

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Biologiques

Option : Biotechnologie microbienne - Microbiologie

THEME



***Giardia intestinalis* : Prévalence et caractérisation moléculaire à partir de populations infantiles et adultes dans deux régions différentes de l'Algérie**

Présentée par : BELKESSA Salem

Devant le jury :

Président :	BOUKHEMZA – ZEMMOURI Nabila	Professeur	U.M.M.T.O
Directeur de thèse :	GHALMI Farida	Professeur	E.N.S.V.A
Co-directeur de thèse :	STENSVOLD Christen Rune	Docteur	S.S.I
Examineurs :	MOULOUA Abdelkamel	M.C.A	U.M.M.T.O
	BAROUDI Djamel	M.C.A	E.N.S.V.A
	LAFRI Ismail	M.C.A	I.S.V.U.B

2020/2021

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

*A ma très chère maman qui m'a chaleureusement soutenue et encouragé tout au long de
mon parcours*

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance

*Quoi que je fasse et je dise, je ne saurai point de la remercier comme il se doit. Son
affection me couvre, sa bienveillance me guide, et sa présence à mes coté a toujours été
ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon très cher papa qui a toujours été à mes côtés pour m'encourager et me soutenir
Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection*

A mon très cher frère Mohamed et mes chères sœurs Naouel et Sara

A ma famille, mes proches et à tous ceux qui me donnent de l'amour et de la vivacité

Puisse dieu vous bénisse, vous donne santé, bonheur, et succès

*Des fois, les mots ne suffisent pas pour exprimer tout le bien je ressens ! Juste
MERCI à vous !!!*

SALEM

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, le courage ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés et de mener à terme ce travail.

Il est rare qu'un travail soit le fruit d'une seule personne, et celui-ci ne fait pas parti des exceptions, aussi qui me soit permis d'exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation, je tiens à remercier :

En premier lieu, mon encadreur Pr. Ghalmi Farida pour sa disponibilité, sa gentillesse, son amabilité qui lui ont valus le respect et la sympathie de tous les doctorants.

Mes vifs remerciements vont plus particulièrement à mon Co-encadreur Dr. Stensvold Christen Rune à Statens Serum Institut, Danemark pour son chaleureux accueil au sein du Department of Bacteria, Parasites and Fungi, son aide précieuse, sa disponibilité, ses conseils et sa gentillesse.

Je tiens à remercier chaleureusement Dr. Lopez Daniel Thomas, Chef de projet scientifique à European Bioinformatics Institute au Royaume-Uni pour m'avoir formé aux procédures de laboratoire (ex : PCR, électrophorèse, analyse in silico), à la rédaction scientifique et pour sa gentillesse, son aide précieuse et ses conseils durant mon séjour au Danemark.

Je suis profondément reconnaissant à Dr. Chikhaoui Nassima et Dr. Bouamama Malika, Unité de Parasitologie-Mycologie, CHU Nafissa Hamoud (ex-Hôpital Parnet), Hussein Dey, Dr. Aiache Nawel et Bentounes Yamina, Unité de Parasitologie-Mycologie, CHU Isaad Hassani, Beni Messous, et Dr. Boussaada Imen, Laboratoire de Parasitologie, Hôpital Docteur Saadane pour leur contribution à la collecte des données et des échantillons.

Ainsi, je remercie le personnel technique du Laboratoire de Parasitologie et Laboratoire de PCR en temps réel à Statens Serum Institut. Plus précisément, je tiens à remercier Derakhshandeh Seid Moradi, Wassmann Lis et Bakerjian Julija pour leur aide dans les travaux de laboratoire. Je remercie également Dr. Cacciò Simone Mario et Dr. Lalle Marco du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les parasites (EURLP) à Rome pour avoir fourni des contrôles positifs Giardia (Assemblage A, Assemblage B et Assemblage E).

J'adresse mes sincères remerciements à Pr. Houali Karim, Directeur du Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie à l'Université Mouloud Mammeri de Fizi Ouzou, pour ses qualités humaines, sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils précieux.

