ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 59

1984

N° 6

© Masson, Paris, 1984.

Ann. Parasitol. Hum. Comp.,
1984, t. 59, n° 6, pp. 541-554.

MÉMOIRES ORIGINAUX

SUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA GIARDIASE

J.-P. FONTAINE, A. DELAGE et M.-Cl. LAURAIRE*

RÉSUMÉ. Analyse de la prévalence de la Giardiasis dans le Gard ; fluctuations : saisonnières, selon l'âge, selon le sexe. Mise au point d'une méthode de dékystement après passage dans une solution d'induction ; observations et taux de dékystement. Étude de la résistance des kystes dans le milieu extérieur : à sec de — 5° C à 40° C, dans l'eau douce de — 5° C à 20° C, dans l'eau de mer à 10° et 20° C. Conséquences épidémiologiques.

On the giardiasis epidemiology

SUMMARY. Prevalence analysis in the Gard ; fluctuations according to seasons, age and sex. Statement a excystation method after passage in a induction solution ; observations and excystation rate. Cysts resistance study in exterior middle at various temperatures : at dry from — 5° C to 40° C, in fresh water from — 5° C to 20° C and in sea water at 10° and 20° C. Epidemiologic consequences.

Introduction

Le cosmopolitisme de la lambliaose a de quoi surprendre ; on peut s'étonner aussi bien du taux de prévalence persistant dans les régions où le péril fécal n'est pas évident que du seuil qu'il ne dépasse guère dans les pays où l'hygiène est particulièrement défectueuse.

Depuis plus de dix ans que nous effectuons les examens de selles pour le CHR de Nîmes et les consultants externes, nous avons pu juger de la fréquence de l'infestation dans le Gard et étudier ses fluctuations.

* Laboratoire de Parasitologie et Pathologie exotique, Faculté de Médecine, Section Nîmes, Avenue J.-F. Kennedy, F 30000 Nîmes.

Accepté le 20 février 1984.

D'autre part, les travaux américains et le symposium de Cincinnati, en 1979, nous ont incités à utiliser des techniques nouvelles pour mieux appréhender l'épidémiologie de cette protozoose dans notre région.

Prévalence dans le Gard

De 1974 à 1982, nous avons effectué un peu plus de dix milles examens coprologiques et 2 300 d'entre eux nous permirent d'observer un ou plusieurs parasites ; 600 fois il s'agissait de *Giardia intestinalis*. Le taux de prévalence est donc de 6 %, ce qui représente plus du quart des selles parasitées.

1 - Fluctuations saisonnières

Si le taux moyen s'établit bien autour de 6 %, on observe tout au long de l'année des variations mensuelles indépendantes du nombre de selles examinées et de celui des parasites trouvés (fig. 1).

FIG. 1. — Variations mensuelles en valeur absolue.

En établissant les courbes de prévalence année par année, nous sommes surpris par leur similitude. Le graphique récapitulant les 9 années (*fig. 2*) montre un pic à plus de 10 % en janvier, une élévation non négligeable en septembre (7,6 %) et une véritable chute du taux d'infestation en avril-mai (2 à 3 % seulement).

FIG. 2. — Taux de prévalence.

Il existe donc, chez nous, une recrudescence hivernale et un minimum au printemps ; à Paris, le maximum serait plus précoce (septembre-octobre) et le minimum estival ; pour M. Kremer à Strasbourg, sur 23 000 cas, il existe un maximum significatif en hiver et un minimum en été. Les facteurs géoclimatiques paraissent donc intervenir de manière importante ; pour notre région, rappelons les pluies diluviennes ruisselant en novembre sur terrain karstique, puis la sécheresse hivernale qui lui succède.

