON, 1996	13
Figure 2 : <i>Giardia</i> , forme kyste d'après BARON, 1996	14
Figure 3 : Taxonomie simplifiée du genre <i>Giardia</i> (BEUGNET, et al., 2000).....	15
Figure 4 : Cycle évolutif de <i>Giardia</i> d'après ERLANDSEN et al., 2002	17
Figure 5 : Désenkystement de <i>Giardia</i> , échelle 2 µm (ERLANDSEN et al., 2002)	18
Figure 6 : Division binaire et obtention des trophozoïtes. La flèche et l'astérisque correspondent respectivement à un disque ventral et une paire de flagelles en formation, échelle 5µm (ERLANDSEN et al., 2002).....	18
Figure 7 : Age des chiots inclus dans l'étude.....	33
Figure 8 : Répartition des prélèvements selon leur statut vis-à-vis de <i>Giardia</i> et leur nombre par chiot	33
Figure 9 : Prévalence et niveau d'infestation de <i>Giardia</i> en fonction de l'âge des chiots	35
Figure 10 : Infestation par <i>Giardia</i> en fonction de la race, par tranche d'âge	36
Figure 11 : GMQ moyen en fonction de l'âge et de la race des chiots	38
Figure 12 : Association de <i>Giardia</i> avec CPV 2 et <i>Isospora ohioensis</i>	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Sensibilité et spécificité des tests pour la détection de l'infection par <i>Giardia</i> - d'après ROBIN, 2011	24
Tableau 2 : Score fécal anormal en fonction de la race et l'âge des chiots (GRELLET, et al., 2012)	30
Tableau 3 : Prévalence de <i>Giardia</i> en fonction de l'âge des chiots	34
Tableau 4 : Répartition des prélèvements positifs	34
Tableau 5 : Proportion de portées possédant au moins un positif selon leur taille	35
Tableau 6 : Score fécal moyen (valeur absolue) selon la race, l'âge, et le statut <i>Giardia</i> des chiots	37

INTRODUCTION

Encore sous-estimée il y a quelques années, la giardiose est désormais considérée comme l'une des parasitoses intestinales les plus répandues chez le chien (LEIB et al., 1999 ; BEUGNET et al., 2000 ; VILLENEUVE et al., 2000 ; HERZOG, 2002). Le plus souvent asymptomatique, elle peut aussi se traduire cliniquement par une forme chronique associant un syndrome de malabsorption/malassimilation et de la diarrhée, ou par une forme aiguë, plus rare, avec diarrhée aqueuse incoercible (BARR et BOWMAN, 1994). Les jeunes sont particulièrement réceptifs et sensibles à cette infection (BOURDEAU, 1993).

Certains lieux de vie comme les collectivités (chenils, élevages, animaleries) constituent un facteur de risque important et encouragent la forte contagiosité du parasite. Par ailleurs, là où la pression d'infection est forte, les troubles observés sont souvent le résultat d'une association avec d'autres pathogènes, parasitaires ou viraux (FRANC et al., 1997 ; BEUGNET et al., 2000 ; ROBIN, 2011).

Notre étude porte sur l'infection par *Giardia duodenalis* chez le chiot en période de sevrage. Cette période correspond à une phase de stress, en particulier nutritionnels, qui bouleversent l'équilibre du chiot. Les diarrhées de sevrage ont un impact à la fois sur l'hygiène de l'élevage et sur la croissance (et donc de la morbidité/mortalité et la vente) des chiots. L'objectif de notre travail était d'évaluer l'influence de l'âge et de la race du chiot sur la prévalence de l'infection par *Giardia*, les conséquences de l'infection sur le score fécal et la croissance, et enfin le lien avec l'infection par le parvovirus canin, autre pathogène digestif majeur du chiot.

PARTIE 1 :
LA GIARDIOSE CANINE

I. PRESENTATION DU PARASITE

A. Morphologie (BARLOUGH, 1979 ; KIRKPATRICK, 1987 ; BARR et al., 1994)

Giardia est un protozoaire flagellé qui se présente sous deux formes : l'une active, le trophozoïte ; l'autre végétative, le kyste.

Le trophozoïte est en forme de goutte, avec une extrémité postérieure effilée (Figure 1) ; il mesure 6-8 μ m x 12-15 μ m. Ses faces ventrale et dorsale, respectivement concave et convexe, lui confèrent une forme de croissant en coupe histologique. La face ventrale est munie d'un disque adhésif permettant au parasite de demeurer en surface des cellules épithéliales digestives. Le trophozoïte est binucléé ; il possède quatre paires de flagelles assurant sa mobilité, et, transversalement, deux agrégats denses de microtubules et protéines contractiles : les corps médians. En coproscopie, cette forme est rarement observable, hormis lors d'examen direct de selles fraîches.

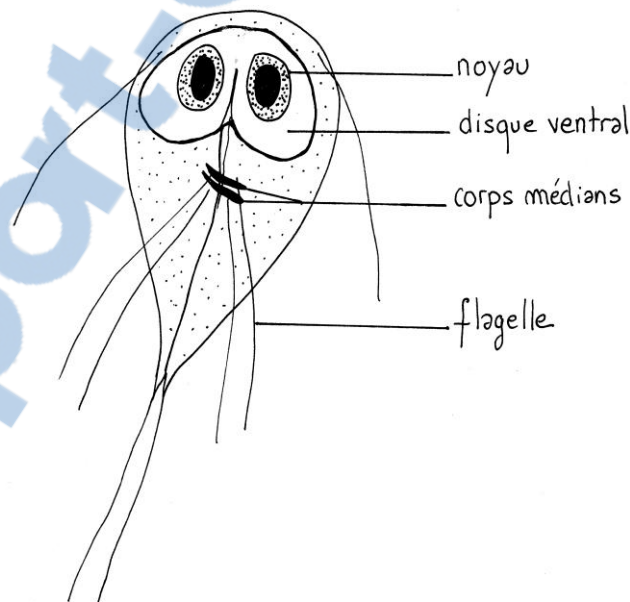


Figure 1 : *Giardia*, forme trophozoïte d'après BARON, 1996

Le kyste, végétatif, est la forme de résistance et de contamination du parasite ; il est émis dans les matières fécales. De forme sub-sphérique, il mesure 7-10µm x 8-12µm et contient deux ou quatre noyaux selon son stade de maturité (Figure 2). Les résidus de flagelles et de corps médians qu'il renferme correspondent à deux trophozoïtes incomplètement formés.

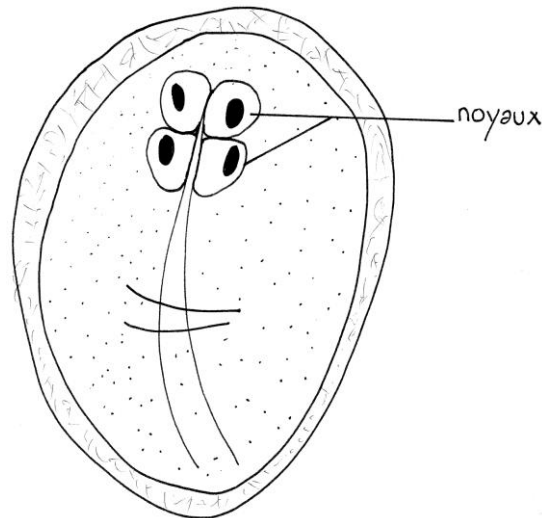


Figure 2 : *Giardia*, forme kyste d'après BARON, 1996

B. Classification

Le genre *Giardia* est étudié pour la première fois en 1859 par Vilem Lambl, bien que son nom actuel ne lui ait été donné que bien plus tard. Il faut attendre 1952 pour qu'un professeur américain, F.P. Filice, se penche sur la taxonomie de ce protozoaire (figure 3), posant au passage les bases d'une controverse qui se poursuit toujours (VAN KEULEN, 2002).

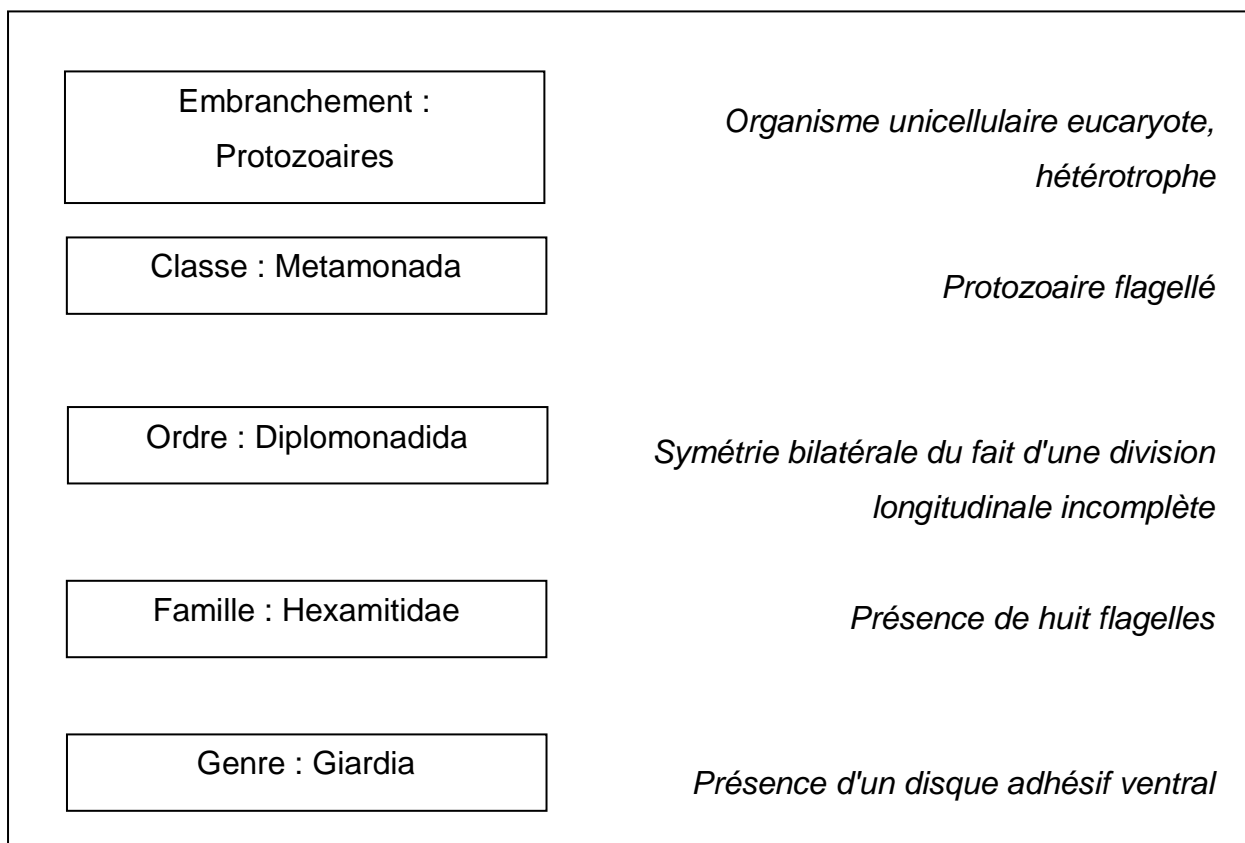


Figure 3 : Taxonomie simplifiée du genre *Giardia* (BEUGNET et al., 2000)

En effet, bien que connu depuis plus d'un siècle et demi, le genre *Giardia* est toujours l'objet d'une certaine ambiguïté concernant sa nomenclature et sa spécificité d'hôte. Aujourd'hui, on s'accorde sur l'existence de cinq espèces, caractérisées par un spectre d'hôte variable (ADAMS et al., 2002 ; THOMPSON et al., 2000a) :

- *G. agilis* (amphibiens)
- *G. muris* (rongeurs)
- *G. duodenalis* (nombreux mammifères domestiques et sauvages, homme inclus)
- *G. psitacci* et *G. ardeae* (oiseaux).

Cette distinction repose essentiellement sur la forme du trophozoïte, la taille relative du disque adhésif ventral par rapport aux cellules, et la forme des corps médians (cf. Figure 1) (MONIS et al., 1999). Plus récemment, les progrès dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis une nouvelle approche phylogénétique, par des critères basés sur la conservation de certains loci et l'ARN ribosomal. Ainsi, une sixième espèce a été décrite, *Giardia microti*, qui infecte les rats musqués et les campagnols (THOMPSON et al., 2000b).

La plus cosmopolite de ces espèces est *Giardia duodenalis*, qui infecte un très large éventail de mammifères et inclut selon les références six (THOMPSON et al., 2000a) à une douzaine (SOLARCZYK, 2009) de génotypes différents. Deux d'entre

eux seulement (génotypes A et B) ont un spectre d'hôte large, comprenant les carnivores domestiques et l'homme, les autres étant plus spécifiques (MONIS et al., 2003).

Le génotype A est lui-même divisé en deux groupes : A-I et A-II. Le premier, A-I, correspond à un génotype retrouvé à la fois chez l'homme et l'animal (EY et al., 1996), tandis que le second, A-II, était longtemps connu pour être retrouvé exclusivement chez l'homme (THOMPSON et al., 2000a). C'est sur A-I que s'est donc concentrée l'attention concernant une potentielle transmission zoonotique du protozoaire. Toutefois, plus récemment, une étude a montré l'existence du groupe A-II chez des animaux domestiques au Mexique (PONCE-MACOTELA et al., 2002).

C. Biologie

Giardia est un parasite de l'intestin grêle des hôtes qu'il colonise. Chez le chien, *G. duodenalis* vit dans la portion duodénale à jéjunale (THOMPSON et al., 1993). Il semble que la localisation soit dépendante du régime alimentaire : riche en glucides, il favoriserait une fixation dans une partie plus antérieure par rapport à un régime riche en protéines (BARR et BOWMAN, 1994). Le parasite se nourrit d'éléments prélevés par pinocytose dans le contenu du tube digestif (BARLOUGH, 1979). Les glucides constituent la source principale d'énergie de ce protozoaire au métabolisme anaérobie (THOMPSON et al., 1993).

Les trophozoïtes se fixent à la base des villosités de la bordure en brosse, sur l'épithélium intestinal, formant un véritable tapis (KIRKPATRICK, 1987 ; ZAJAC, 1992). La fixation est permise grâce au disque adhésif ventral, selon un phénomène de succion entretenu par le mouvement des flagelles, et aussi par des interactions entre protéines membranaires du parasite (ex : lectine) et protéines des entérocytes (ex : trypsine) (BEUGNET et al., 2000a). Les trophozoïtes peuvent s'enfoncer dans la *lamina propria* mais on ne les retrouve pas, en revanche, dans les cryptes glandulaires (BEUGNET et al., 2000a).

Certains restent libres dans la lumière de l'intestin grêle, où ils se multiplient de façon asexuée par division binaire selon un plan de clivage longitudinal. Cette reproduction aboutit à la formation de deux cellules-filles identiques (KIRKPATRICK, 1987).

D. Cycle évolutif

Le cycle de *Giardia* (Figure 4) est direct (monoxène), et fait alterner les deux formes du parasite : le trophozoïte, forme de multiplication, et le kyste, forme de dissémination et de résistance (KIRKPATRICK et al., 1982 ; BARR et al., 1994).