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury : Pr. Boukhemza-Zemmouri Nabila, d'avoir bien voulu présider ce jury. Dr Mouloua Abdelkamel, d'avoir bien voulu examiner ce travail. Dr. Baroudi Djamel, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'en être l'un des examinateurs de cette thèse et Dr. Lafri Ismail, d'avoir bien voulu participer à l'évaluation de ce travail et faire partie de ce jury.

Sommaire.....	Page I
Liste des figures.....	Page II
Liste des tableaux.....	Page III
Liste des abréviations.....	Page IV
1. Introduction.....	Page. 1
Partie bibliographique	
2. Etude de la Giardiase.....	Page. 4
2.1. Historique de la découverte et de la désignation de l'espèce <i>Giardia</i> spp.....	Page. 4
2.2. Taxonomie du genre <i>Giardia</i>	Page. 5
2.3. Cycle de vie.....	Page. 6
2.3.1. Excystation.....	Page. 8
2.3.2. Encystation.....	Page. 10
2.4. Morphologie.....	Page. 11
2.5. Méthodes de détection et de caractérisation moléculaire de <i>Giardia</i> spp.....	Page. 13
2.6. Epidémiologie moléculaire de la giardiase humaine.....	Page. 18
2.6.1. Hétérozygotie de séquence allélique (Allelic Sequence Heterozygosity ou ASH).....	Page. 19
2.7. Transmission.....	Page. 20
2.7.1. Transmission fécale-orale.....	Page. 20
2.7.2. Transmission hydrique.....	Page. 21
2.7.3. Transmission d'origine alimentaire.....	Page. 22
2.7.4. Transmission zoonotique.....	Page. 23
2.8. Pathogénie.....	Page. 25
2.9. Réponse immunitaire.....	Page. 28
2.10. Traitement.....	Page. 28
2.11. Prévention.....	Page. 29
Partie expérimentale (Article 1)	
1. Objectif.....	Page. 32
2. Matériel et méthodes.....	Page. 32
2.1. Population d'étude et prélèvement d'échantillons.....	Page. 32
2.2. Questionnaires.....	Page. 32
2.3. Traitement des échantillons.....	Page. 33
2.4. Analyses statistiques.....	Page. 33
3. Résultats.....	Page. 33
4. Discussion.....	Page. 39
Partie expérimentale (Article 2)	
1. Objectif.....	Page. 42
2. Matériel et méthodes.....	Page. 42
2.1. Collecte d'échantillons de selles.....	Page. 42
2.2. Extraction et purification de l'ADN génomique.....	Page. 43
2.3. PCR en temps réel.....	Page. 43
2.4. Typage moléculaire.....	Page. 45
2.5. Analyse de séquence.....	Page. 46
2.6. Analyses statistiques.....	Page. 46
3. Résultats.....	Page. 47
3.1. Confirmation des résultats de microscopie par PCR en temps réel spécifique à <i>Giardia</i> spp.....	Page. 47
3.2. Analyse spécifique à l'assemblage.....	Page. 49
3.3. Hétérozygotie de séquence allélique	Page. 58
4. Discussion.....	Page. 62
Conclusion.....	Page. 66
Références bibliographiques.....	Page. 67