2 - Fluctuations selon l'âge et le sexe

Le nombre de selles examinées ayant nettement augmenté à partir de 1977, nous n'avons tenu compte que des six dernières années pour cette étude.

a — En fonction de l'âge : 32 % des selles contenant des giardies sont celles d'enfants de moins de dix ans et, 53 %, de sujets âgés de moins de vingt ans (*fig. 3*). Cette différence entre les classes d'âge est retrouvée dans toutes les statistiques qu'elles

soient européennes ou des pays tropicaux. Tout fait penser à un phénomène, difficile à expliquer, d'immunité acquise.

b — En fonction du sexe, les variations nous semblent moins connues et plus surprenantes encore. Au-dessous de 10 ans, pour 19 % de garçons parasités il n'y a que 13 % de filles ; entre 10 et 20 ans, l'écart s'accroît : 17,5 % pour les garçons et 3,5 % pour les filles ; de 20 à 40 ans, la différence est considérable ; par la suite, et jusqu'à 90 ans, les hommes sont deux à trois fois plus souvent parasités que les femmes (fig. 3).

M. Kremer, en 1972, signale déjà cette prédilection pour le sexe fort.

FIG. 3. — Fréquence de l'infestation selon l'âge et le sexe (1977-1982).

Dékystement et cultures des giardies *in vitro*

A — Méthodologie

Jusqu'à ces dernières années, les critères morphologiques, uniquement, étaient retenus pour juger de la vitalité des kystes de *Giardia*. Certes, des milieux de culture avaient été élaborés mais seuls des trophozoïtes prélevés par tubage duodénal pouvaient être ensemencés.

1 — Solutions d'inductions

Les travaux de Bingham et Meyer de 1976 à 1979 permettaient enfin de clarifier la situation. D'une importance fondamentale, ils étaient basés sur le fait que les kystes se transforment en trophozoïtes dans un milieu neutre, après avoir été sensibilisés par un milieu acide. Il suffisait d'imiter la nature, la traversée gastrique induisant le dékystement qui s'effectue ensuite dans le duodénum.

Nous avons testé les différentes solutions d'induction proposées par les auteurs américains en fonction du taux de dékystement obtenu tel que nous le définirons ultérieurement. Un même milieu totalement inefficace à pH neutre, se révèle très favorable s'il est acidifié : nous avons utilisé la salive, le suc duodéno-jéjunal de souris et un suc gastrique synthétique selon la méthode décrite par Hirschowitz et Konturek (NaHCO_3 25 mN, KCl 12 mN, NaCl 40 mN, CaCl_2 12 mN, HCl 120 mN, Pepsine 1 500 U/ml avec un pH final de 1,6). Dans ce milieu, nos meilleurs résultats sont obtenus à des pH compris entre 2 et 4. Bien entendu, sans passage dans une solution d'induction, aucun dékystement n'est obtenu en milieu de culture.

Nous simplifierons encore la technique en utilisant, pour notre expérimentation, de l'acide chlorhydrique à pH 2 (cf. *infra*).

2 — Purification et concentration des kystes

Nous avons repris, dans un premier temps, après adaptation, les techniques de Robert-Thomson et Sheffield-Bjorvatn :

- une suspension de selles dans l'eau est filtrée successivement à travers des mailles de nylon de diamètre : 1 000, 710, 500, 250 et enfin de 177 μm ;
- 3 des 5 ml de filtrat sont placés, sur 3 ml de sucrose 0,85 M glacé, dans un tube à centrifugation ;
- le tube est centrifugé à 600 g pendant 5 minutes, à la température ambiante ;
- l'interface eau-sucrose est enlevée, diluée à 1/10^e dans de l'eau et recentrifugée pendant 5 mn ;
- le culot est resuspendu dans 3 ml d'eau et la centrifugation du gradient de sucrose est rejetée autant de fois que nécessaire afin d'atteindre la pureté désirée ;
- ensuite, l'interface eau-sucrose est de nouveau enlevée, diluée à 1/10^e, filtrée sous vide à travers des mailles de nylon de 20 μm et centrifugée pendant 5 mn ;
- le culot est resuspendu et dilué à la concentration approximale de 50 000 kystes/ml.