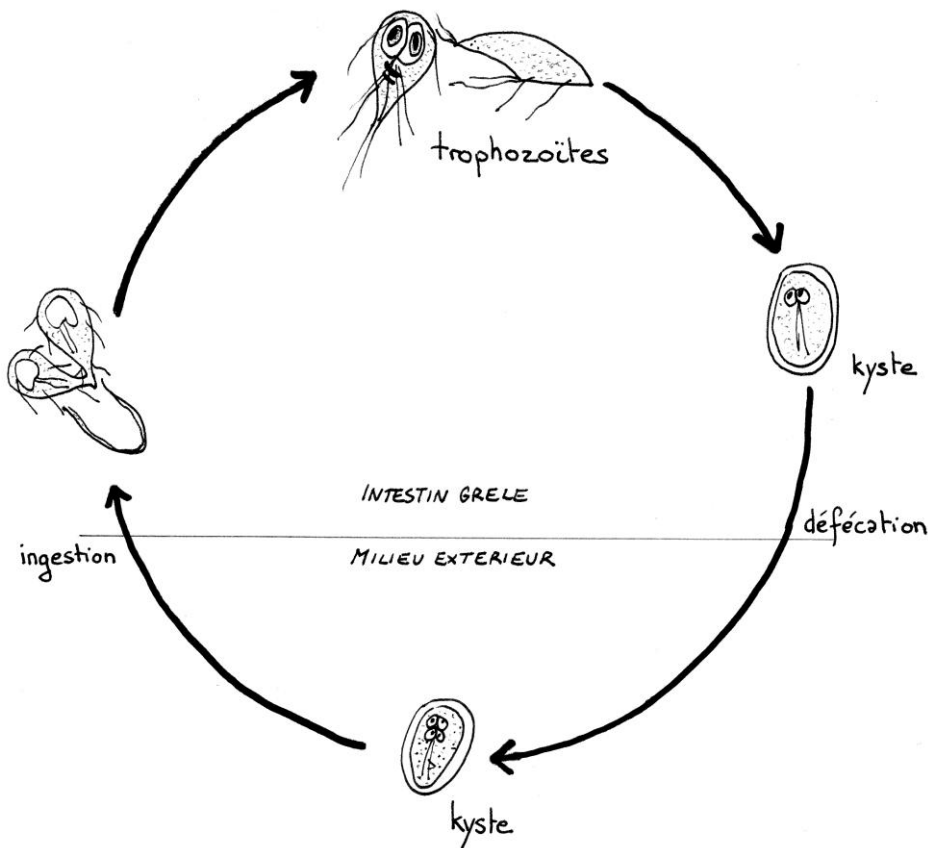


Figure 4 : Cycle évolutif de *Giardia* d'après ERLANDSEN et al., 2002

L'infestation débute par l'ingestion de la forme kystique du parasite par l'hôte. Quelques dizaines de kystes peuvent suffire (DECOCK, 2002). Après une exposition aux sucs gastriques et pancréatiques, un désenkystement a lieu dans la lumière duodénale et une paire de trophozoïtes incomplètement divisés apparaît (Figures 5 et 6). Le désenkystement prend généralement moins de dix minutes *in vitro*. La division, quant à elle, demande au moins sept à huit minutes (ERLANDSEN et al., 2002).

Rapidement, après séparation et maturation, les trophozoïtes viennent adhérer à la bordure en brosse des villosités intestinales. Ensuite, la sécrétion de bile par l'hôte serait à l'origine de la claustration de trophozoïtes à l'intérieur d'une membrane constituée en grande partie de N-acétylgalactosamine, formant ainsi les kystes (GILLIN et al., 1987 ; SCHUPP et al., 1987 ; JAROLL et al., 1989). Cette

transformation se fait probablement progressivement au cours du passage de l'intestin grêle jusqu'au côlon et prend entre 12 et 14h (KIRKPATRICK, 1987 ; LEIB et al., 1999 ; ERLANDSEN et al., 2002). En l'absence de tout organe d'adhésion, les kystes sont expulsés dans les matières fécales, permettant ainsi la propagation de l'infection à de nouveaux hôtes, soit par transmission féco-orale directe, soit par ingestion d'eau ou d'aliments souillés (KIRKPATRICK, 1987).

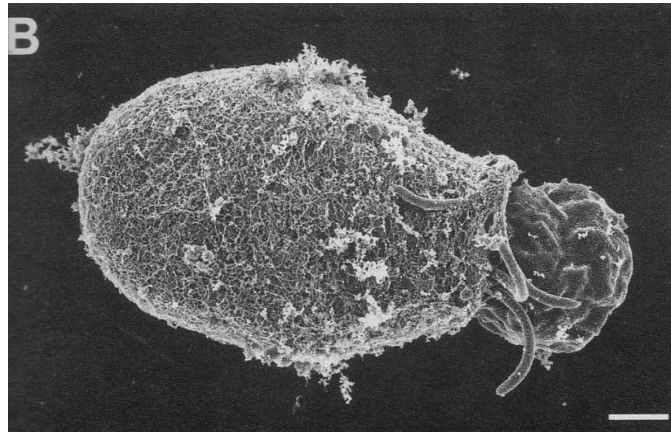


Figure 5 : Désenkystement de *Giardia*, échelle 2 μm (ERLANDSEN et al., 2002)

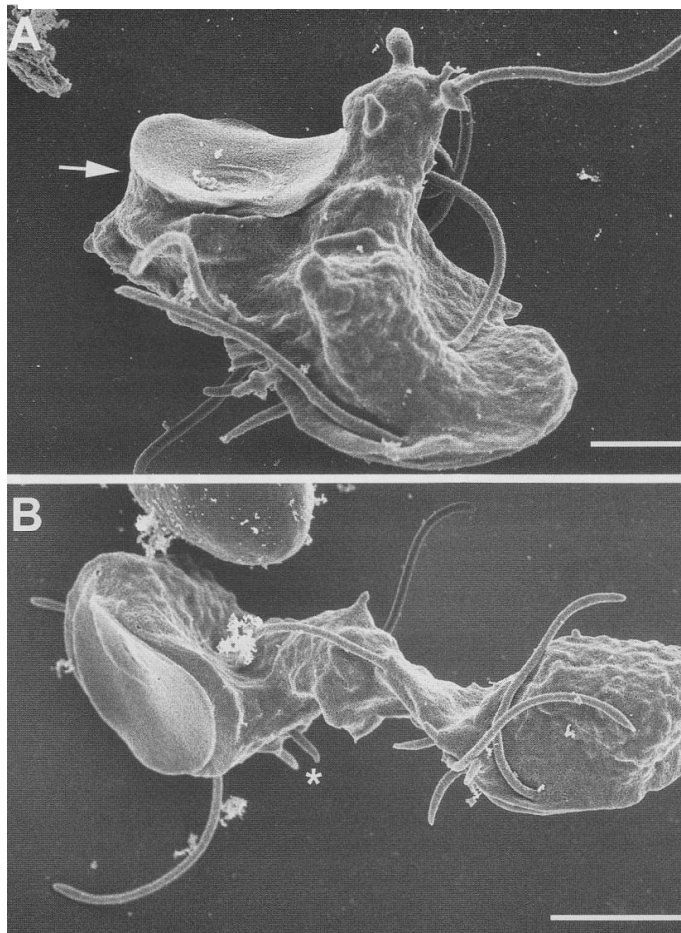


Figure 6 : Division binaire et obtention des trophozoïtes. La flèche et l'astérisque correspondent respectivement à un disque ventral et une paire de flagelles en formation, échelle 5 μm (ERLANDSEN et al., 2002).

La période prépatente est de 5 à 10 jours chez le chien et l'excrétion des kystes, intermittente (KIRKPATRICK, 1987). Elle peut néanmoins être massive (jusqu'à 10^6 kystes /g de selles chez l'homme) et ce, pendant plusieurs mois (DECOCK, 2002).

E. Résistance dans l'environnement

Les kystes sont la forme de résistance du parasite dans le milieu extérieur. Ils demeurent toutefois relativement fragiles. Dans un environnement humide à froid positif, ils peuvent survivre pendant plusieurs semaines (2 mois à 8°C, 1 mois à 21°C, 4 jours à 37°C). Ils sont par contre sensibles à la sécheresse et désinfectants usuels comme les ammoniums quaternaires (KIRKPATRICK, 1984 et 1986 ; BEUGNET et al., 2004). Les kystes résistent également au traitement de l'eau courante par le chlore ou le permanganate de potassium ; en revanche, l'eau de mer diminue leur viabilité (BOURDEAU, 1993 ; BROWN, et al., 1999).

II. EPIDEMIOLOGIE

A. Prévalence

Giardia est un protozoaire cosmopolite. La prévalence de portage du parasite est cependant très variable selon le statut des animaux considérés (jeunes/adultes), leur mode de vie (divagation/élevage/particulier...), la zone géographique, et la méthode de détection employée. Ainsi, des études menées au Canada, aux Etats-Unis et en Allemagne sur des cohortes de plusieurs milliers de chiens ont montré des prévalences respectives de 7,2%, 7,5%, et 16,5% (JACOBS et al., 2002 ; ZISLIN et al., 2002 ; BARUTZKI, 2002). Les chiens errants, comme ceux qui vivent au sein d'un groupe de congénères (chenils, animaleries, laboratoires) apparaissent plus fréquemment parasités par *Giardia* (HEWLETT, 1982 ; KIRKPATRICK, 1987). Dans toutes les populations, le facteur âge semble revêtir une importance particulière, avec une prévalence significativement plus élevée chez les jeunes (<6 mois) (KIRKPATRICK, 1987 ; BEUGNET, 1996 ; VILLENEUVE et al., 2000). En France, une enquête menée en région parisienne sur 93 chiens montrait par exemple 30,4% de chiens infestés chez les individus de moins de six mois, contre 7,1% au-delà (BEUGNET et al., 2000). Dans une autre étude, canadienne, 73% des individus porteurs de *Giardia* ont moins de 1 an (JACOBS et al., 2002). Des facteurs de sensibilité liés à la race ou au sexe n'ont jusqu'ici pas été mis en évidence (KIRKPATRICK, 1987).

B. Sources et modalités de l'infestation

Les sources du parasite sont les animaux excréteurs, qu'ils soient cliniquement atteints ou porteurs sains. L'ingestion de kystes, qui sont immédiatement infestants après émission, est à l'origine de l'infection (voie féco-orale) (LEIB et ZAJAC, 1999). Le trophozoïte n'est pas l'élément infestant, bien que ceci reste possible expérimentalement (HEWLETT, 1982).

La transmission peut être directe via des fèces contaminées (coprophagie, flairage au contact...) ou indirecte par une eau de boisson ou une alimentation souillée. Le risque augmente en cas d'hygiène dégradée. Il est donc particulièrement accru dans un contexte de forte densité, comme les chenils et les élevages canins (KIRKPATRICK, 1987 ; BARR et al., 1994 ; LEIB et ZAJAC, 1999).

C. Facteurs prédisposants

Le jeune âge est un facteur particulièrement favorisant de l'infestation (SEILER et al., 1983 ; KIRKPATRICK, 1984 ; SWAN et THOMPSON, 1986 ; BARUTZKI, 2002 ; JACOBS et al., 2002 ; ZISLIN et al., 2002). Plus infestés, les jeunes chiens sont également plus sensibles que les adultes (BEUGNET et al., 2000a ; JACOBS et al., 2002). Compte tenu de ces données, il semble qu'une certaine résistance de l'hôte se mette en place suite à l'exposition, et/ou qu'intervienne une maturation du système immunitaire. Chez des chiens adultes de race Beagle, il existe une corrélation négative significative entre le niveau sérique en IgA et la présence du protozoaire dans les selles (KIRKPATRICK, 1987). Le corollaire de ces données serait que toute diminution de l'immunité, par le stress (donc en période de pénétration) ou une maladie intercurrente, pourrait être un facteur du portage de *Giardia*.

Certains facteurs extrinsèques sont liés à la biologie du parasite. Ainsi, l'humidité du milieu permet la survie des kystes selon une durée qui décroît avec la température (deux mois à 8°C, un mois à 21°C, quatre jours à 37°C) (BEUGNET et al., 2000a).

III. LA MALADIE

A. Aspects cliniques

Les symptômes sont exprimés en moyenne une semaine après l'ingestion des kystes, mais avec une grande variabilité d'un individu à l'autre (BEUGNET et al., 2000a). En effet, la grande majorité des chiens infestés par *Giardia* demeurent

asymptomatiques, en particulier les adultes (HEWLETT, 1982 ; BARR et al., 1994). Par exemple, dans une étude menée au Canada, 78% des chiens porteurs de *Giardia* ne présentaient pas de diarrhée (JACOBS et al., 2002). Lorsque des signes cliniques apparaissent, ils se manifestent le plus souvent par une diarrhée du grêle. La présence de méléna est possible mais rare (LEIB et ZAJAC, 1999).

Si la diarrhée ne se résout pas d'elle-même, les selles prennent ensuite un aspect stéatorrheux, pâle et une odeur nauséabonde ; ces signes sont liés au syndrome de maldigestion-malabsorption causé par le parasite (BARR et BOWMAN, 1994). Les cas les plus graves peuvent être accompagnés d'anorexie, léthargie et déshydratation. Occasionnellement, des vomissements aigus peuvent avoir lieu. Toutefois, la plupart des individus restent en bon état général, apyrétiques, et conservent leur appétit habituel (LEIB et ZAJAC, 1999).

L'évolution peut devenir chronique, avec des selles modérément moulées la plupart du temps et une diarrhée épisodique. Dans ce cas, il est possible d'observer une dégradation lente de l'état général vers la cachexie, alors même que l'appétit est conservé voire augmenté (LEIB et ZAJAC, 1999).

B. Lésions (BEUGNET et al., 2000a ; THOMPSON et al., 1993)

Les lésions associées à la giardiose peuvent être variables en termes d'intensité et de localisation précise. Elles concernent l'épithélium digestif du duodénum au jéjunum.

Macroscopiquement, on observe une entérite catarrhale. A l'histologie, on décèle une augmentation de la taille des cryptes glandulaires, et surtout, un raccourcissement des villosités. L'inflammation locale se traduit par un infiltrat lymphocytaire massif, avec régulièrement présence de macrophages et granulocytes. Il est possible d'observer quelques trophozoïtes enfouis dans la *lamina propria*.

C. Physiopathologie et pathogénie (BURET et al., 2002)

En dépit de l'ubiquité du protozoaire, la pathogénie de l'infection à *Giardia duodenalis* ne demeure que partiellement élucidée. A l'heure actuelle, on considère que les désordres causés par l'infection sont à l'origine de l'instauration progressive d'un syndrome de maldigestion-malabsorption, dont les manifestations cliniques sont une diarrhée, une perte de poids, des douleurs abdominales. Divers mécanismes interviennent, intéressant directement le parasite aussi bien que des facteurs liés à l'hôte, sans qu'il soit pour l'instant possible d'expliquer la survenue de symptômes chez certains individus tandis que d'autres restent porteurs sains.

1. Altération de la surface d'échange

Le point le mieux connu de la physiopathologie de l'infection est la modification de la structure et du fonctionnement des entérocytes. En effet, une des altérations les plus souvent et anciennement rapportées est une carence en disaccharides (BELOSEVIC et al., 1989 ; FAUBERT et al., 1990 ; BURET et al., 1990). *Giardia* provoque également un dysfonctionnement d'autres enzymes digestives dont lipase, trypsine, lactase et amylase (FERGUSON et al., 1990 ; KATELARIS et al., 1991 ; BURET, 1994). Ces dysfonctionnements induits par *Giardia* ont pu être détectés *in vitro* et *in vivo*, suite à une exposition aussi bien à des parasites vivants que lysés (BURET et al., 1992 ; FAVENNEC et al., 1991). La longueur des microvillosités est également diminuée, de façon très significative (BURET et al., 1991). Il est intéressant de constater que les modifications ont lieu sur l'ensemble de la muqueuse épithéliale de l'intestin grêle, et pas uniquement sur les zones d'adhésion des trophozoïtes (BURET et al., 1992). Le raccourcissement des microvillosités, en diminuant la surface d'échange, pourrait expliquer la malabsorption de certains électrolytes, nutriments et de l'eau (BURET et al., 2002). Lors de giardiose, l'apoptose des entérocytes est fortement augmentée (GILLON et al., 1982). Le renouvellement important des cellules épithéliales pourrait conduire à des défauts de transport de certains nutriments, à cause d'une immaturité des cellules. Dans certains cas, l'infection cause aussi une diminution de l'activité de la lipase, ce qui expliquerait la stéatorrhée occasionnelle (GUPTA et MEHTA, 1973).