Liste des figures

Figure 1. Principales étapes de la découverte de <i>Giardia</i>	Page. 4
Figure 2. Modèle proposé du cycle de vie de <i>Giardia intestinalis</i>	Page. 8
Figure 3. Désenkystement de <i>Giardia</i> , échelle 2 μ m.....	Page. 9
Figure 4. Division binaire et obtention des trophozoïtes	Page. 9
Figure 5. Schéma illustrant la transformation progressive du trophozoïte mobile via l'encyzoïte au stade final du kyste	Page. 11
Figure 6. Représentation schématique montrant les principales caractéristiques d'un trophozoïte et d'un kyste de <i>G. intestinalis</i>	Page. 12
Figure 7. Les relations phylogénétiques des parasites <i>Giardia</i> inférées par l'analyse du voisinage des séquences nucléotidiques du <i>tpi</i>	Page. 16
Figure 8. Modèle hypothétique de l'ASH et de recombinaison homologue chez <i>Giardia</i> pendant la diplomixie.....	Page. 20
Figure 9. Les principales voies de transmission des assemblages de <i>Giardia</i>	Page. 25
Figure 10. Représentation schématique de l'interaction complexe entre <i>Giardia</i> et l'hôte.....	Page. 27
Figure 11. Comparaison entre la sensibilité de la PCR en temps réel et la microscopie.....	Page. 48
Figure 12. Valeurs de seuil du cycle de PCR en temps réel selon A) résultats de microscopie (négatifs vs positifs pour <i>Giardia intestinalis</i>) et B) milieu de conservation (éthanol 70% vs bichromate de potassium 2.5%).....	Page. 48
Figure 13. Proportion des cas positifs de <i>Giardia</i> parmi les individus positifs aux parasites selon les tranches d'âge.....	Page. 49
Figure 14. Amplification par PCR de <i>Giardia intestinalis</i> en utilisant la méthode 4E1-HP sur des gels d'agarose colorés avec le colorant ADN EZ-Vision®.....	Page. 50
Figure 15. Amplification par PCR de <i>Giardia intestinalis</i> à l'aide du gène <i>tpi</i> sur des gels d'agarose colorés avec le colorant ADN EZ-Vision®.....	Page. 51
Figure 16. Arbre phylogénétique condensé de <i>G. intestinalis</i> basée sur les séquences du gène <i>tpi</i>	Page. 53
Figure 17. Chromatogramme d'une séquence générée à partir de l'ADN de l'isolat ALG-003 illustrant des variations nucléotidiques ou les positions indiquées par une flèche montrent la présence de doubles pics.....	Page. 60

Liste des tableaux

Tableau 1. Espèces et assemblages reconnus de <i>Giardia</i>	Page. 6
Tableau 2. Gènes fréquemment utilisés pour le typage moléculaire de <i>Giardia</i> . Une grande base de données contenant des informations génomiques et protéomiques sur <i>Giardia intestinalis</i>	Page. 17
Tableau 3. Répartition des parasites intestinaux chez les individus positifs aux parasites ($N = 567$) selon l'âge et le sexe dans la présente étude.....	Page. 35
Tableau 4. Répartition des cas de co-infection impliquant <i>Giardia intestinalis</i> et d'autres espèces de protozoaires par tranche d'âge et présence de diarrhée.....	Page. 36
Tableau 5. Symptômes cliniques observés chez les patients positifs vis-à-vis <i>Giardia</i> et pour des parasites autres que <i>Giardia</i> , respectivement, pour lesquels des informations cliniques étaient disponibles.....	Page. 38
Tableau 6. Liste des oligonucléotides utilisés pour la PCR en temps réel, la PCR spécifique à l'assemblage et le génotypage basé sur le gène <i>tpi</i> avec des indications de la taille des amplicons.....	Page. 44
Tableau 7. Résumé des assemblages de <i>Giardia</i> détectés par l'analyse du gène <i>tpi</i> selon les caractéristiques démographiques de base de la population étudiée.....	Page. 52
Tableau 8. Résumé des résultats obtenus à l'aide de la PCR en temps réel, de la PCR spécifique à l'assemblage et de l'analyse du gène <i>tpi</i> d'échantillons positifs aux <i>Giardia</i> prélevés dans deux zones géographiques distinctes en Algérie, précédemment testés positifs pour <i>G. intestinalis</i> par microscopie des concentrés fécaux et conservés dans l'un ou l'autre du bichromate de potassium 2.5% ou de l'éthanol à 70% avant l'analyse.....	Page. 55
Tableau 9. Analyse comparative de l'étendue de l'hétérozygotie de séquence allélique dans le gène <i>tpi</i> de <i>Giardia intestinalis</i> Assemblage B identifié dans l'étude.....	Page. 59
Tableau 10. Analyse comparative de la séquence des substitutions d'acides aminés exprimées dans le gène <i>tpi</i> des échantillons de <i>Giardia intestinalis</i> Assemblage B identifiés dans l'étude. Seuls les échantillons avec des doubles pics entraînant l'existence de substitutions non-synonymes ont été inclus.....	Page. 61