Cette méthode de concentration peut être réalisée en 1 heure et permet la récupération de 30 % environ des kystes avec une pureté acceptable au microscope optique.

Cette technique, longue et fastidieuse, qui présente le risque non négligeable d'altérer les kystes, n'est pas indispensable lorsqu'on peut se procurer des selles très parasitées (8 à 10 kystes par champ $\times$ 400).

3 — Culture des giardies à partir de kystes « induits »

Nous avons utilisé le milieu de culture d'Ernest A. Meyer « HSP 3 » :

- 85 ml de solution de Hanks,
- 1 g de Phytone (Peptone papainique de soja),

- 20 ml de sérum humain inactivé et stérilisé,
- 7,5 ml de NCTC 135 médium,
- 1,5 ml de NaHCO_3 1 M (sodium hydrogénocarbonate).

Ces différentes substances sont mélangées dans un ballon et le pH de la solution est ajusté à 7. On ajoute alors certains antibiotiques : pénicilline G (250 000 Unités), gentamycine (1 mg) et streptomycine (2 mg).

Les résultats sont excellents.

Induction et cultures doivent se faire à 37° C.

B — Étude expérimentale et observations

1 — Protocole

Après plusieurs mois de tâtonnements et les recherches préliminaires que nous venons de relater, nous avons établi notre propre méthode dans un souci de rigueur tout en simplifiant les techniques de manière à en faciliter la reproduction et diminuer le risque d'erreurs. Cette méthode est inspirée de celle de Bingham-Jarroll-Meyer :

- 0,1 ml de selles très riches en parasites sont mélangées à 1 ml d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mole, pH 2 ; le tout est mis à incuber à 37° C pendant une heure ;
- après incubation, le mélange est centrifugé à moins de 2 000 tours minute pendant 5 minutes à température ambiante ; le culot est repris dans 3 ml d'eau pH 7 à 37° C et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions ;
- le culot obtenu est ajouté à 0,5 ml du milieu de culture HSP 3 pH 7 (conservé à 37° C pour éviter tout traumatisme thermique des kystes) ; les tubes, inclinés à 45°, sont mis à incuber pendant une heure à 37° C ;
- au bout d'une heure, les tubes sont sortis de l'incubateur et secoués doucement afin de décoller les parasites des parois, sans les détruire ; une centrifugation à 500 tours/minute permet de recueillir les différentes formes parasitaires dans le fond du tube.

Le temps d'incubation a été limité à une heure, après de nombreuses observations ; en effet, cela s'est avéré suffisant pour obtenir le maximum de dékystements, même si ceux-ci ne sont qu'amorcés, parfois.

2 — Observations

Tout d'abord, nous avons suivi l'évolution des kystes *in vivo*, en lame creuse. Leur paroi paraît lysée par les flagelles postérieurs et la brèche ainsi réalisée permet le passage du trophozoïte, un peu comme un ballon de baudruche s'échappe à travers un pertuis (Pl. I, 1, 2) ; le mouvement des flagelles postérieurs intervient activement.

PLANCHE I

1 et 2) *Giardia intestinalis* en voie de dékystement ; 3) Trophozoïte après dékystement, il présente les différents organites, le corps parabasal en particulier ; 4) Kyste de *Lambliia* fraîchement émis ; 5) Kyste infestant ; 6) « Kyste bleu ».

De manière constante, chaque kyste libère *deux formes végétatives* qui donnent souvent un aspect de « monstre à deux têtes ». Quoi qu'il en soit, la maturation complète se fait toujours avant le dékystement.

L'examen après fixation au lugol permet une étude quantitative et le renouvellement des expériences dans des conditions rigoureusement identiques. De surcroît, nous avons eu la surprise de découvrir que *les kystes bleus* (Pl. I, 6), observés depuis longtemps dans certaines selles, ne sont rien d'autres que l'enveloppe abandonnée par les deux trophozoïtes ; il ne s'agit donc pas de kystes morts ou de formes de dégénérescence comme certains l'ont écrit.