2. Effet cytopathique

Il semble exister un effet cytopathique sur les entérocytes de l'hôte directement lié à des produits d'excrétion/sécrétion du parasite. En effet, des vésicules situées sur la face dorsale des trophozoïtes pourraient relarguer des protéases, bien que la nature exacte de celles-ci et leur rôle précis soit encore à clarifier (LINDMARK, 1988 ; HARE et al., 1989 ; PARENTI, 1989).

3. Rôle de l'immunité

Parallèlement, il apparaît que la réponse immunitaire de l'hôte est au moins partiellement responsable de l'altération de la bordure en brosse qui accompagne l'infection. En effet, l'activation des lymphocytes T semble étroitement liée au raccourcissement des microvillosités intestinales, lequel est à terme responsable du syndrome de maldigestion-malabsorption (FARTHING, 1997 ; FAUBERT, 2000 ; SCOTT et al., 2000). Les mécanismes précis d'une telle action restent toutefois en suspens.

Un autre type cellulaire intervenant dans l'instauration des lésions est le mastocyte, effecteur primaire des allergies. L'infection par *Giardia* résulte en la production et la circulation d'immunoglobulines E (IgE) sériques, spécifiques du parasite (ROJAS et al., 1989 ; FAUBERT, 2000). Par ailleurs, chez des enfants

parasités par *Giardia*, on observe une augmentation significative des concentrations circulantes en IgE spécifiques d'allergènes alimentaires, mais pas des IgE dirigés contre des allergènes environnementaux comme les acariens (DI PRISCO et al., 1993). De plus, chez l'homme, la giardiose clinique augmente significativement le risque de développement d'allergie et d'urticaire (CLYNE et al., 1989 ; DI PRISCO et al., 1998). Ainsi, lors de giardiose, une lésion communément observée est l'hyperplasie de la *lamina propria* contenant les mastocytes intestinaux (MARSHALL, 1993). Ces derniers seraient donc directement impliqués dans les phénomènes d'hypersensibilité aux allergènes alimentaires et aux réactions inflammatoires de type allergique de l'intestin ou de la peau rapportées dans les cas d'infection à *Giardia* (VENNKATESAN et al., 1997 ; BURET et al., 2002).

4. Réarrangement du cytosquelette

D'autres recherches ont montré que le parasite réarrangerait le cytosquelette des entérocytes, possiblement via des produits d'excrétion/sécrétion. Le cytosquelette est le support structurel des cellules épithéliales, notamment des microvillosités apicales. On y trouve en particulier des complexes d'actine F-myosine. Or, il a été montré que lors d'infection par *Giardia*, comme dans d'autres infections (*E. coli* entéropathogène, *Clostridium difficile*), on pouvait observer une floculation de l'actine F. Cette perturbation de la structure même de la protéine était visualisable avec des parasites vivants comme avec des extraits lysés (TEOH et al., 2000). Ce phénomène pourrait être dépendant du calcium intracellulaire des entérocytes (TEOH et al., 2000). Un faisceau d'études sur le sujet convergerait vers une perturbation par *Giardia* de plusieurs protéines supplémentaires du cytosquelette, comme l'alpha-actinine, la villine et l'eitrine (TEOH et al., 1999 et 2000). Pour l'instant, les conséquences exactes de ces réarrangements du cytosquelette des entérocytes sont inconnues (BURET et al., 2002).

D. Diagnostic (BEUGNET et al., 2000)

Le diagnostic clinique demeure difficile et aléatoire, bien que certains signes, comme une stéatorrhée, une diarrhée chronique sur plusieurs jours à semaines entrecoupée de phases de rémission, puissent orienter le praticien vers une giardiose. Un diagnostic différentiel avec les autres causes de diarrhée chronique doit être envisagé, notamment : infestation parasitaire, entérites bactériennes (généralement pyrétiques), et, chez le jeune chien, insuffisance pancréatique exocrine (LEIB et ZAJAC, 1999).

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence dans les selles des kystes de *Giardia* (KIRKPATRICK, 1987). La positivité de l'échantillon peut être difficile à obtenir dans la mesure où l'excrétion des kystes est intermittente. Aussi, lors de suspicion de giardiose associée à un premier résultat coproscopique négatif,

on prendra soin de procéder à une nouvelle analyse de selles quatre à cinq jours plus tard. Le nombre de kystes peut être très variable, selon que l'animal est porteur asymptomatique ou présente une giardiose clinique. Dans le second cas, l'élimination de kystes généralement massive permet assez aisément leur mise en évidence après enrichissement (ZIMMER et BURRINGTON, 1986). La technique la plus utilisée est la méthode de flottation (BARR et al., 1992). Celle-ci fait intervenir un liquide de forte densité (sulfate de zinc ou de magnésium). Il est possible d'utiliser également des colorants à base d'iode (ex : lugol) se fixant dans la paroi des kystes : ceux-ci deviennent alors plus facilement discernables, même à faible grossissement, par une teinte orange marquée.

Les kystes de *Giardia* peuvent également être recherchés dans du liquide d'aspiration duodénal (lors de laparotomie ou d'endoscopie par exemple) ou de lavement colique (BARR et al., 1992 ; ZAJAC, 1992). La première option demeure toutefois relativement invasive, ce qui limite son utilisation en pratique.

Des méthodes immunologiques permettent aujourd'hui de diagnostiquer une giardiose, même si elles sont davantage usitées en médecine humaine.

L'immunofluorescence directe utilise un anticorps monoclonal fluorescent pour détecter les kystes de *Giardia* dans les selles. Chez l'homme, cette technique est aussi efficace que la coproscopie par flottation (DECOCK et al., 2003b) ; en revanche, la nécessité d'un microscope à fluorescence en limite l'utilisation aux seuls laboratoires de diagnostic.

Il existe aussi des kits ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) utilisables à des fins diagnostiques pour *Giardia*, basés sur la recherche d'antigènes spécifiques du parasite dans les matières fécales. Ces kits ont été développés au départ pour l'homme. Outre leurs excellentes sensibilité et spécificité (tableau 1), un intérêt majeur est que l'antigène détecté est émis de façon continue dans les selles de l'individu porteur, contrairement aux kystes dont l'excrétion est intermittente.

Tableau 1 : Sensibilité et spécificité des tests pour la détection de l'infection par *Giardia* - d'après ROBIN, 2011

Test diagnostique	Sensibilité	Spécificité	Référence
ELISA	100%	96%	(RIMHANEN-FINNE et al. 2007)
Snap <i>Giardia</i> Test, IDEXX	95%	99%	(LIU, SEE et SONG, 2008)
Snap <i>Giardia</i> Test, IDEXX	92%	99,8%	(EPE, REHKTER, 2010)
ProSpecT®, Alexon-Trend	100%	98,6%	(KATANIK et al. 2001)

E. Traitement

Il n'existe actuellement aucun traitement bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché pour la giardiose des carnivores domestiques. Diverses molécules sont toutefois utilisables : métronidazole (ZIMMER et al., 1986 ; JAYAGOPALA et al., 1992), tinidazole (ZIMMER et BURRINGTON, 1986), ipronidazole (ABBITT et al., 1986), furazolidone (KIRKPATRICK et FARRELL, 1984), quinacrine (ZIMMER et BURRINGTON, 1986), et également de façon plus récente, certains benzimidazoles, dont l'efficacité *in vitro* et *in vivo* a été démontrée dans plusieurs essais (EDLING et al., 1990). Ainsi, l'albendazole (BARR et al., 1993), le fenbendazole (BARR et al., 1994 ; ZAJAC et al., 1998), l'oxfendazole (VILLENEUVE, 2000 ; VILLENEUVE et al., 2000) et le fébantel (associé au pyrantel et au praziquantel) (BARR et al., 1998) ont montré une bonne efficacité.

Le métronidazole (FLAGYL ®, Sanofi-Aventis, Paris, hors AMM) utilisé à 25mg/kg/j pendant 5 jours serait plus efficace que le fenbendazole (PANACUR ®, Intervet-Shering-Plough Animal Health, Angers) à 50mg/kg/j pendant 3 jours (DECOCK et al., 2003b). L'oxfendazole (DOLTHENE ®, Merial, Lyon) et le fébantel (associé au pyrantel et au praziquantel, DRONTAL P ®, Bayer, Loos) seraient quant à eux insuffisants aux posologies anthelminthiques habituellement recommandées (DECOCK et al., 2003b).

Il est probable que, dans une certaine mesure, les échecs thérapeutiques soient imputables à une réinfestation quasi-immédiate des animaux, en particulier en chenil lors des essais cliniques. On notera ainsi la nécessité d'associer au traitement médical (des animaux malades mais aussi des porteurs asymptomatiques) des mesures d'hygiène du milieu.

F. Prophylaxie

La prophylaxie de la giardiose chez les carnivores domestiques fait principalement appel à des mesures sanitaires, qui ne sont pas forcément spécifiques (BOURDOISEAU, 2000). Dans un élevage, on prendra ainsi soin de :

- Préférer des sols facilement nettoyables, dont la nature empêche la persistance de l'eau et des matières fécales
- Respecter le principe de la "marche en avant"
- Procéder à un ramassage et une élimination fréquents des fèces dans les cages, lesquelles seront gardées sèches et propres autant que faire se peut
- Garder les écuelles d'eau en hauteur, afin d'éviter leur contamination par des matières fécales
- Définir un protocole de nettoyage-désinfection strict des cages : détergent puis ammonium quaternaire, séchage systématique après le lavage

- Pratiquer un vide sanitaire entre les lots d'animaux.

Pour les animaux, la prophylaxie repose sur les actions suivantes :

- Mettre en place une quarantaine à l'introduction de nouveaux arrivants, qui seront systématiquement traités
- Dépister la présence de *Giardia* par des coproscopies régulières, et, le cas échéant, traiter l'ensemble des animaux (cliniques et porteurs sains)
- Au début et à la fin du traitement, laver, rincer à l'eau additionnée d'ammonium quaternaire, puis sécher à l'air chaud, le pelage des animaux, afin d'éliminer les kystes présents sur le pelage

Il semble que le lavage des animaux et le changement d'environnement aient une importance considérable dans la réussite du traitement (PAYNE et al. 2002).

Enfin, un vaccin inactivé contre la giardiose canine est commercialisé aux Etats-Unis : Giardia Vax ® (Fort Dodge Animal Health, Overland Park, Kansas, USA). Sa protection clinique est annoncée comme de 100% contre l'apparition des symptômes liés au parasite. Il diminue également l'excrétion des kystes par les animaux vaccinés pendant un an. Un rappel annuel est préconisé (OLSON et al., 2000). Le vaccin serait utile en particulier dans un contexte de population à risque (chenils, élevages...), en zone d'endémie, et pour les chiens exposés ou ayant fait l'objet d'une recontamination fréquente (BEUGNET et al., 2000a ; OLSON et al., 2002). Le vaccin Giardia Vax ® n'est toutefois pas commercialisé en France.

G. Aspects zoonotiques

Seule l'espèce *Giardia duodenalis* est retrouvée chez l'homme et la plupart des mammifères domestiques (chiens, chats, bovins, ovins, porcs, chevaux notamment). Il s'agit là du parasite intestinal le plus fréquemment rencontré chez l'homme dans les pays développés (THOMPSON, 2002). En 1996, l'Organisation Mondiale de la Santé dénombrait en Asie, Afrique et Amérique latine 200 millions de personnes atteintes de giardiose clinique avec quelques 500 000 nouveaux cas rapportés chaque année (THOMPSON, 2002). La plupart du temps, une eau contaminée est à l'origine de l'infection, ce qui fait de *Giardia* une préoccupation majeure de santé publique (LEVINE et al., 1990 ; THURMAN et al., 1998). Le rôle des animaux dans la contamination de l'eau est difficile à établir, mais la suspicion d'une transmission possible de l'animal à l'homme est très forte, notamment grâce aux avancées en épidémiologie moléculaire (cf supra I A). Le risque zoonotique serait ainsi plus élevé pour le génotype A, en particulier le A-I, et dans une moindre

mesure, le génotype B (THOMPSON, 2002). Restent toutefois à déterminer la fréquence et les circonstances d'une telle transmission.

Une étude canadienne publiée en 1993 et visant à déterminer les génotypes de *Giardia* retrouvés chez l'homme et le castor vivant dans une même zone géographique suggère que le rongeur pourrait constituer une espèce réservoir (ISAAC-RENTON et al. 1993).

En 1997, une étude portant sur l'analyse des génotypes retrouvés chez des chiens et des aborigènes du nord de l'Australie montre que si la prévalence du parasite est très importante (>50% dans les classes d'âge les plus jeunes chez les deux espèces), le génotype diffère entre l'homme et le chien (HOPKINS et al., 1997). Ainsi, dans cette étude, le chien est préférentiellement porteur d'un génotype spécifique de son espèce noté génotype 'dog' (différent du génotype A).

A contrario, en zone urbaine de l'Australie, une étude similaire a montré que les chiens étaient porteurs du génotype A (potentiellement zoonotique) aussi bien que du génotype 'dog' (THOMPSON et al., 1999). Cette étude conclut à une présence probable de deux cycles de transmission du parasite en environnement urbain, dont un, celui du génotype A, constituerait un risque de zoonose entre les chiens et leurs propriétaires. Les différences retrouvées entre ces deux études suggèreraient qu'en cas de prévalence élevée du parasite dans la communauté canine, le génotype de *Giardia* le plus adapté à l'hôte (génotype 'dog') serait prédominant sur tout autre génotype (par exemple le génotype A) par compétition (THOMPSON, 2002). Ainsi, c'est en milieu urbain, où la prévalence semble moins importante, que le risque zoonotique lié aux chiens serait le plus élevé, en particulier *via* des kystes transportés sur le museau ou la fourrure et directement à portée des enfants (THOMPSON, 2002).

Parmi les autres espèces, le bétail pourrait également constituer une source du parasite, en particulier les veaux (THOMPSON, 2000). En effet, plusieurs études ont montré que ceux-ci pouvaient être porteurs à la fois d'un génotype spécifique d'espèce, mais aussi, dans une moindre mesure (<20% des porteurs) du génotype A (O'HANDLEY et al., 2000). La question se pose de savoir si ces animaux pourraient être à l'origine d'une contamination non seulement des éleveurs mais également de l'eau, auquel cas ils constitueraient un important réservoir du parasite (THOMPSON, 2002). Jusqu'ici, cette possibilité n'a pas été avérée par d'autres études épidémiologiques (THOMPSON, 2002).

Notre étude vise dans un premier temps à établir la prévalence de *Giardia* dans une population canine de chiots issus d'un même élevage. L'objectif est par la suite d'évaluer l'influence de l'âge et la race des animaux sur cette prévalence, puis les conséquences de l'infection sur le score fécal et la croissance. Enfin, nous discuterons de l'interaction avec un pathogène digestif majeur du chiot, le parvovirus canin de type 2.