Liste des abréviations

ASH	Allelic sequence heterozygosity
bg	β -giardin
CWP	Cyst wall protein
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
Ef1- α	Elongation factor 1 alpha
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESVs	Encystation-specific vesicles
Gdh	Glutamate dehydrogenase
GEMS	Global enteric multicenter study
IECs	Intestinal epithelial cells
IL	Interleukin
ITS	Internal transcribed spacer
MLST	MultiLocus sequencing typing
OMS	Organisation mondiale de la santé
pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction enzyme length polymorphism
SSr RNA	Small subunit ribosomal RNA
tpi	Triose phosphate isomerase
UV	Ultraviolet

INTRODUCTION

Les parasites entériques sont des contributeurs importants aux maladies diarrhéiques mondiale (Ryan et al., 2017), parmi ceux-ci, *Giardia intestinalis* (syn. *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*) est un parasite zoonotique flagellé couramment trouvé dans le tractus intestinal des humains et des animaux, entraînant un grand nombre d'infections gastro-intestinales (Feng and Xiao, 2011). Dans le monde, on estime que jusqu'à 280 millions de personnes sont infectées par *G. intestinalis* (Einarsson et al., 2016; Feng and Xiao, 2011; Ryan and Cacciò, 2013; Yoder et al., 2012). La prévalence des infections à *Giardia* signalée chez l'homme varie entre 0.4% et 7.5% dans les pays développés (Feng and Xiao, 2011) et entre 20% et 30% dans les pays en développement à revenu faible et intermédiaire (Erismann et al., 2016; Rafiei et al., 2020). Les enfants sont généralement les plus fréquemment infectés que les adultes (Barry et al., 2013). En raison du fardeau élevé des maladies liées à *G. intestinalis* dans les pays en développement, de son impact sur les améliorations développementales et socio-économiques et de son lien étroit avec la pauvreté, ce parasite est inclus dans l'initiative sur les maladies négligées de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) depuis 2004 (Ankarklev et al., 2010; Cernikova et al., 2018; Savioli et al., 2006). La transmission de *Giardia* se produit généralement après l'ingestion de kystes infectieux via la consommation d'aliments ou d'eau contaminés, ou par une voie fécale-orale directe.

Les symptômes varient en intensité, ce qui peut être attribuable à la fois à des facteurs hôtes et parasitaires (Colli et al., 2015); l'infection est considérée comme asymptomatique dans environ 50% des cas, tandis qu'une diarrhée sévère associée à des vomissements, des ballonnements, des nausées et / ou de la fatigue peut être observée chez les patients symptomatiques et une croissance altérée peut être observée chez les enfants (Einarsson et al., 2016). En plus de provoquer des symptômes aigus, *Giardia* a été associé à des séquelles post-infectieuses à long terme qui incluent des troubles gastro-intestinaux fonctionnels, un syndrome de fatigue chronique, de l'arthrite, des pathologies oculaires et des troubles cognitifs chez les enfants (Halliez and Buret, 2013).

En raison de sa grande variation génétique (Andrews et al., 1989; Monis et al., 2009), *G. intestinalis* est considéré comme une espèce complexe, impliquant huit groupes ou génotypes génétiquement distincts (assemblages A – H) avec un potentiel zoonotique et une spécificité d'hôte variables (Helmy et al., 2018). L'assemblage B en particulier présente une hétérozygotie de séquence allélique (ASH) à travers plusieurs loci (Ankarklev et al., 2012). Les assemblages peuvent être identifiés par réaction en chaîne par polymérase (PCR), soit en