3 — Données numériques

Si l'on appelle A le nombre des trophozoïtes comptés sous chaque lamelle (22×22 mm), B le nombre des kystes ouverts (« formes en cacahuète ») et K le nombre de kystes non modifiés, le pourcentage des dékystements s'établit ainsi :

$$\frac{B + A/2}{B + A/2 + K} \times 100$$

Il est évident que nous ne tenons pas compte des kystes bleus.

Aucune erreur ne peut être due à la multiplication des trophozoïtes puisque celle-ci nécessite environ 18 heures, en milieu de culture.

Étude de la résistance des kystes dans le milieu extérieur

La plupart des auteurs français ou étrangers, s'appuyant sur des critères morphologiques, admettent une survie de plusieurs mois en milieu extérieur, lorsque celui-ci est favorable.

Nous avons pensé que nous avions dorénavant les moyens de confirmer ou infirmer expérimentalement ces notions. Notre travail a été effectué au laboratoire dans des conditions aussi proches que possible de celles auxquelles sont soumis les kystes dans le milieu extérieur.

1 - Méthodes

Des selles très riches en giardies sont déposées en même quantité dans douze récipients ; six d'entre eux seront conservés au contact de l'air à des températures diverses : — 5° C, 0° C, 10° C, 20° C, 30° C, 40° C ; dans quatre autres de l'eau douce est ajoutée avant qu'ils ne soient placés à — 5° C, 0° C, 10° C, 20° C ; dans les deux derniers récipients c'est de l'eau de mer qui diluera les selles conservées ensuite à 10° C et 20° C.

Ces températures ont été choisies parce que les plus habituelles, dans notre région, pour chacune des éventualités étudiées.

Tous les deux jours, nous avons prélevé un échantillon dans chaque récipient pour établir les taux de dékystement.

Remarquons que nous avons avant tout cherché à obtenir la reproductibilité du test et que nous nous sommes, volontairement, placés dans des conditions qui sont loin d'être optimales. Les taux de dékystements nous paraissent donc intéressants en valeur absolue mais peuvent être inférieurs aux potentialités réelles des Giardies dans le milieu naturel.

2 - Résultats bruts

a — *douze courbes (fig. 4 à 15)* de dékystements ont été établies sur un laps de temps limité à 30 jours, par la force des choses comme nous le verrons. Chacune représente les résultats des prélèvements effectués dans un même récipient, soit une courbe par température étudiée dans les trois milieux ambiants. Il ne nous a pas été loisible de renouveler tous les examens, nous ne l'avons fait que de manière ponctuelle pour vérifier, en particulier, les résultats qui nous avaient surpris et ceux qui étaient négatifs.

b — *le tableau récapitulatif (tableau I)* permet de noter que les taux de dékystements les plus élevés pour chaque température (chiffres en italique) dessinent des courbes ou des esquisses de courbes comparables pour chacun des milieux de conservation ; en effet, d'une part le maximum de dékystements croît jusqu'à 10° C et diminue ensuite, d'autre part la durée moyenne de maturation des kystes est plus longue lorsque la résistance du parasite est plus grande et que le milieu lui convient mieux. Cette dernière considération nous a particulièrement surpris.

TABLEAU I. — Étude de la survie des kystes par évaluation du taux de dékystement.

		Jours																
		0°C	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
Dans	— 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	<i>4</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L'air	10	0	0	0	4	20	<i>40</i>	31	<i>40</i>	38	35	25	14	17	4	0	0	0
	20	0	14	6	7	14	<i>30</i>	12	10	9	8	4	3	0	0	0	0	0
	30	0	12	13	<i>17</i>	11	8	7	6	4	2	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	<i>12</i>	8	5	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dans l'eau douce	— 5	0	0	0	<i>6</i>	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	3	<i>6</i>	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	9	19	28	33	<i>35</i>	30	28	25	20	16	10	3	0	0
	20	0	3	4	11	21	22	14	19	12	5	8	6	6	2	0	0	0
Dans l'eau de mer	10	0	0	0	31	42	34	<i>51</i>	35	25	22	24	15	11	3	0	0	0
	20	0	0	3	<i>50</i>	43	39	38	27	34	23	19	12	13	2	0	0	0

FIG. 4.