PARTIE 2 :
ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIELS ET METHODES

A. Elevage et gestion des chiens

L'étude est menée dans un élevage canin de grande taille ("Chenil des Quatre Vents" – 62550 Tangry) situé dans le Pas-de-Calais. Il compte environ 300 reproducteurs, de races multiples. Dans notre étude, douze races sont ainsi représentées : trois grandes (Berger allemand, Golden Retriever, Labrador Retriever) et sept petites (Bichon frisé, Bichon maltais, Caniche, Cocker, Lhasa apso, Shih Tzu et Westie).

Les chiennes en gestation sont séparées des autres deux semaines avant la date prévue de parturition et placées en box individuel dans un bâtiment de maternité séparé du reste de l'élevage. Elles y restent jusqu'à ce que les chiots soient âgés de 8 semaines. Ceux-ci demeurent auprès de leur mère et leur fratrie dans le box individuel jusqu'à cet âge, puis ils sont vendus.

La mère et les chiots sont nourris avec une alimentation industrielle (croquettes STARTER ®, Royal Canin, Aimargues, France). Le sevrage a lieu à 6-7 semaines d'âge. Les chiots sont vermifugés selon le protocole suivant :

- Diclazuril (VECOXAN ®, Janssen Animal Health, Beerse, Belgique), 2,5 mg/kg, *per os*, à 5 et 7 semaines
- Fenbendazole (PANACUR ®, Intervet, Beaucouze, France), 50 mg/kg/j pendant 3 jours, *per os*, à 2, 4, 6 et 8 semaines.

Les mères reçoivent simultanément le même traitement.

Les chiots sont vaccinés à 5, 6 et 7 semaines par une injection sous-cutanée de parvovirus canin atténué (PRIMODOG ®, Merial, Lyon, France). Ce protocole d'injections plus rapprochées que ne le préconise l'AMM tient compte de la forte prévalence du virus dans l'élevage.

B. Collecte des selles

La collecte des selles a eu lieu de décembre 2009 à mai 2010, à raison d'une fois par semaine, entre 4 et 9 semaines d'âge. Les chiots sont pesés le jour de la collecte.

Après leur repas, les chiots sont sortis du box et laissés libres dans le couloir, afin d'obtenir une défécation spontanée. Les portées sont sorties les unes après les autres. Au sein d'une même portée, les chiots sont identifiés par des colliers de laine de couleur (une couleur par chiot). Un score (score fécal, *cf infra*) est attribué à chaque selle immédiatement après son émission.

Les prélèvements sont mis en tubes individuels identifiés et conservés à -20°C en attendant leur analyse (avril à juillet 2011).

C. Score fécal

Afin d'apprécier le pouvoir pathogène des parasites et virus recherchés, il est nécessaire de fixer un seuil à partir duquel on considère les troubles digestifs comme effectivement pathologiques. Pour ce faire, une grille de scoring fécal (Annexe 2) est établie et les résultats interprétés d'après les seuils pathologiques déterminés par GRELLET et al. (2011), sur la base d'une altération du Gain Moyen Quotidien (GMQ) des chiots. La valeur seuil est le score le plus élevé significativement associé à une diminution de GMQ. Cette valeur varie selon le format de la race ainsi que l'âge des chiots (Tableau 2).

Tableau 2 : Score fécal anormal en fonction du format de la race et l'âge des chiots (GRELLET et al., 2012)

	4-5 semaines d'âge	6-8 semaines d'âge
Petites races (<10kg adulte)	≤ 6	≤ 7
Grandes races (>25kg adulte)	≤ 5	≤ 5

Ainsi, chez les petites races, les selles seront anormales lorsque leur score sera inférieur ou égal à 6 à 4 et 5 semaines d'âge, et lorsqu'il sera inférieur ou égal à 7 quand le chiot aura entre 6 et 8 semaines.

Les selles dont le score est inférieur ou égal à 5 chez les chiots de grandes races seront considérées comme anormales, quel que soit l'âge.

D. Recherche de *Giardia*

La recherche de *Giardia* dans les fèces recueillies est effectuée à l'aide d'un kit basé sur la technique ELISA sandwich : ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay (Alexon-Trend Inc., Lenexa, Kansas, USA).

L'ELISA est une méthode de diagnostic enzymatique qui repose sur la mise en évidence d'antigènes spécifiques du pathogène recherché. Le kit ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay utilise un anticorps monoclonal pour la détection qualitative d'un antigène spécifique de *Giardia* (GSA 65) dans des extraits aqueux d'échantillons fécaux. Le GSA est une glycoprotéine macromoléculaire (PM 65000 Da) produite en grande quantité par *Giardia duodenalis* au cours de sa prolifération dans l'intestin de l'hôte.

Le kit ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay se présente sous forme d'une plaque de 96 puits au fond desquels sont fixés des anticorps anti-GSA 65. Les tubes sont décongelés à température ambiante. Après avoir préparé des extraits aqueux des échantillons de selles, 200µL de chaque extrait sont déposés dans les puits. Après rinçage, on ajoute un anticorps anti-GSA 65 couplé à une enzyme

(peroxydase de raifort), puis un substrat coloré (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) pour cette enzyme. Si l'antigène GSA 65 est présent, le substrat change de couleur par action enzymatique et devient bleu. Dans le cas inverse, l'absence de fixation du conjugué enzymatique empêche la dégradation du substrat et ainsi le changement de couleur, qui reste jaune.

La lecture de la couleur finale est objectivée par un spectrophotomètre de longueur d'onde 450 nm. Un étalonnage est effectué à chaque début de lecture par la présence de témoins négatifs (deux) et positifs (trois) sur la plaque. Les témoins positif et négatif sont fournis dans le kit et contiennent respectivement :

- Une solution tamponnée contenant l'antigène *Giardia* inactivé et des agents microbiens (positif)
- Une solution tamponnée contenant une teinture rouge et des agents microbiens (négatif).

La validité du témoin positif est sanctionnée par une valeur de densité optique non mesurable par le spectrophotomètre car trop élevée ('Over') ; celle du témoin négatif par des valeurs de densité optique inférieures à 0,150. Ensuite, à partir de la moyenne des puits des deux témoins négatifs, l'appareil établit un "zéro" à partir duquel les valeurs de tous les autres puits sont comparées (ce qui explique des valeurs de densité optique négatives pour certains échantillons).

La valeur de densité optique (DO) du témoin négatif est soustraite de toutes les valeurs obtenues :

- Si la DO d'un échantillon est strictement inférieure à 0,050, le résultat est négatif : pas de GSA 65 dans l'échantillon ou en proportion indétectable. Ceci est la valeur proposée par le fournisseur du kit.
- Si la DO est supérieure ou égale à 0,050, le résultat est positif : présence de GSA 65 dans l'échantillon

Dans ce cas, trois classes ont été constituées :

- Classe 1 : DO comprise entre 0,5 et 1
- Classe 2 : DO comprise entre 1,001 et 2
- Classe 3 : DO strictement supérieure à 2.

Le détail du protocole est présenté en annexe 1.

Une plaque contient 96 puits, dont 5 sont réservés aux témoins. Ainsi, chaque plaque permet l'analyse de 91 échantillons de selles. Dans notre étude, chaque échantillon a été analysé une seule fois. Le temps pour réaliser le test (1 plaque) en pratique avec le kit ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay avoisine cinq heures.

E. Recherche d'autres agents

1. Parasites

Chaque prélèvement est examiné macroscopiquement. Ensuite, une coproscopie par la méthode quantitative de Mac Master (flottation dans une solution de sulfate de magnésium de densité 1,28) est effectuée. *Toxocara canis*, *Isospora canis* et *Isospora Ohioensis* sont recherchés.

2. Virus

Un écouvillonnage rectal est réalisé sur chaque chiot. L'écouvillon est conservé à -20°C jusqu'à son analyse par PCR pour recherche du parvovirus canin CPV-2 (Scanelis, Colomiers, France).

Dans l'analyse statistique, la charge en parvovirus dans les selles est classée de 1 à 4, avec 1 et 2 considérés comme charge "faible" et 3 et 4 comme charge "élevée".

F. Traitement des données

Les analyses statistiques ont été conduites sous le logiciel informatique Excel. La prévalence de *Giardia* a été déterminée. L'effet de l'âge, du sexe, et de la taille de la race, a été étudié à l'aide du test du Khi deux.

Pour l'étude de l'effet de l'âge, la variable continue "âge en semaines" a été mise en deux classes :

- Classe 1 : du début de la 4^{ème} à la fin de la 5^{ème} semaine d'âge
- Classe 2 : du début de la 6^{ème} à la fin de la 8^{ème} semaine d'âge.

Le potentiel pathogène du parasite a été évalué au travers du score fécal et du gain moyen quotidien (GMQ) des chiots. L'effet du parasite sur le score fécal a été étudié par le biais du test du Khi deux (score pathologique ou non) et le test de Student (valeur absolue du score). L'effet sur le GMQ a été étudié par le biais d'un test de Student.

Pour l'étude sur l'effet de *Giardia* sur le GMQ, les animaux ont été classés en trois tranches de poids vif adulte :

- Grande race (poids adulte supérieur à 25kg) : Berger allemand, Golden Retriever, Labrador Retriever
- Petite race (poids adulte compris entre 7kg et 15kg) : Caniche, Cocker, Westie
- Très petite race (poids adulte inférieur à 7kg) : Bichon frisé, Bichon maltais, Lhasa apso, Shih-tzu.

Pour tous les tests réalisés, une valeur de P strictement inférieure à 0,05 a été utilisée comme seuil de significativité.

Enfin, la présence d'autres agents pathogènes (CPV 2, *Isospora ohioensis*) associés à *Giardia* a été recherchée pour en évaluer les conséquences éventuelles sur le score fécal.

II. RESULTATS

Le nombre de chiots inclus dans l'étude s'élève à 271. Au total, ce sont 439 prélèvements de selles qui ont été analysés pour *Giardia*. Les chiots considérés avaient entre 4 et 10 semaines ; la majorité des prélèvements de selles analysés provenaient de chiots âgés de 6 à 8 semaines (Figure 7). 150 chiots ont été prélevés une seule fois, contre 121 l'ayant été plusieurs fois (entre deux et cinq). La répartition de ces prélèvements en fonction de leur résultat vis-à-vis de *Giardia* est présentée dans la figure 8.

Figure 7 : Age des chiots inclus dans l'étude

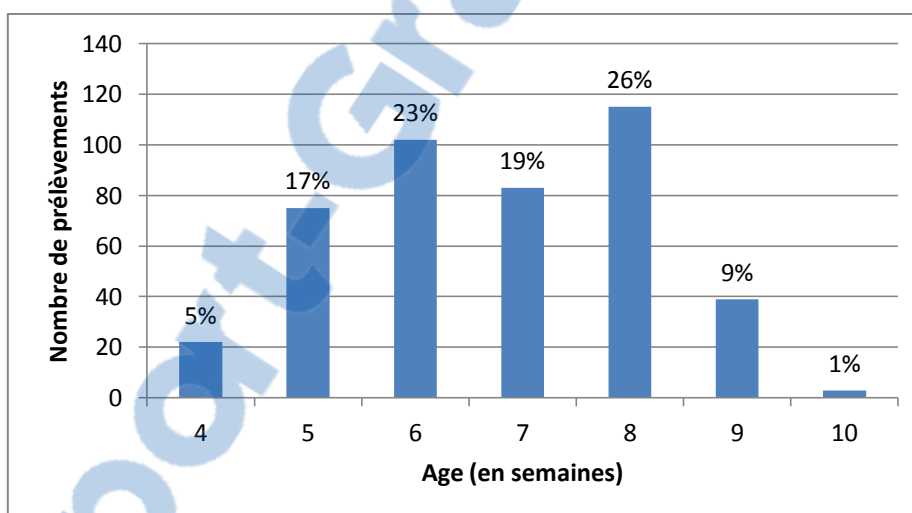
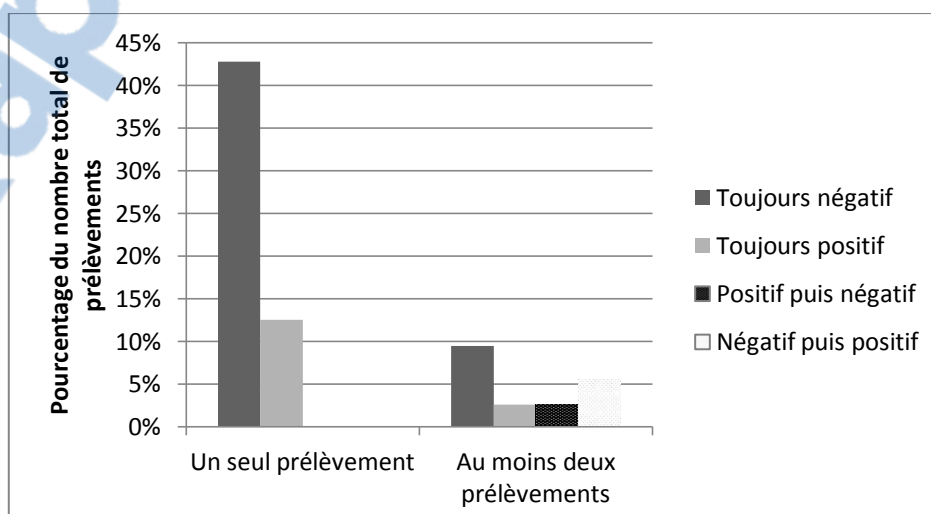


Figure 8 : Répartition des prélèvements selon leur statut vis-à-vis de *Giardia* et leur nombre par chiot



Pour les animaux pour lesquels on a deux prélèvements ou plus, et dont au moins un est positif, on constate que :

- chez 24,1% d'entre eux (7), tous les prélèvements se sont avérés positifs
- chez 24,1% d'entre eux (7), *Giardia* a été éliminé
- chez 51,7% d'entre eux (15), *Giardia* est apparu.

Aucun chiot ne présente une alternance de prélèvements positifs et négatifs, mais seulement 43 individus, soit 15,8% de l'effectif total, ont fait l'objet de trois prélèvements ou plus.

A. Prévalence de *Giardia*

1. Prévalence globale

Dans un premier temps, la prévalence du parasite chez les chiots a été évaluée, sur différentes tranches d'âge (Tableau 3). On constate que la prévalence du parasite augmente avec l'âge des chiots. Si elle est faible à 4 semaines (4,6%), elle atteint 30,8% chez les chiots de 9 semaines.