combinaison avec le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), soit par séquençage des amplicons de PCR (Thompson and Ash, 2016; Wegayehu et al., 2016a; Zahedi et al., 2017). En raison des différences de sensibilité des tests PCR et des résultats de génotypage occasionnels discordants entre les locus génétiques, il a été recommandé de déterminer l'assemblage de *G. intestinalis* par analyse multilocus, qui offre une résolution plus élevée (Cacciò et al., 2008) et implique le séquençage de la petite sous-unité (SSU) des gènes de l'ARN ribosomal nucléaire (gène de l'ARNr 18S), des gènes β -giardin (*bg*), glutamate déshydrogénase (*gdh*) et / ou triose phosphate isomérase (*tpi*) (Cacciò et al., 2005; Feng and Xiao, 2011; Koehler et al., 2014; Ryan and Cacciò, 2013). Le gène *tpi* s'est généralement avéré être un marqueur robuste et peut même être utilisé seul pour fournir des informations de base là où aucune connaissance a priori n'est disponible (Sulaiman et al., 2003). Une autre méthode a été développée pour détecter et différencier les assemblages A et B dans des échantillons de matières fécales humaines (Vanni et al., 2012). La méthode est basée sur une PCR en une seule étape utilisant des amorces spécifiques à l'assemblage et repose sur les différences de tailles de produits de PCR pour les assemblages A et B visualisés par électrophorèse sur gel. Cette méthode s'est avérée robuste pour détecter les infections mixtes et en termes d'applicabilité dans les laboratoires dotés d'un équipement moléculaire de base (Vanni et al., 2012).

Une grande partie de nos connaissances sur les facteurs de risque d'infection provient d'enquêtes sur les épidémies, seules quelques études ont abordé les facteurs de risque de la giardiase endémique ou sporadique (Adam, 2001; Eisenberg et al., 2002; Stuart et al., 2003; Thompson, 2000). Un aperçu de l'épidémiologie de l'infection à *Giardia* est essentiel pour développer des stratégies et des activités préventives efficaces.

En Europe et en Amérique, l'épidémiologie des infections humaines à *Giardia* est relativement bien documentée, même au niveau des assemblages. Cependant, en Afrique, très peu de données sont disponibles (Squire and Ryan, 2017), celles-ci tendent à ne tenir compte que de la prévalence sans se concentrer sur les manifestations cliniques de la giardiase chez les enfants et les adultes, ainsi que d'étudier les facteurs qui influencent la distribution de *G. intestinalis* dans cette zone. L'étendue de l'ASH dans le cas de *G. intestinalis* chez l'homme en Afrique, n'a été élucidée que dans une mesure très limitée (Lalle et al., 2009). Particulièrement en Algérie, il n'existe à notre connaissance qu'une seule étude de génotypage de *Giardia* sur des isolats humains, qui a abordé la présence d'assemblages de *Giardia* chez des enfants dans une zone géographique restreinte en utilisant l'analyse PCR / RFLP de *bg*

mais sans fournir de données de séquence d'ADN (Rebih et al., 2020). La portée de la présente thèse est subdivisée en deux parties à savoir :

- 1- Élaboration de l'épidémiologie et la signification clinique des infections à *G. intestinalis* dans la région d'Alger, en identifiant la prévalence de l'infection à *Giardia* et en comparant les données sociodémographiques et cliniques des individus infectés par *Giardia* avec celles relatives aux individus infectés par d'autres protistes parasites intestinaux.
- 2- Caractérisation de *G. intestinalis* chez les enfants et les adultes dans deux zones géographiques distinctes en Algérie, en utilisant la PCR en temps réel, la PCR spécifique à l'assemblage, le géotypage basé sur le séquençage du gène *tpi* et l'analyse de l'ASH dans les assemblages de *Giardia*.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Étude de la Giardiase

1.1. Historique de la découverte et de la désignation de l'espèce *Giardia* spp.

La première description de *Giardia* spp. a été réalisée en 1681 par Van Leeuwenhoek à partir de ses propres selles diarrhéiques (Dobell, 1920). Ce n'était qu'en 1859 pour qu'une description plus détaillée de ce parasite soit effectuée par Lambl qui pensait que l'organisme appartenait au genre *Cercomonas* et l'a nommé *Cercomonas intestinalis* (Adam, 2001). Durant la première moitié du 19ème siècle, la dénomination de ce parasite est sujette à de nombreuses controverses car les noms d'espèces sont basés soit sur l'hôte d'origine, soit sur sa morphologie.