FIG. 5.

FIG. 6.

FIG. 7.

FIG. 8.

FIG. 9.

FIG. 4 à 9. — Courbes de dékystement après conservation des fèces sans adjonction aucune : conservation à sec.

FIG. 10.

FIG. 11.

FIG. 12.

FIG. 13.

FIG. 10 à 13. — Courbe de dékystement après conservation des fèces dans l'eau douce.

FIG. 14.

FIG. 15.

FIG. 14 et 15. — Courbe de dékystement après conservation des fèces dans l'eau de mer.

3 - Analyse des résultats

a — *Délai nécessaire pour que les kystes deviennent infestants :*

- aucun dékystement n'a jamais été possible, malgré nos essais réitérés, avec des selles fraîchement émises ou de la veille ;
- lorsque la température est inférieure ou égale à 10° C, que les kystes séjournent à l'air libre, dans l'eau douce ou dans l'eau de mer, un délai de six jours est nécessaire pour que quelques kystes puissent libérer des trophozoïtes ;
- lorsque la température s'élève, la maturation est obtenue plus rapidement, le dékystement peut avoir lieu dès le second jour.

b — *Potentiel de contamination*

Le pourcentage de dékystement est très variable, nettement fonction de la température, du temps écoulé depuis l'émission des matières fécales ainsi que du milieu.

- à 10° C, les trois courbes sont analogues avec un pouvoir infestant maximum
 - dans l'air du 10^e au 14^e jour,
 - dans l'eau douce au 14^e jour,
 - dans l'eau de mer au 12^e jour ;
- à 20° C dans l'eau de mer, dès le 6^e jour, la moitié des parasites se sont dékystés sous nos yeux et le pouvoir infestant paraît important jusqu'au 20^e jour, très réel jusqu'au 24^e ;
- le potentiel de contamination semble majeur dans l'eau de mer. Le taux de dékystement est toujours supérieur à celui constaté aux mêmes températures (10° et 20° C) dans l'eau douce et, *a fortiori*, à l'air libre.

c — *Résistance des kystes*

- au-delà de 28 jours après leur émission, aucun dékystement n'a pu être obtenu ;
- selon le milieu ambiant :
 - à — 5° C à sec, aucun dékystement ne se produit tandis que, dans l'eau douce, le pouvoir infestant est faible mais réel du 6^e au 10^e jour ;
 - à 0° C, un petit nombre de kystes restent actifs à sec et surtout dans l'eau douce où ils peuvent survivre plus de douze jours ;
 - à 10° C, la résistance est la plus longue mais n'atteint pas un mois ;
 - quand la température augmente, les kystes mûrissent plus rapidement mais résistent moins longtemps ; à 40° C, dans l'air, les trophozoïtes apparaissent dès le second jour mais ne peuvent plus être trouvés au-delà du 10^e jour.

Des modifications morphologiques apparaissent après coloration au lugol ; le kyste fraîchement émis (Pl. I, 4) prend moins bien le colorant et on ne distingue que les deux noyaux ; le kyste infestant (Pl. I, 6), plus brun, présente quatre noyaux ;

un décollement de la coque paraît être un signe de vieillissement. Cependant, aucun critère morphologique n'est suffisant pour supputer le pouvoir infestant d'un kyste : beaucoup d'entre eux, apparemment en parfait état un mois après leur expulsion, ne se sont jamais dékystés malgré nos essais réitérés.