Tableau 3 : Prévalence de *Giardia* en fonction de l'âge des chiots

Age (sem)	4	5	6	7	8	9	10	Total
Négatifs <i>Giardia</i>	21	68	87	69	88	27	2	362
Positifs <i>Giardia</i>	1	7	15	14	27	12	1	77
Total prélèvements	22	75	102	83	115	39	3	439
Prévalence	4,5%	9,3%	14,7%	16,9%	23,5%	30,8%	33,3%	17,5%

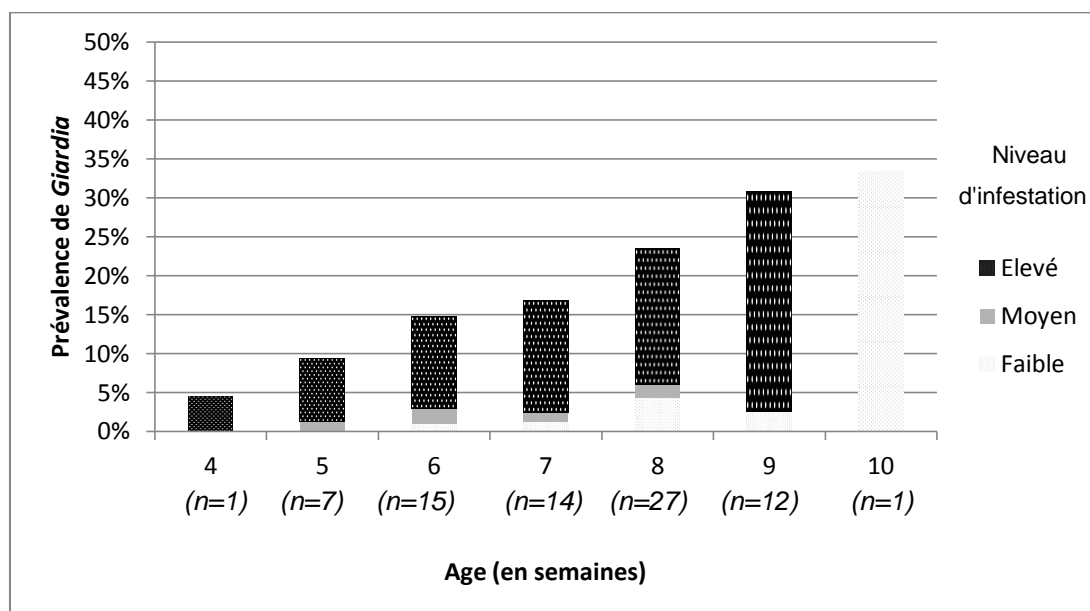
Lorsque les chiots sont infestés, ils le sont pour la grande majorité très fortement : en effet, la proportion d'individus de classe 3 parmi les positifs oscille entre 74,1% et 100% selon les tranches d'âge, avec une moyenne de 86,2% (Tableau 4 ; Figure 9). Avec seulement trois animaux testés et un prélèvement positif, la tranche à 10 semaines d'âge ne semble pas représentative.

Tableau 4 : Répartition des prélèvements positifs

	4 sem	5 sem	6 sem	7 sem	8 sem	9 sem
Effectifs de positifs	1	7	15	14	27	12
Niveau d'infestation						
Faible	0%	0%	6,7%	7,1%	18,5%	8,3 %
Moyenne	0%	14,3 %	13,3%	7,1%	7,4%	0%
Elevée	100%	85,7%	80%	85,7%	74,1%	91,7%

Les pourcentages sont donnés en proportion des animaux positifs.

Figure 9 : Prévalence et niveau d'infestation de *Giardia* en fonction de l'âge des chiots



2. Détail des portées

On considère les portées pour lesquelles au moins deux chiots ont été prélevés à la même date. Sur 99 portées ainsi retenues, 21 (26%) montrent des animaux positifs et négatifs au sein d'une même fratrie. Ainsi, pour une date de prélèvement donnée, le statut vis-à-vis de *Giardia* au sein d'une même portée n'est pas nécessairement homogène.

Il n'a pas été possible d'évaluer la proportion de chiots positifs au sein d'une fratrie de statut hétérogène, dans la mesure où seules 2 des 99 portées étaient complètes, à une date donnée.

Les portées de grande taille (6 chiots et plus) ne sont pas significativement plus nombreuses à posséder au moins un chiot positif, pour une date donnée ($P=0,39$) (Tableau 5).

Tableau 5 : Proportion de portées possédant au moins un positif selon leur taille

	Au moins 6 chiots	Jusqu'à 5 chiots
Au moins 1 positif	13/20 19,7%	7/20 28%
Tous négatifs	53/71 80,3%	18/71 72%

3. Effet de l'âge

L'influence de l'âge a été étudiée sur 397 prélèvements des 271 chiots entre 4 et 8 semaines d'âge. Au-delà, il s'agit de chiots qui n'ont pas été vendus,

possiblement à cause d'un problème de santé ou d'un retard de croissance. Nous avons donc choisi de les exclure afin de ne pas biaiser le résultat. L'âge a bien un effet sur la prévalence : les chiots sont significativement plus nombreux à être infestés quand ils sont plus âgés ($P=0,015$).

Il n'a toutefois pas été possible de mettre en évidence une relation entre l'âge et le degré d'infestation par *Giardia* (classe 1, 2 ou 3), par manque d'effectifs dans les catégories de faible infestation.

4. Effet du sexe

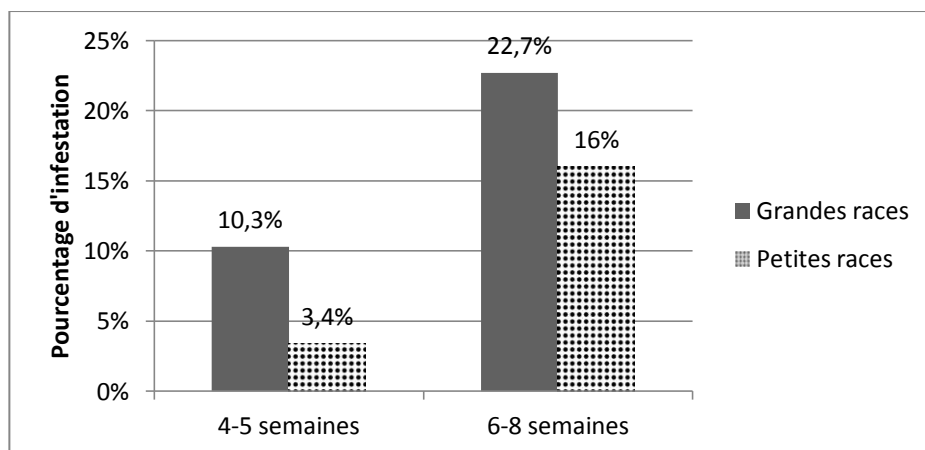
En considérant les mêmes animaux, l'étude a porté sur 379 prélèvements. En effet, pour certains d'entre eux, le sexe n'avait pas été renseigné lors du ramassage. 50,3% des prélèvements ont été réalisés sur des mâles et 49,7% sur des femelles. Le taux d'infestation est de 19,9% chez les mâles et de 13,8% chez les femelles. Avec un $P=0,12$, le sexe n'a pas d'effet sur l'infestation par *Giardia*.

5. Effet de la race

Les races sont divisées en deux catégories : grandes et petites (cf. I.A.). 397 prélèvements ont été inclus dans cette analyse, dont 97 prélèvements à 4-5 semaines d'âge (68 en grandes et 29 en petites races) et 300 prélèvements à 6-8 semaines d'âge (119 en grandes et 181 en petites races). Les proportions d'animaux positifs selon la race et l'âge sont présentées dans la figure 11.

Parmi les animaux infestés, 89,2% des chiots de grandes races et 72,5% des chiots de petites races le sont à un niveau élevé.

Figure 10 : Infestation par *Giardia* en fonction du format de la race, par tranche d'âge



Que ce soit entre 4 et 5 semaines d'âge ou entre 6 et 8 semaines d'âge, avec des valeurs de P respectivement égales à 0,26 et 0,15, la race n'a pas d'effet significatif sur l'infestation par *Giardia*.

B. Pathogénicité de *Giardia*

Afin de déterminer si le parasite *Giardia* est pathogène, nous avons cherché à évaluer son rôle dans les diarrhées de sevrage, ainsi que sa relation avec les autres agents pathogènes recherchés dans les selles.

Le rôle dans les diarrhées a été évalué à l'aide de deux paramètres : le score fécal et la croissance des chiots (via leur GMQ). L'étude a porté sur 397 prélèvements de selles appartenant à des chiots de 4 à 8 semaines.

1. Rôle dans les diarrhées de sevrage

a. Effet sur le score fécal

La prévalence globale de scores fécaux pathologiques sur les chiots de l'élevage est de 33,4%.

83,9% des selles testées positivement pour *Giardia* sont associées à un score fécal non pathologique, contre 63,6% des selles diagnostiquées négatives. Les chiots sont significativement moins nombreux à présenter un score fécal pathologique lorsqu'ils sont infestés par *Giardia* ($P=0,002$).

Toutefois, le score fécal moyen n'est pas significativement différent selon que les chiots positifs ou non vis-à-vis de *Giardia* ($P=0,06$) (Tableau 6). Ainsi, la présence de *Giardia* n'a pas d'impact significatif sur la qualité des selles.

Tableau 6 : Score fécal moyen selon le format de la race, l'âge, et le statut *Giardia* des chiots

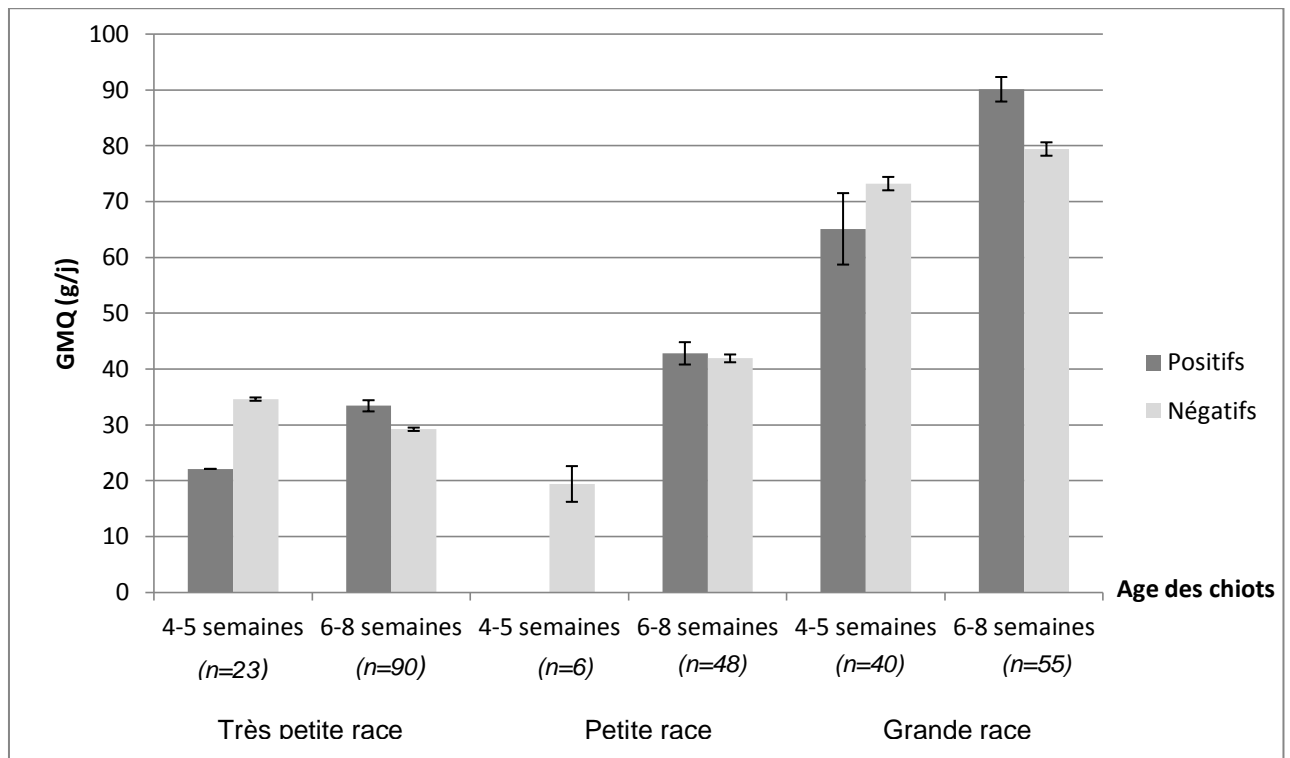
	4-5 semaines d'âge		6-8 semaines d'âge	
	positif	négatif	positif	négatif
Petites races	8	6,5 ±0,1	8,2 ±0,1	8 ±0,1
Grandes races	6,6 ±0,3	6 ±0,1	6,9 ±0,1	6,2 ±0,1

b. Effet sur le GMQ

L'effet de *Giardia* sur le GMQ a été étudié sur 263 prélèvements issus des mêmes animaux.

Le GMQ moyen des chiots selon leur âge et le format de la race est présenté dans la figure 11. La présence de *Giardia* dans les selles ne modifie pas le GMQ de façon significative ($P=0,8$).

Figure 11 : GMQ moyen en fonction de l'âge et du format de la race des chiots



Très petite race : Bichon frisé, Bichon maltais, Lhasa apso, Shih-tzu – Petite race : Caniche, Cocker, Westie – Grande race : Berger allemand, Golden Retriever, Labrador Retriever

2. Association avec d'autres agents pathogènes

Pour cette analyse, nous avons retenu deux pathogènes reconnus du chiot : CPV 2 et *Isospora ohioensis*. Ces deux agents et *Giardia* ont été recherchés simultanément sur 281 prélèvements.

On constate que 60% des animaux infestés par *Giardia* sont aussi porteurs d'au moins un autre agent pathogène parmi ceux considérés (Figure 12). Le pathogène le plus fréquemment associé à *Giardia* dans notre étude est le parvovirus canin de type 2 (50% des individus).

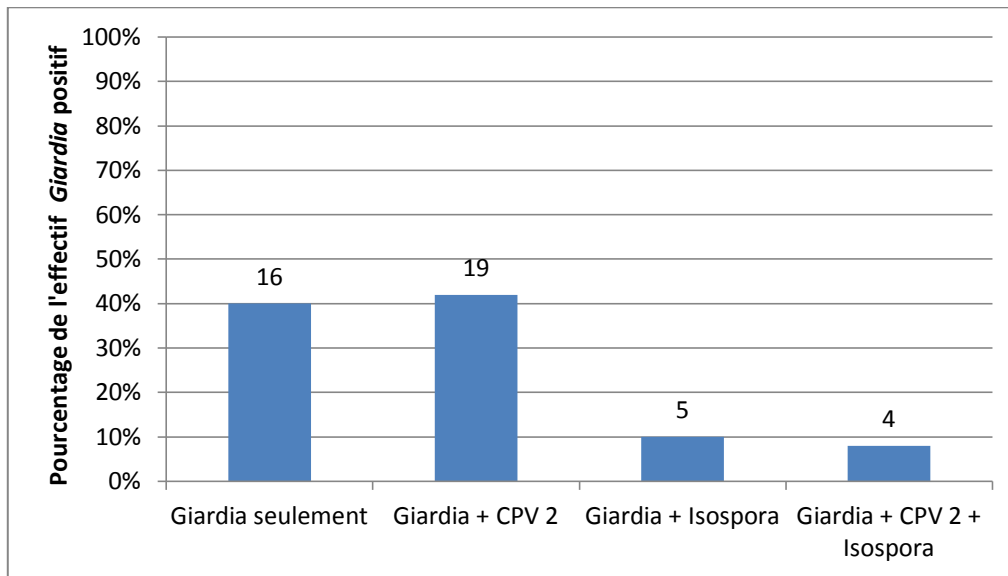
18,8% des selles infestées par *Giardia* uniquement sont associées à un score fécal pathologique, contre 10,7% des selles positives pour *Giardia* et un ou deux autres agents. L'association de *Giardia* aux autres agents de notre étude n'a pas d'influence significative sur l'apparition d'un score fécal pathologique ($P=0,5$). En revanche, la présence de CPV 2, indépendamment des deux autres agents, augmente significativement le risque d'obtenir des selles pathologiques ($P=0,001$). Ceci n'est pas le cas pour *Isospora* ($P=0,9$).

Le score fécal moyen est de :

- $8,3 \pm 0,1$ pour les prélèvements positifs pour *Giardia* seulement
- $7,7 \pm 0,1$ pour les prélèvements positifs pour *Giardia* et un autre agent
- $6,8 \pm 0,1$ pour les prélèvements positifs pour les trois agents.