En 1952, Filice publie une description morphologique très détaillée de ce parasite et propose trois espèces pour le genre *Giardia*. Ce micro-organisme est reconnu comme une cause de pathologie diarrhéique à partir de la fin des années 1950. Les principales étapes chronologiques de l'étude et la désignation de *Giardia* sont représentées dans la figure 1 (Bertrand, 2005).

- 
- **1681** : 1^{ère} description de ce parasite par Van Leeuwenhoek.
 - **1859** : Description détaillée de ce parasite par Lambl qui le nomme *Cercomonas intestinalis*.
 - **1881** : Association entre le stade kyste et le stade flagellé.
 - **1883** : 1^{ère} utilisation de *Giardia* comme nom de genre.
 - **1922** : **SIMON** utilise des critères morphologiques pour distinguer *Giardia muris* et *Giardia lamblia*.
 - **1932** : **DOBELL** considère le tractus gastro-intestinal comme le lieu de multiplication de ce parasite.
 - **1952** : **FILICE** publie une description détaillée de *Giardia* et propose alors trois espèces : *G.lamblia*, *G. muris* et *G.agilis*.
 - **1955 à 1965** : La communauté médicale commence à reconnaître *Giardia* comme une cause de pathologie diarrhéique.
 - **1960-1980** : Epidémies d'origine hydrique reportées en Europe et aux Etats-Unis.
 - **1987** : **ERLANDSEN** et **BEMRICK** décrivent une nouvelle espèce : *G. psittaci*.
 - **1988** : Description de l'espèce *G. microti* par Feely.
 - **1990** : Description de l'espèce *G.ardeae* par Erlandsen et al.

Figure 1. Principales étapes de la découverte de *Giardia* (Adam, 2001; Erlandsen et al., 1990; Erlandsen and Bemrick, 1987; Feely, 1988; Rose and Slifko, 1999; Timothy B. Gardner and David R. Hill., 2001).

2.2. Taxonomie du genre *Giardia*

Giardia est un parasite intestinal protiste ubiquitaire et à large spectre actuellement considéré comme appartenant au phylum Metamonada, à l'ordre Diplomonadida et à la famille des Hexamitidae (Thompson and Monis, 2012; Faso and Hehl, 2019; Robertson, 2014). Le nombre d'espèces de *Giardia* a été fortement débattu et jusqu'à récemment, un total de huit espèces de *Giardia* a été validé, incluant : *Giardia intestinalis* (syn. *Giardia duodenalis* et *Giardia lamblia*), *Giardia agilis*, *Giardia ardeae*, *Giardia psittaci*, *Giardia muris*, *Giardia microti*, *Giardia peramelis* et *G. cricetidarum* (Hillman et al., 2016; Monis et al., 2009; Ryan and Cacciò, 2013; Lyu et al., 2018) (Tableau 1). Parmi celles-ci, *G. intestinalis* est une espèce complexe, comportant la plus large gamme d'hôtes infectant les humains et une grande variété d'animaux, tandis que les autres espèces infectent principalement les amphibiens, les rongeurs, les oiseaux et les marsupiaux (Chilvers et al., 1998).

La caractérisation moléculaire de *Giardia intestinalis* a révélé l'existence de huit assemblages génétiquement distincts : les assemblages A et B, qui infectent couramment les humains et de nombreuses espèces de mammifères, les assemblages C et D chez les chiens et autres canidés, l'Assemblage E chez les animaux à sabots, l'Assemblage F chez les chats, l'assemblage G chez les rongeurs et l'assemblage H chez les pinnipèdes (Cacciò et al., 2018) (Tableau 1). Actuellement, les assemblages C-H sont considérés comme spécifiques à l'hôte, à l'exception de quelques cas sporadiques d'assemblages C, D, E et F qui ont été reportés chez l'homme (Broglia et al., 2013; Gelanew et al., 2007; Liu et al., 2014; Scalia et al., 2016; Štrkolcová et al., 2015; Zahedi et al., 2017), par conséquent, ils sont considérés comme potentiellement zoonotiques. Néanmoins, il est à noter que ces études sont basées sur la détection de l'ADN de *Giardia* et non sur la démonstration d'une infection réelle. Les assemblages A et B peuvent être sous-typés en sous-assemblages (par exemple AI, AII, AIII, BIII et BIV) en utilisant le typage multilocus pour faciliter les études de transmission (Cacciò et al., 2018). L'Assemblage A quant à lui, il se divise en deux groupes, à savoir : Assemblage AI et Assemblage AII. Ces deux sous-assemblages AI et AII infectent les humains et les animaux (le sous-assemblage AII étant connu pour être retrouvé plus exclusivement chez l'homme), tandis que le sous-assemblage AIII semble infecter principalement les animaux à sabots sauvages (Cacciò et al., 2018; Lebbad et al., 2010).