4 - Incidences épidémiologiques

a — La contamination par « les mains sales » et l'auto-infestation, classiquement considérées comme les plus habituelles, semblent exclues, dans nos régions du moins ; en effet, un laps de temps est indispensable à la maturation des kystes.

b — La résistance des kystes de Giardies serait nettement plus limitée qu'on le croyait ; en fait, le temps de survie ne dépasserait pas un mois dans la nature.

c — En revanche, des kystes peuvent survivre à très basse température, sous la neige et même dans la glace, contrairement à une opinion bien établie.

d — La possibilité de contamination par l'eau de boisson est confirmée d'autant que, comme nous l'avons vérifié, la verdunisation n'est pas efficace. Dans nos régions karstiques, les « eaux de source », recherchées par certains, ne semblent pas plus recommandables que les eaux javellisées.

e — Les lieux de baignade et la promiscuité en bord de mer, pourraient entretenir cette protozoose ; le rôle des rivières et celui des piscines n'est certes pas négligeable mais l'eau de mer semble plus favorable encore, ce qui n'a pas été sans nous surprendre. Les baignades de l'été pourraient, peut-être, expliquer la recrudescence de l'infestation constatée au début de l'automne.

Conclusion

L'analyse de la prévalence de la giardiasse dans le Gard, nous conduit à rechercher la réalité d'un péril fécal, certes différent de celui que l'on peut rencontrer ailleurs, mais nécessitant comme partout une attention constante et une surveillance assidue.

La prévalence de la giardiasse dans le Gard nous amène à constater des fluctuations saisonnières qui sont différentes de celles relevées dans d'autres régions de France, une prépondérance de l'infestation chez l'enfant et l'adolescent et enfin un parasitisme beaucoup plus fréquent dans le sexe masculin que dans le sexe féminin, quel que soit l'âge.

L'étude du dékystement en milieu de culture HSP 3, après induction, nous a permis de mieux appréhender ce flagellé. Chaque kyste libère deux formes végétatives et laisse un « kyste bleu ».

Notre expérimentation s'est fixée pour but l'étude de la résistance des kystes ; si elle a toujours été effectuée *in vitro*, c'est dans des conditions aussi proches que possible de celles de la nature. Des résultats chiffrés, on peut déduire quelques considérations épidémiologiques qui nous paraissent nouvelles. La résistance de ce proto-

zoaire aux basses températures et sa prédilection, en général, pour celles situées entre 10° et 20° C, permettent de comprendre sa très large répartition et sa fréquence dans la pathologie intestinale de notre région.

Les modes de contamination sont remis en cause, d'une part par la durée de vie des kystes qui semble ne pas excéder un mois, d'autre part par un temps de maturation du kyste, indispensable, qui excluerait toute possibilité d'auto-infestation. La transmission hydrique est confirmée ; le rôle que pourrait jouer l'eau de mer, lors des baignades estivales, ne semble pas avoir été étudié auparavant.

BIBLIOGRAPHIE

- BINGHAM A. K., MEYER A. : *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature*, 1979, 277, 301-302.
- FONTAINE J. P. : A propos de l'épidémiologie de la Giardiose (Lamblia). *Thèse Médecine*, Montpellier, 1982.
- KARAPETYAN A. E. : *In vitro* cultivation of *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.*, 1962, 48, 337-340.
- KREMER et coll. : Coprologie parasitologique en milieu hospitalier. *J. Med. Strasbourg*, 1972, 3, 131-135.
- LARIVIERE M., BEAUVAIS B. : Lamblia. *Concours Med.*, 1976, 98, 6853-6864.
- MEYER E. A. : Determination of *Giardia* cyst viability. *U.S. Environmental Protection Agency*, Cincinnati, 1979, 36 p.
- O.M.S. : Giardiose d'origine hydrique. *Relevé Epidémiol. Hebd.*, 1980, 11, n° 36, 275-277.
- Symposium : Waterborne transmission of Giardiasis. *U.S. Environmental Protection Agency*, 1979, Cincinnati, 45268 Ohio, 1979, 297 p.
- Symposium on Giardiasis, oct. 1979. *R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1979, 74, 433-445.