Retrouver un ou deux agents associés à *Giardia* dans les selles n'est pas corrélé à une altération de leur qualité (respectivement $P=0,5$ et $P=0,2$).

Figure 12 : Association de *Giardia* avec CPV 2 et *Isospora ohioensis*



III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. Méthode diagnostique

Les résultats présentés sont basés sur l'utilisation du test ELISA ProSpecT *Giardia* Microplate Assay ®. Initialement développé pour la médecine humaine, ce test montre une sensibilité et une spécificité très élevées : respectivement 91-100% pour la sensibilité et 98-100% pour la spécificité (ALDEEN et al., 1995 et 1998 ; GARCIA et al., 1997 ; MANK et al., 1997 ; HANSON et CARTWRIGHT, 2001). Dans la plupart de ces études, le test ELISA était comparé à une coproscopie par examen direct associée ou non à un examen par immunofluorescence directe. Le diagnostic par la méthode de flottation montre une sensibilité autour de 70% (ROSOFF et al., 1989 ; SCHEFFER et al., 1994 ; ALDEEN et al., 1995 ; CARTWRIGHT, 1999) lorsqu'on n'effectue qu'un seul prélèvement. Cette sensibilité moindre est très sans doute due en grande partie à l'excrétion intermittente des kystes, tandis que l'antigène GSA 65 est, lui, présent de façon permanente. Dans le cas d'une analyse unique d'un prélèvement de selles, la valeur diagnostique de la méthode ELISA semble ainsi bien supérieure à celle par flottation, que ce soit chez les individus symptomatiques comme asymptomatiques (HANSON et CARTWRIGHT, 2001).

Chez le chien, la valeur diagnostique du test ELISA ProSpecT Giardia Microplate Assay ® a été explorée dès 1992 (LEIB et al., 1992). Dans cette étude, le test ELISA donnait des résultats similaires à la méthode de flottation dans 84% des cas. Dans 15% des cas, le test ELISA était positif tandis que la coproscopie était négative. Deux autres examens des selles par la méthode de flottation permettaient d'observer le parasite dans la moitié de ces cas. Dans 1% des cas, l'échantillon était positif à la coproscopie et négatif par ELISA. Une autre étude, réalisée avec le même test, trouvait 14% de cas négatifs par ELISA et positifs par coproscopie, et 10% positifs par ELISA et négatifs par coproscopie (BARR et al., 1992). Les résultats étaient également en faveur d'une faible sensibilité de l'ELISA chez les chiens asymptomatiques. Les deux études montraient ainsi que des faux négatifs peuvent survenir avec le test ELISA, et donc qu'un résultat négatif ne permet pas nécessairement d'exclure une giardiose. LEIB et al. (1992) concluaient que d'autres travaux seraient nécessaires pour affiner la sensibilité et la spécificité de l'ELISA pour le diagnostic de la giardiose canine. Plus récemment, ce point a fait l'objet d'une nouvelle étude (DECOCK et al., 2003a), selon laquelle ProSpecT Giardia Microplate Assay ® aurait une sensibilité supérieure à 90%, soit similaire à celle de deux ou trois coproscopies par la méthode de flottation.

De façon générale, le coût du test ELISA, le temps nécessaire à sa réalisation, et l'absence de détection d'autres parasites, font préconiser la coproscopie par la méthode de flottation pour la détection de *Giardia* chez le chien. Toutefois, dans un contexte tel que celui de notre étude (très nombreux échantillons, screening du polyparasitisme par des méthodes spécifiques), l'utilisation de l'ELISA semble justifiée et judicieuse.

L'absence de réactivité croisée avec un certain nombre d'espèces parasites de l'homme a été confirmée pour ProSpecT Giardia Microplate Assay ® (ADDISS, 1991). Cela n'a pas été exploré pour les parasites du chien.

Le test ProSpecT Giardia Microplate Assay ® peut être réalisé sur des selles fraîches ou réfrigérées depuis 24h à 48h (BEUGNET et al., 2000a). Concernant les prélèvements utilisés dans notre étude, la conservation était faite par congélation à -20°C pendant plusieurs mois. L'antigène GSA 65, sur lequel est basé le test ProSpecT Giardia Microplate Assay ®, est stable sur une longue période, si on respecte certaines conditions de conservation (ROSOFF et al., 1989) :

- Traitement par un fixateur puis conservation à +4°C
- Ou fixation par du formaldéhyde 10% puis conservation à température ambiante
- Ou congélation à -20°C.

Il existe différents types de fixateurs. Certains sont particulièrement toxiques (formaldéhyde, fixateurs à base de mercure), ce qui a conduit à développer de nouveaux produits : ECOFIX (Meridian Diagnostics), PARASAFE (Scientific Device Laboratories), STRECK TISSUE FIXATIVE (Streck Laboratories). L'intérêt des fixateurs est notamment de préserver la structure morphologique du parasite en vue

de l'examen par coproscopie (FEDORKO et al., 2000). Dans notre étude, la recherche de *Giardia* étant basée uniquement sur la présence de l'antigène GSA 65, il a semblé pertinent et plus simple de congeler les matières fécales.

B. Caractéristiques des chiots

Dans notre étude, la majorité des chiots sont âgés de 6 à 8 semaines. Ceci satisfait l'objet de notre travail, à savoir l'implication de *Giardia* pendant la période du sevrage. Le nombre moindre de prélèvements effectués à 4 et 5 semaines réside dans le fait qu'à cet âge, les mères stimulent elles-mêmes la défécation de leurs petits par léchage et les nettoient, empêchant ainsi la collecte des selles.

Un certain nombre de prélèvements ont aussi été effectués à 9 voire 10 semaines. Toutefois, l'interprétation des résultats pour ces tranches d'âge est à faire avec prudence. En effet, la majorité des chiots quittent l'élevage à l'âge légal de 8 semaines ; au-delà, il s'agit potentiellement d'animaux non aptes à la vente, par exemple pour raison de santé. On comprendra qu'une telle possibilité constitue un biais pour l'interprétation des résultats.

On retiendra ensuite que si la grande taille de l'élevage (300 reproducteurs environ) est un atout indéniable pour récolter un nombre suffisant de données, il n'est pas le reflet des élevages canins français, lesquels comptent généralement deux à cinq lices pour un petit nombre de portées annuelles (ROBIN, 2011). Les résultats de notre étude sont ainsi, comme on le verra par la suite, à interpréter à la lumière de ce facteur taille.

C. Résultats

1. Prévalence de *Giardia*

D'une manière générale, la prévalence de *Giardia* est plutôt importante parmi les chiots inclus dans cette étude. Toutes classes d'infestation confondues, elle s'échelonne en effet de 4,6% à 30,8% entre 4 et 9 semaines d'âge, pour une prévalence globale de 17,5%. Une étude récente sur une population similaire (chiots d'élevage, de petites et grandes races, âgés de 4 à 12 semaines, diagnostic par kit ProSpecT[®] *Giardia* Microplate Assay) montrait une prévalence globale de 41% (ROBIN, 2011).

Il est intéressant de constater que la prévalence augmente systématiquement au passage d'une tranche d'âge à la tranche supérieure, et ce, en dépit de vermifugations régulières. Il est donc légitime de s'interroger sur l'efficacité des traitements mis en place. Le fenbendazole à 50mg/kg/j PO pendant 3 jours correspond à la posologie démontrée comme efficace (BARR et al., 1994 ; ZAJAC et al., 1998), bien que certaines études soient plutôt en faveur d'un traitement allongé à 5 jours (TAMS, 2009).

Pour vérifier de façon rigoureuse l'efficacité du traitement anti-parasitaire, il eût été intéressant d'effectuer un suivi au cours du temps pour chaque chiot. Malheureusement, cela n'a pas été possible pour des raisons pratiques : les animaux ne déféquaient pas lors de chaque ramassage de selles. Ainsi, pour 55% d'entre eux, c'est un prélèvement unique qui a été analysé. Par ailleurs, selon que les 24,1% chiots testés toujours positifs ont été prélevés uniquement dans leurs premières (ou *a contrario*, leurs dernières) semaines de vie à l'élevage, des individus chez qui *Giardia* serait apparu (ou *a contrario*, aurait disparu) sont très probablement dissimulés. De la même façon, certains individus parmi les 92 qui sont constamment négatifs n'ont été prélevés que dans leurs premières semaines de vie : rien n'indique qu'ils seraient restés négatifs à 6, 7 ou 8 semaines.

Globalement, le fait que certains animaux ne soient pas parvenus à éliminer le parasite ou aient été contaminés en cours d'élevage pourrait provenir d'une immunité diminuée de ces individus (par exemple par le portage d'un autre agent pathogène), et/ou d'une réinfestation immédiate par le milieu. En effet, lorsqu'on examine une à une les données, on constate qu'il existe des disparités de statut vis-à-vis de *Giardia* entre les chiots d'une même portée, pourtant soumis à la même pression environnementale. Il aurait été pertinent de quantifier la proportion moyenne de chiots positifs au sein d'une même fratrie. Malheureusement, la quasi-absence de portées entièrement prélevées à une même date ne l'a pas permis. Cet impondérable explique aussi que les résultats présentés dans le tableau 5 soient à interpréter avec prudence.

Il y aurait plusieurs pistes pour, sinon éliminer totalement le protozoaire, tout au moins diminuer sa prévalence. La première serait de modifier le traitement. Une étude a montré que le métronidazole pourrait présenter une efficacité supérieure (DECOCK et al., 2003b) au fenbendazole contre *Giardia*. Mais compte-tenu de ses effets secondaires possibles (troubles digestifs, troubles nerveux d'origine centrale), l'utilisation de cette molécule est peu envisageable. Quant à allonger la durée du traitement au fenbendazole, elle pose la question de la praticité, car elle implique des manipulations supplémentaires. Cela reviendrait en outre à placer les chiots sous traitement un tiers du temps (5 jours sur 15).

La deuxième piste consisterait à renforcer les mesures d'hygiène : protocoles de désinfection, hygiène du personnel, nettoyage des cages et des animaux, vides sanitaires (cf. III. F. de la première partie). Cela pose d'évidentes questions de gestion pratique.

Un autre aspect de l'étude cherchait à montrer une relation entre l'âge et le degré d'infestation parasitaire. Malheureusement, compte-tenu du très petit nombre voire l'absence d'animaux faiblement infestés (classes 1 et 2) dans certaines tranches d'âge, un tel lien n'a pas pu être démontré.

Si notre étude montre que l'âge a bien une influence sur la prévalence du parasite au cours des deux premiers mois de vie, aucun effet significatif de la race ou du sexe n'a été mis en évidence. Ceci conforte les données de KIRKPATRICK (1987).

Des facteurs comme la disposition des bâtiments, la proximité de certaines catégories d'animaux, la manutention et les déplacements du personnel, n'ont pas été pris en compte, quoiqu'ils auraient pu être intéressants à inclure. Un autre paramètre qui pourrait avoir une influence sur la prévalence de *Giardia* est la taille de l'élevage. Il n'est pas impossible par exemple qu'au-delà d'un certain seuil, le nombre d'animaux (ou leur densité) est tel que les mesures prophylactiques et/ou thérapeutiques réalisables ne puissent contenir le microbisme inhérent à l'élevage.

2. Pathogénicité de *Giardia*

Dans le cadre de la gestion des divers agents pathogènes circulant au sein de l'élevage, peut-être est-il nécessaire, avant de déployer tous les moyens possibles pour éradiquer *Giardia*, de s'interroger sur la réalité du pouvoir pathogène de ce parasite.

Dans notre étude, un test du Khi deux semble révéler que la présence de *Giardia* diminue le risque d'avoir des selles pathologiques, ce qui semble absurde. Ce résultat est très probablement le fait d'un paradoxe de Simpson, soit que la taille des groupes (positifs/négatifs) diffère trop, soit qu'une variable ici non considérée ait un impact sur les rapports.

Le test de Student montre que la présence de *Giardia* n'affecte pas significativement le score fécal. En d'autres termes, le parasite ne serait pas responsable d'une altération de la qualité des selles. Ce résultat est en désaccord avec une étude récente observant que *Giardia* est un facteur ayant un impact dans les diarrhées de sevrage (ROBIN, 2011). On peut supposer que dans notre étude, d'autres facteurs influent plus fortement sur les troubles digestifs, de telle sorte que le rôle de *Giardia* s'en trouve minimisé voire masqué. Il pourrait s'agir d'un autre agent pathogène comme CPV 2, ou d'un autre facteur tel que la race, l'âge des chiots, la taille de l'élevage ou encore le nombre de repas par jour, dont ROBIN (2011) a montré qu'ils auraient un impact sur l'apparition de diarrhée. Ainsi, indépendamment de l'âge, il apparaît que les chiots de petites races ont des selles de meilleure qualité que ceux de grandes races, comme c'est le cas dans notre étude (Tableau 6). Ceci peut s'expliquer par le fait que les chiots de petites races ont un tractus digestif proportionnellement plus lourd que celui des chiots de grandes races, à l'origine d'une plus grande capacité digestive et donc de moins de désordres (MEYER et al., 1993). La qualité des selles augmente également avec l'âge (ROBIN, 2011 ; GRELLET et al., 2012). La même étude montre que les élevages de moins de 20 chiens ont une prévalence de scores fécaux pathologiques de 26%, contre 41% dans les élevages de plus de 100 chiens (33,4% dans notre étude). Un élevage de grande taille serait ainsi un facteur de risque d'apparition de diarrhée chez les jeunes animaux. Enfin, plus la nourriture des chiots leur est distribuée de façon fractionnée, et moins ils présentent de scores fécaux pathologiques.

Dans notre étude, *Giardia* n'influe pas de façon significative sur la prise de poids des animaux. En d'autres termes, le protozoaire n'affecterait pas la croissance. On peut toutefois déplorer l'absence d'individus positifs dans une des catégories (petites races, à 4-5 semaines), et la forte dispersion des GMQ au sein d'une même catégorie raciale et d'une même tranche d'âge. Ces deux paramètres pourraient amoindrir la confiance que l'on peut accorder à notre résultat.

En plus de *Giardia*, 60% des chiots de notre étude comportent au moins un autre agent pathogène supplémentaire. Ce résultat rappelle qu'en élevage, les chiots sont souvent l'objet d'une pluri-infection. Les travaux menés par ROBIN (2011) montraient par exemple près de 75% de chiots porteurs de plusieurs agents pathogènes en même temps. La présence d'autres agents peut constituer un biais dans l'interprétation de l'effet de *Giardia* seul.

Ici, la présence d'un ou deux agents associés à *Giardia* n'est pas corrélée à une modification du score fécal. Le CPV 2 à forte charge, par contre, est un facteur d'apparition de diarrhée. Ce n'est pas le cas d'*Isospora ohioensis*. Ce dernier résultat est en accord les travaux menés par BUEHL et al. (2006), qui soulignaient que l'infestation des chiots par *Isospora ohioensis* pouvait être asymptomatique.

CONCLUSION

L'étude de *Giardia duodenalis*, menée dans le cadre de cette thèse sur 439 prélèvements de selles issues de 271 chiots d'un même élevage, a permis d'évaluer la prévalence et l'implication du protozoaire dans les diarrhées de sevrage.

Malgré le protocole de vermifugation mis en place, le parasite est présent chez 17,5% des chiots, avec une augmentation très nette dans les dernières semaines passées sur l'élevage (30,8%). S'il est difficile de juger de l'efficacité curative du traitement, les mesures d'hygiène et prophylactiques mises en œuvre dans l'élevage semblent insuffisantes pour juguler la contamination des animaux. Aucun lien entre la prévalence et la race ou le sexe n'a été démontré.