Tableau 1. Espèces et assemblages reconnus de *Giardia* (Ryan and Zahedi, 2019)

<i>Giardia</i> spp. /assemblages	Hôtes majeurs	Rapports chez l'homme	Références
<i>G. intestinalis</i>	Les mammifères	Communément rapporté	(Filice, 1952)
Assemblage A	Large gamme de mammifères	Communément rapporté	
Assemblage B	Large gamme de mammifères	Communément rapporté	
Assemblage C	Canidés	Rapports chez l'homme en Chine et en Slovaquie	(Hopkins et al., 1997; Monis et al., 1998)
Assemblage D	Canidés	Un seul rapport chez les voyageurs Allemands	(Hopkins et al., 1997; Monis et al., 1998)
Assemblage E	Animaux à sabots	Plusieurs rapports	(Ey et al., 1997)
Assemblage F	Félins	Une seule donnée chez l'homme en Éthiopie	(Monis et al., 1999)
Assemblage G	Rongeurs	Aucun signalé	(Monis et al., 1999)
Assemblage H	Pinnipèdes	Aucun signalé	(Lasek-Nesselquist et al., 2010)
<i>G. agilis</i>	Amphibiens	Aucun signalé	(Künstler, 1882)
<i>G. microti</i>	Rongeurs	Aucun signalé	(Filice, 1952)
<i>G. muris</i>	Rongeurs	Aucun signalé	(Filice, 1952)
<i>G. ardeae</i>	Oiseaux	Aucun signalé	(Filice, 1952)
<i>G. psittaci</i>	Oiseaux	Aucun signalé	(Erlandsen and Bemrick, 1987)
<i>G. peramelis</i>	Bandicoots bruns du sud (<i>Isoodon obesulus</i>)	Aucun signalé	(Hillman et al., 2016)
<i>G. cricetidarum</i>	Hamsters (<i>Phodopus sungorus</i>)	Aucun signalé	(Lyu et al., 2018)

2.3. Cycle de vie

G. intestinalis est un protozoaire flagellé binucléé qui vit dans la partie supérieure de l'intestin grêle de nombreux hôtes vertébrés. Il est une cause majeure de maladie entérique d'origine hydrique et la différenciation est essentielle à son succès en tant qu'agent pathogène (Svård et al., 2003).

Le cycle de vie de *G. intestinalis* comprend deux étapes principales, un stade trophozoïte mobile non infectieux qui vit dans les intestins de son hôte et un stade kyste infectieux immobile et résistant à l'environnement (Adam, 2001; Eisenberg et al., 2002). La dose infectante pour un humain est d'environ 10 à 100 kystes (Cacciò and Sprong, 2011). Les