Le portage de *Giardia* est réputé pour être le plus souvent asymptomatique (BARR et BOWMAN, 1994), mais il peut, en période de sevrage, être considéré comme un facteur d'impact sur l'apparition de diarrhée (ROBIN, 2011). Dans notre étude, il ne modifie pas significativement la qualité des selles. La présence du parasite n'est pas non plus associée à un retard de croissance.

Enfin, dans notre étude, 60% des animaux porteurs de *Giardia* hébergeaient au moins un autre agent pathogène, dont, pour la moitié d'entre eux, le parvovirus canin de type 2. La présence de ce virus, contrairement à *Giardia*, est corrélée à l'apparition de diarrhée. Cette dernière partie de notre travail vient conforter des données déjà présentes dans la littérature (FRANC et al., 1997 ; BEUGNET et al., 2000a ; ROBIN, 2011), à savoir que les chiots d'élevage sont souvent l'objet d'une pluri-infection, que l'origine soit virale et/ou parasitaire. Mais si dans cette -selon l'expression consacrée- "association de malfaiteurs", les troubles digestifs observés avec le CPV 2 sont indépendants du statut *Giardia*, cela suggère peut-être que notre protozoaire ne joue qu'un rôle de second plan dans les diarrhées de sevrage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABBITT, B, R HUEY, AK EUGSTER, et J SYLVER. «Treatment of giardiasis in adult Greyhounds, using ipronidazole-medicated water.» *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1986: 67-69.

ADAMS, PJ, et RCA THOMPSON. «Characterization of a novel genotype of *Giardia* from a Quenda (*Isoodon obesulus*) from Western Australia.» Chap. 27 dans *Giardia, the cosmopolitan parasite*, de B OLSON, M OLSON et P WALLIS, 287-291. Oxon: CABI Publishing, 2002.

ADISS, DG. «Evaluation of a commercially available Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay for *Giardia lamblia* antigen in stool.» *J. Clin. Microbiol.*, 1991: 1137-1142.

ALDEEN, WE, D HALE, AJ ROBISON, et K CARROLL. «Evaluation of a commercially available ELISA assay for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens.» *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1995: 77-79.

ALDEEN, WE, K CARROLL, A ROBISON, M MORRISON, et D HALE. «Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens.» *J. Clin. Microbiol.*, 1998: 1338-1340.

BARLOUGH, J. «Canine giardiasis : a review.» *J. Small Anim. Pract.*, 1979: 613-623.

BARON, S. *Medical Microbiology*. 4ème édition. Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston: Samuel Baron Edition, 1996.

BARR, SC, DD BOWMAN, et HN ERB. «Evaluation of two test procedures for diagnosis of giardiasis in dogs.» *Am. J. Vet. Res.*, 1992: 2028-2030.

BARR, SC, DD BOWMAN, et RL HELLER. «Efficacy of fenbendazole against giardiasis in dogs.» *Am. J. Vet. Res.*, 1994: 988-990.

BARR, SC, DD BOWMAN, MF FRONGILLO, et SL JOSEPH. «Efficacy of drug combination of praziquantel, pyrantel pamoate and febantel against giardiasis in dogs.» *Am. J. Vet. Res.*, 1998: 1134-1136.

BARR, SC, DD BOWMAN, RL HELLER, et HN ERB. «Efficacy of albendazole against giardiasis in dogs.» *Am. J. Vet. Res.*, 1993: 926-928.

BARR, SC, et DC BOWMAN. «Giardiasis in dogs and cats.» *Compend. Cont. Ed.*, 1994: 603-610.

BARUTZKI, D. «Prevalence of *Giardia spp.* in dogs in Germany.» Dans *Giardia, the cosmopolitazn parasite*, de BE OLSON, ME OLSON et PM WALLIS, 91-95. Oxon: CABI Publishing, 2002.

BELOSEVIC, M, GM FLAUBERT, et JD MACLEAN. «Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*.» *Gut*, 1989: 1213-1219.

BEUGNET, F. «Une entérite sous-estimée chez les carnivores domestiques : la giardiose à *Giardia duodenalis*.» *L'Action Vétérinaire*, 1996: 13-18.

BEUGNET, F, G BOURDOISEAU, et H DANG. *Abrégé de Parasitologie des Carnivores Domestiques - Parasitoses digestives*. Vol. 1. Auxon: Kalianxis, 2004.

BEUGNET, F, G BOURDOISEAU, et V VILLENEUVE. «La giardiose des carnivores domestiques.» *L'Action Vétérinaire*, 2000a : 2-7.

BEUGNET, F, J GUILLOT, B POLACK, et R CHERMETTE. «Enquête sur le parasitisme digestif des chiens et des chats de particuliers de la région parisienne.» *Rev. Méd. Vét.*, 2000b : 443-446.

BOURDEAU, P. «Les giardioses des carnivores.» *Rec. Méd. Vét.*, 1993: 393-400.

BOURDOISEAU, G. «Elevage et collectivités : les maladies parasitaires du chien.» *Nouveau praticien vétérinaire*, 2000: 137-139.

BROWN, TJ, et al. «The viability of *Giardia intestinalis* and *Giardia muris* cysts in seawater.» *Int. J. Env. Health Res.*, 1999: 157-161.

BUEHL, IE, H PROSL, HC MUNDT, AG TICHY, et A. JOACHIM. «Canine Isosporosis – Epidemiology of field and experimental infections.» *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2006: 482-487.

BURET, A. «Pathogenesis - how does *Giardia* cause disease ?» Dans *Giardia : from molecules to disease*, de RCA THOMPSON, JA REYNOLDSON et AL LYMBERG, 293-315. Wallingford: CABI, 1994.

BURET, A, DG GALL, et ME OLSON. «Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillus border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*.» *Parasitol. Res.*, 1991: 109-114.

- BURET, A, JA HARDIN, ME OLSON, et DG GALL.** «Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*.» *Gastroenterology*, 1992: 506-513.
- BURET, AG, DG GALL, et ME OLSON.** «Effect of murine giardiasis on growth, intestinal morphology and disaccharidase activity.» *J. of Parasitol.*, 1990: 403-407.
- BURET, AG, KGE SCOTT, et AC CHIN.** «Giardiasis : pathophysiology and pathogenesis.» Dans *Giardia, the cosmopolitan parasite*, de BE OLSON, ME OLSON et PM WALLIS, 109-125. Oxon: CABI Publishing, 2002.
- CARTWRIGHT, CP.** «Utility of multipl-stool specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting.» *J. Clin. Microbiol.*, 1999: 2408-2411.
- CLYNE, CA, et GM ELIOPOULOS.** «Fever and urticaria in an acute giardiasis.» *Archives of Internal Medicine*, 1989: 939-940.
- COLLINS, GH.** «Diagnosis and prevalence of *Giardia spp* in dogs and cats.» *Aust. Vet. J.*, 1987: 89-90.
- DECOCK, C.** «Essai de traitement de la giardiose canine par le febantel, le fenbendazole, l'oxfendazole et le metronidazole.» Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 2002, 82pp.
- DECOCK, C, MC CADIERGUES, M LARCHER, S VERMOT, et M FRANC.** «Comparison of two techniques for diagnosis of giardiasis in dogs.» *Parasite*, 2003a : 69-72.
- DECOCK, C, MC CADIERGUES, M ROQUES, et M FRANC.** «Evaluation de quatre traitements de la giardiose canine.» *Rev. Méd. Vét.*, 2003b : 763-766.
- DI PRISCO, MC, et al.** «Association between giardiasis and allergy.» *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 1998: 261-265.
- DI PRISCO, MC, I HAGEL, NR LYNCH, RM BARRIOS, N ALVAREZ, et R LOPEZ.** «Possible relationship between allergic disease and infection by *Giardia lamblia*.» *Annals of allergy*, 1993: 210-213.
- EDLING, TD, TL HANG, et PR CHAKRABORTY.** «Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia lamblia*.» *In Vitro J. Infect. Dis.*, 1990: 1408-1411.
- EPE, C, G REHKTER, T SCHNIEDER, L LORENTZEN, et L KREIENBROCK.** «*Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe.» *Vet. Parasitol.*, 2010: 32-38.

ERLANDSEN, SL, S WEISSNER, et C OTTENWAEALTER. «Investigation into the life cycle of *Giardia* using videomicroscopy and field emission SEM.» Dans *Giardia, the cosmopolitan parasite*, de B OLSON, M OLSON et P WALLIS, 3-14. Oxon: CABI Publishing, 2002.

EY, PL, T BRUDERER, C WEHRLI, et P KOHLER. «Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analysis of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia.» *Parasitol. Res.*, 1996: 52-60.

FARTHING, MJ. «The molecular pathogenesis of giardiasis.» *J. of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1997: 79-88.

FAUBERT, G. «Immune response to *Giardia duodenalis*.» *Clin. Microbiol. Reviews*, 2000: 35-54.

FAUBERT, G, et M BELOSEVIC. *Animal models for Giardia duodenalis type organisms*. Vol. 3, chez *Human Parasitic Diseases - Giardiasis*, de EA MEYER, 77-99. Amsterdam: Elsevier, 1990.

FAVENNEC, L, D MAGNE, et JG GOBERT. «Cytopathogenic effect of *Giardia intestinalis* in vitro.» *Parasitol. Today*, 1991.

FEDORKO, D, E WILLIAMS, N. NELSON, L. CALHOUN, et S YAN. «Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stools specimens preserved in ECOFIX.» *J. Clin. Microbiol.*, 2000.

FERGUSON, A, J GILLON, et G MUNRO. «Pathology and pathogenesis of intestinal mucosal damage in giardiasis.» Dans *Human Parasitic Diseases*, de EA MEYER. Amsterdam: Elsevier, 1990.

FRANC, M, MC CADIERGUES, A MARCHAND, G BOURDOISEAU, et J BUSSIERAS. «Le parasitisme intestinal des carnivores domestiques : bilan d'une enquête conduite dans les quatre écoles vétérinaires françaises.» *Rev. Méd. Vét.*, 1997: 247-250.

GARCIA, LS, et RY SHIMIZU. «Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens.» *J. Clin. Microbiol.*, 1997: 1526-1529.

GILLIN, FD, et al. «Encystation and expression of cysts antigens by *Giardia lamblia* in vitro.» *Science*, 1987: 1040-1043.

GILLON, D, AL THAMERY, et A FERGUSON. «Features of small intestinal pathology (epithelial cell kinetics, intraepithelial lymphocytes, disaccharidases) in a primary *Giardia muris* infection.» *Gut*, 1982: 498-506.

GRELLET, A, A FEUGIER, et D GRANDJEAN. «Development of a new fecal scoring system in puppies.» *ECVIM Congress Seville*, 2011.

GRELLET A, FEUGIER A, CHASTANT S, CARREZ B, BOUCRAUT-BARALON C, CASSELEUX G, GRANDJEAN D. «Validation of fecal scoring scale in puppies during the weaning period.» *Preventive Vet. Med.*, 2012.

GUPTA, RK, et S MEHTA. «Giardiasis in children : a study of pancreatic functions.» *Indian J. of Med. Res.*, 1973: 743-748.

HAHN, NE. «Prevalence of *Giardia* in the feces of pups.» *JAVMA*, 1988: 1428-1429.

HANSON K, et CARTWRIGHT C. «Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stools specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*.» *J. Clin. Microbiol.*, 2001: 474-477.

HARE, DF, JARROLL, et DG LINDMARK. «*Giardia lamblia* : characterization of proteinase activity in trophozoites.» *Experimental Parasitol.*, 1989: 168-175.

HERZOG, S. *Etude épidémiologique de la giardiose en élevage canin - essai de traitement au fenbendazole.* Thèse de doctorat vétérinaire, ENVA, 2002, 104pp.

HEWLETT, EL. «Experimental infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites.» *J. Infect. Dis.*, 1982: 89-93.

HOPKINS, RM, BP MELONI, DM GROTH, JA WETHERALL, JA REYNOLDSON, et RCA THOMPSON. «Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality.» *J. of Parasitol.*, 1997: 44-51.

ISAAC-RENTON, JL, C CORDIERO, K SARAFIS, et H SHAHRIARI. «Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak.» *J. of Infect. Dis.*, 1993: 431-440.

JACOBS, SR, CPR FORRESTER, et J YANG. «A survey of prevalence of *Giardia* in dogs presented to canadian veterinary practices.» Dans *Giardia, the cosmopolitan parasite*, de BE OLSON, ME OLSON et PM WALLIS, 81-85. Oxon: CABI Publishing, 2002.

JAROLL, EL, P MANNING, DG LINDMARK, JR COGGINS, et SL ERLANDSEN. «*Giardia* cyst wall-specific carbohydrate : evidence for the presence of galactosamine.» *Molecular and Biochemical Parasitol.*, 1989: 121-132.

JAYAGOPALA REDDY, NR, M THIMMAPPA RAI, L RANGANATH, V CHANDRASHEKARMURTHY, et P NAGARAJACHAR. «Treatment of giardiasis with metronidazole in dogs.» *Indian Vet. J.*, 1992: 163-164.

KATANIK, MT, SK SCHNEIDER, JE ROSENBLATT, GS HALL, et W PROCOP. «Evaluation of ColorPAC Giardia/Cryptosporidium rapid assay and ProSpecT Giardia/Cryptosporidium microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens.» *J. Clinical Microbiol.*, 2001: 4523-4525.

KATELARIS, PH, FS SEOW, et MC NGU. «Inhibition of trypsin by *Giardia lamblia* in vitro.» *Gastroenterology*, 1991.

KIRKPATRICK, CE. «Enteric protozoal infections.» Dans *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*, de CE GREENE, 806-823. Philadelphia: WB Saunders Co., 1984.

KIRKPATRICK, CE. «Feline giardiasis : a review.» *J. Small Animal Pract.*, 1986: 69-80.

KIRKPATRICK, CE. «Giardiasis.» *Vet. Clin. North Am. (Small Animal Practice)*, 1987: 1377-1387.

KIRKPATRICK, CE, et JP FARREL. «Giardiasis.» *Compend. Cont. Ed.*, 1982: 367-378.

KIRKPATRICK, CE, et JP FARRELL. «Feline giardiasis : observations on natural and induced infections.» *Am. J. Vet. Res.*, 1984: 2182-2188.

LEIB, MS, et AM ZAJAC. «Giardiasis in dogs and cats.» *Veterinary Medicine*, 1999: 793-802.

LEIB, MS, N HAHN, S KING, et M MATZ. «Comparison of diagnostic tests in dogs experimentally infected with *Giardia*.» *J. Vet. Int. Med.*, 1992: 129.

LEVINE, WC, WT STEPHENSON, et GF CRAUN. «Waterborne disease outbreaks, 1986-1988.» *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1990: 1-13.

LINDMARK, DG. «*Giardia lamblia* : localisation of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites.» *Experimental Parasitol.*, 1988: 141-147.

LIU, J, SE SEE, et KH SONG. «Prevalence of canine giardiasis in South Korea.» *Res. Vet. Sci.*, 2008: 509-511.

MANK, TG, JOM ZAAT, AM DEELDER, JTM VAN EIJK, et AM POLDERMAN. «Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis.» *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997: 615-619.

MARSHALL, JS. «Repeated antigen challenge in rats induces mucosal mast cell hyperplasia.» *Gastroenterology*, 1993: 391-398.

MEYER, H, E KIENZLE, et J ZENTEK. «Body size and relative weights of gastrointestinal.» *J. Vet. Nutr.*, 1993: 33-35.

MONIS, PT, R ANDREWS, G MAYRHOFER, et PL EY. «Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*.» *Molec. Biol. and Evol.*, 1999: 1135-1144.

MONIS, PT, RH, MAYRHOFER, G ANDREWS, et PL EY. «Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin.» *Infec. Gen. and Evol.*, 2003: 29-38.

O'HANDLEY, RM, ME OLSON, D FRASER, et RCA THOMPSON. «Prevalence and genotypic characterization of *Giardia* in dairy calves in Western Australia and Western Canada.» *Vet. Parasitol.*, 2000: 193-200.

OLSON, ME, H CERI, et DW MORCK. «*Giardia* vaccination.» *Parasitol. Today*, 2000: 213-217.

OLSON, ME, H CERI, et DW MORCK. «*Giardia* immunoprophylaxis and immunotherapy.» Dans *Giardia, the cosmopolitan parasite*, de BE OLSON, ME OLSON et PM WALLIS, 139-155. Oxon: CABI Publishing, 2002.

PARENTI, DM. «Characterization of thiol proteinase in *Giardia lamblia*.» *J. of Infect. Dis.*, 1989: 1076-1080.

PAYNE, PA, RK RIDLEY, MW DRYDEN, C BATHGATE, GA MILLIKEN, et PW STEWART. «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.» *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2002: 1201-1202.

PONCE-MACOTELA, M, MN MARTINEZ-GORDILLO, RM BERMUDEZ-CRUZ, PM SALAZAR-SHETTINO, G ORTEGA-PIERRES, et PL EY. «Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from human and domestic animals in Mexico.» *Int. J. Parasitol.*, 2002: 1201-1202.

RIMHANEN-FINNE, R, HL ENEMARK, J KOLEHMAINEN, P TOROPAINEN, et ML HANNINEN. «Evaluation of immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay in detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in asymptomatic dogs.» *Vet Parasitol.*, 2007: 345-348.

ROBIN, CM. «Les facteurs de risque des diarrhées de sevrage chez le chiot en élevage canin.» Thèse de doctorat vétérinaire, Maison-Alfort, 2011, 120pp.

- ROJAS, L, DR TORRES, BJ MEDIOLA, et CM FINLAY.** «Detection of specific anti-*Giardia* serum antibody by immunofluorescence test in children with clinical giardiasis.» *Am. J. of Tropical Med. and Hyg.*, 1989: 477-479.
- ROSOFF, JD, et al.** «Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65.» *J. Clin. Microbiol.*, 1989: 1997-2002.
- SCHEFFER, AH, et LL VAN ETTA.** «Evaluation of a rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens.» *J. Clin. Microbiol.*, 1994: 1990-1991.
- SCHUPP, DG, et SL ERLANDSEN.** «A new method to determine *Giardia* cysts viability : correlation between fluorescein diacetate/propidium iodide staining and animal infectivity.» *Applied and Environ. Microbiol.*, 1987: 704-707.
- SCOTT, KGE, MR LOGAN, GM KLAMMER, DA TEOH, et AG BURET.** «Jejunal brush border microvillus alterations in *Giardia muris*-infected mice : role of T lymphocytes and Interleukin-6.» *Infection and Immunity*, 2000: 3412-3418.
- SEILER, M, J ECKERT, et K WOLFF.** «*Giardia* une andere Darmparasiten bei Hund and Katze in der Schweiz.» *Schweiz Arch Tierheilk*, 1983: 137-148.
- SOLARCZYK.** «Occurrence of *Giardia* species and genotypes in humans and animals in Wielkopolska region, Poland.» *Wiad Parazytol*, 2009: 459-462.
- SWAN, JM, et RCA THOMPSON.** «The prevalence of *Giardia* in dogs and cats in Perth, Western Australia.» *Aust. Vet. J.*, 1986: 110-112.
- TAMS, TR.** «Acute and Chronic Diarrhea in Dogs and Cats.» FVMA's 80th Annual Conference at the Marriott Tampa Wateraide Hotel & Marina, 2009.
- TEOH, DA, D KAMIENIECKI, G PANG, et AG BURET.** «*Giardia lamblia* rearranges F-actin and alpha-actinin in human colonic and duodenal monolayers and reduces transepithelial electrical resistance.» *J. of Parasitol.*, 2000: 800-806.
- TEOH, DA, et A BURET.** «Decreased electrical resistance in duodenal monolayers exposed to *Giardia lamblia* is associated with relocalization of villin and ezrin *in vitro*.» *Gastroenterology*, 1999.
- THOMPSON, RCA.** «Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential.» *Internat. J. of Parasito.*, 2000: 1259-1267.

- THOMPSON, RCA.** «Towards a better understanding of host specificity and the transmission of *Giardia* : the impact of molecular epidemiology.» Chap. 5 dans *Giardia, the cosmopolitan parasite*, de BE OLSON, ME OLSON et PM WALLIS, 55-69. Oxon: CABI Publishing, 2002.
- THOMPSON, RCA, JA REYNOLDS, et AHW MENDIS.** «*Giardia* and giardiasis.» *Adv. Parasitol.*, 1993: 313-315.
- THOMPSON, RCA, RM HOPKINS, et WL HOMAN.** «Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals.» *Parasitol. Today*, 2000a : 210-213.
- THOMPSON, RCA, U MORGAN, RM HOPKINS, et LJ PALLANT.** «Enteric protozoan infections.» Dans *Molecular epidemiology of infectious diseases*, de RCA THOMPSON, 194-209. London: Arnold, 2000b.
- THOMPSON, RCA, UM MORGAN, KJ MELLOR, et RM HOPKINS.** «Genotyping *Giardia* and *Cryptosporidium*.» *Today's Life Science*, 1999: 80-86.
- THURMAN, R, B FAULKNER, D VEAL, et G CRAMER.** «Water quality in rural Australia.» *J. of applied microbiol.*, 1998: 627-632.
- VAN KEULEN, H.** «An overview of *Giardia* taxonomy : an historical perspective.» Chap. 26 dans *Giardia, the cosmopolitan parasite*, de B OLSON, M OLSON et P WALLIS, 283-285. Oxon: CABI Publishing, 2002.
- VENNKATESAN, P, RG FINCH, et D WAKELIN.** «A comparison of mucosal inflammatory responses to *Giardia muris* in resistant B10 and susceptible BALB/c mice.» *Parasitol. and Immun.*, 1997: 137-143.
- VILLENEUVE, V.** *Essai de l'oxfendazole dans le traitement de la giardiose canine.* Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon: ENVL, 2000, 120pp.
- VILLENEUVE, V, F BEUGNET, et G BOURDOISEAU.** «Enquête épidémiologique sur les parasitoses digestives du chien en élevage.» *L'Action Vétérinaire*, 2000a: 16-21.
- VILLENEUVE, V, F BEUGNET, et G BOURDOISEAU.** «Efficacy of oxfendazole for the treatment of giardiasis in dogs. Experiments in dog breeding kennels.» *Parasite*, 2000b: 221-226.
- VOLOTAO, AC, LM COSTA-MACEDO, FS HADDAD, et A BRANDAO.** «Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using beta-giardin gene: a phylogenetic analysis.» *Acta Trop.*, April 2007: 9-10.
- ZAJAC, AM.** «Giardiasis.» *Compend. Cont. Ed.*, 1992: 604-611.

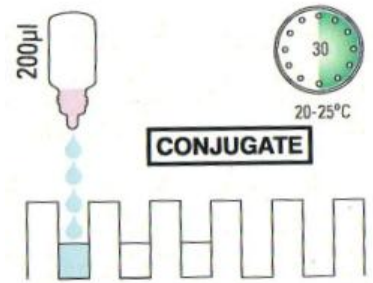
ZAJAC, AM, TP LABRANCHE, AR DONOGHUE, et TC CHU. «Efficacy of fenbendazole in the treatment of experimental *Giardia* in dogs.» *Am. J. Vet. Res.*, 1998: 61-63.

ZIMMER, JF, et DB BURRINGTON. «Comparison of four potocols for treatment of canine giardiasis.» *J. Am. An. Hosp. Assoc.*, 1986a: 168-172.

ZIMMER, JF, et DB BURRINGTON.. «Comparison of four techniques of fecal examination for detecting canine giardiasis.» *J. Am. An. Hosp. Assoc.*, 1986b: 161-167.

ZISLIN, A, M GOLDSTEIN, et D HUSTEAD. «Prevalence of *Giardia* in companion animal populations in the USA.» Dans *Giardia, the cosmopolitan parasite*, de BE OLSON, ME OLSON et PM WALLIS, 87-90. Oxon: CABI Publishing, 2002.

ANNEXE 1 : Protocole pour l'utilisation du kit ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay

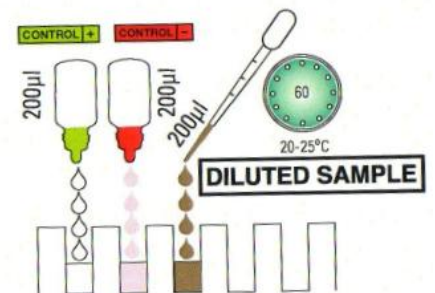


I/ Préparation des échantillons

1. Décongeler le nombre échantillons nécessaires au test à température ambiante
2. Prélever 100mg de chaque échantillon de selles et le placer dans un eppendorf
3. Ajouter 1000µL de tampon de dilution (fourni dans le kit) dans chaque eppendorf
4. Homogénéiser par passage au Vortex®
5. Centrifuger 5 minutes à 8000 tours/min

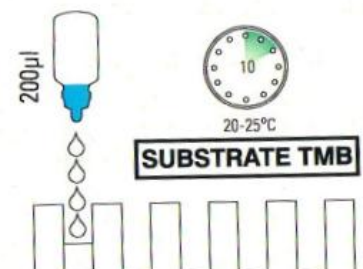
II/ Réalisation du test

6. Placer la plaque sur un support horizontal
7. Déposer 4 gouttes de contrôle positif dans les puits 1, 2 et 3
8. Déposer 4 gouttes de contrôle négatif dans les puits 4 et 5
9. Déposer 200µL d'échantillon dans les autres puits à l'aide des pipettes graduées à usage unique (fournies dans le kit)



10. Couvrir avec le couvercle et laisser incuber 60 minutes à température ambiante
11. Réaliser 3 lavages :
 - Retourner la plaque au-dessus d'un évier, puis remplir les puits de tampon de lavage (Wash buffer) à l'aide d'une pipette électrique.
 - Retourner la plaque pour vider à nouveau tous les puits
 - Répéter l'opération 3 fois
12. Terminer en retournant la plaque sur du papier absorbant, de façon assez vive pour bien vider tous les puits

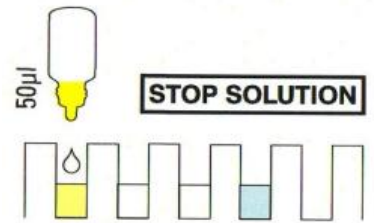
13. Ajouter 4 gouttes de conjugué par puits, couvrir et laisser incuber 30 minutes à température ambiante



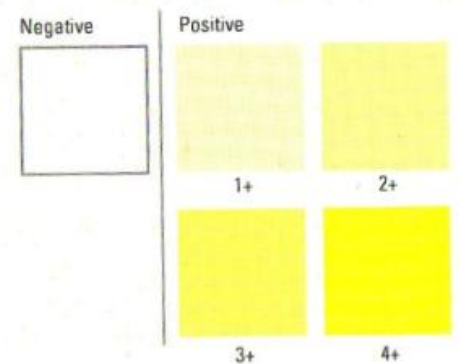
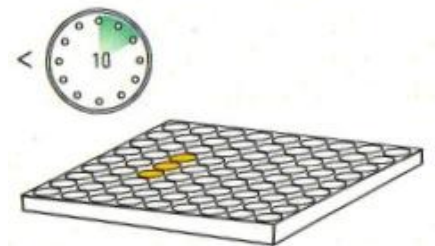
14. Réaliser 5 lavages (méthode identique aux précédents)

15. Ajouter 4 gouttes de substrat (TMB) par puits, couvrir, puis laisser incuber 10 minutes à température ambiante

16. Au bout de 10 minutes, ajouter une goutte de solution d'arrêt (stop solution) dans chaque puits, sans les vider



17. Lire la plaque au spectrophotomètre dans les dix minutes suivant le dépôt de solution d'arrêt



ANNEXE 2 : Grille de scoring fécal appliquée aux selles de l'étude
(GRELLET, FEUGIER et GRANDJEAN, Development of a new fecal scoring system
in puppies, 2011)

Selles liquides, diarrhées :



Selles principalement non moulées et molles :



Selles principalement moulées mais molles :



Selles moulées et fermes :



PREVALENCE ET IMPLICATION DE *GIARDIA* DANS LES DIARRHEES DE SEVRAGE DU CHIOT

NOM : Marine DEBOUCHAUD

RESUME :

La giardiose est une protozoose digestive rencontrée fréquemment chez les carnivores domestiques. Bien que souvent asymptomatique, elle peut s'exprimer cliniquement par de la diarrhée. Les jeunes y sont particulièrement réceptifs et sensibles. Notre étude porte sur l'infection par *Giardia duodenalis* chez le chiot en période de sevrage, soit pendant une phase de stress, où de la diarrhée est fréquemment observée. 439 prélèvements de selles ont été collectés dans un élevage sur 271 chiots entre 4 et 10 semaines d'âge. Les animaux ont été pesés. La présence de *Giardia* a été recherchée par ELISA, celle d'*Isospora* par coproscopie et CPV2 par PCR sur les selles. La prévalence de *Giardia* augmente avec l'âge, de 4,55% d'animaux infectés à 4 semaines à 23,48% à 8 semaines. La race et le sexe des animaux n'ont pas d'influence significative sur la prévalence. Concernant le pouvoir pathogène du parasite, la présence de *Giardia* ne modifie pas significativement le score fécal. Le portage du parasite ne modifie pas le gain moyen quotidien (GMQ) des chiots. 60 % des selles présentaient plusieurs pathogènes (*Isospora*, CPV2) ; l'association de *Giardia* à d'autres agents pathogènes n'avait pas d'influence significative sur le score fécal.

MOTS-CLES: *Giardia* – giardiose - chiot – diarrhée - sevrage

THE PREVALENCE AND THE PATHOGENIC ROLE OF *GIARDIA* IN WEANING DIARRHEA IN PUPPIES

SUMMARY :

Giardiasis is a condition commonly found in dogs and cats. Despite most animals are asymptomatic, one clinical sign of giardiasis is diarrhea. Young animals are more likely to be infected than other animals. Our study is about the *Giardia duodenalis* infection in puppies during the weaning period which is known as a stressful period during which diarrhea often occurs. 439 stool samples were collected in a breeding kennel from 271 puppies which were between 4 and 10 weeks old. Animals were weighed. *Giardia* was detected by the ELISA method. *Isospora* was detected by coproscopy and CPV2 was detected by the PCR method. The prevalence of *Giardia* was found to increase when puppies grew older, from 4.55% infected animal at 4 weeks old to 23.48% at 8 weeks old. No sex- and breed-related resistance or susceptibility was found. Concerning the pathogenic role of the parasite, the infected animals did not have a more frequent pathological fecal score. Being infected does not alter the average daily gain of the puppies. 60 % of the stools were infected with more than one pathogenic agent (*Isospora*, CPV2) ; the association of these pathogenic agents with *Giardia* had no relevant influence on the fecal score.

KEY WORDS : *Giardia* – giardiasis - puppy – diarrhea - weaning period

JURY:

Président : Pr Magnaval
Directeur: Pr Chastant-Maillard
Assesseur : Dr Priymenko

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Marine DEBOUCHAUD
6 rue de la Riollanderie
Le Grand Géant
17430 Tonnay-Charente