infections sont généralement contractées via la consommation d'eau potable contaminée par des kystes parasitaires ou directement par voie fécale-orale (Cotton et al., 2011; Ortega-Pierres and Argüello-García, 2019; Thompson and Monis, 2004), déclenchées par l'ingestion de kystes infectieux (Svård et al., 2003) qui sont stimulés par le milieu acide dans l'estomac et la présence de bile et de trypsine dans le duodénum (Ankarklev et al., 2010). Après la digestion, un précurseur de trophozoïte flagellé émerge activement du kyste (excystation) lors de son passage au niveau stomacal puis intestinal, ouvrant la voie à la colonisation de l'intestin grêle du nouvel hôte (Faso et al., 2013; Faso and Hehl, 2019). Les trophozoïtes adhèrent aux cellules épithéliales et se multiplient par fission binaire (Geurden et al., 2010), ils subissent par la suite des changements biologiques pour survivre à l'extérieur de l'intestin de leur hôte, en se différenciant en kystes résistants (Svård et al., 2003) (encystation, Figure 2) au contact des sels biliaires. Ces kystes seront ensuite excrétés dans les fèces, complétant le cycle de vie (Geurden et al., 2010). Les kystes sont extrêmement résistants au stress et peuvent survivre dans l'environnement externe pendant des semaines et parfois des mois (Cacciò and Sprong, 2011), en milieu aquatique pendant 2 à 3 mois avec inactivation progressive en fonction de la température (Abd El-Latif et al., 2020; DeRegnier et al., 1989; Fletcher et al., 2012; Pons et al., 2015). Ils sont également protégés par la paroi du kyste, du stress environnemental comme les UV (Einarsson et al., 2015). Concernant la résistance aux désinfectants oxydants tels que le chlore, les kystes de *Giardia* sont plus résistants que les bactéries entériques sachant que l'utilisation de 1 mg / L du résidu de chlore libre pendant 25 à 30 min peut atteindre 90% d'inactivation (WHO, 2017). Ils deviennent virulents immédiatement après l'excrétion (Geurden et al., 2010).

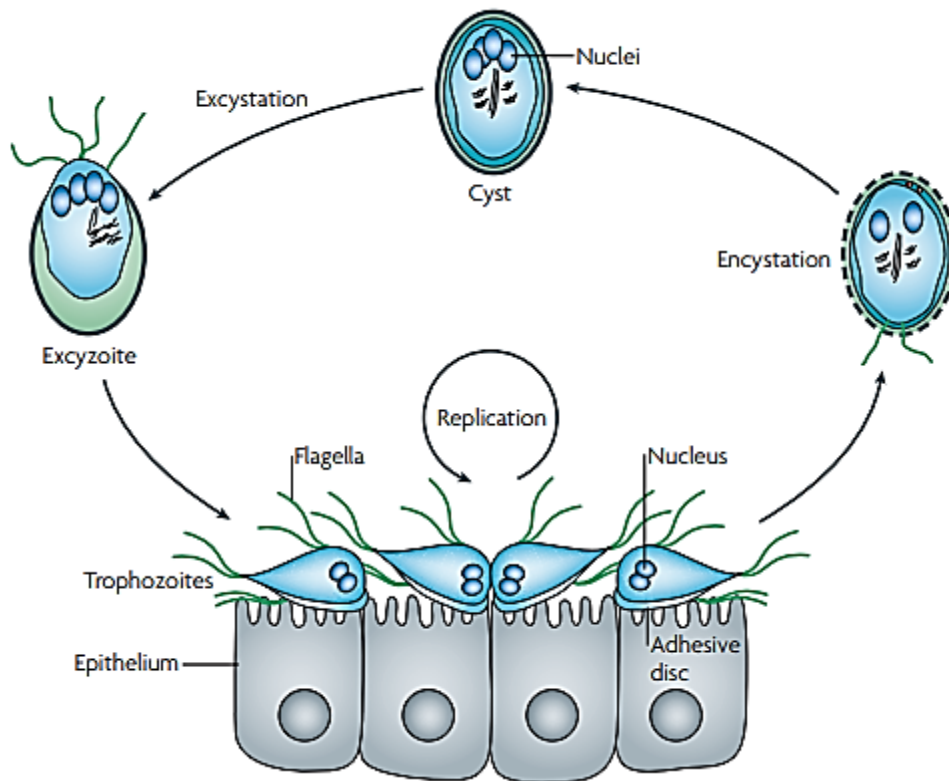


Figure 2. Modèle proposé du cycle de vie de *Giardia intestinalis* (Ankarklev et al., 2010).

2.3.1. Excystation

Les kystes de *Giardia* sont exposés à l'acide gastrique lors de leur passage dans l'estomac de l'hôte, déclenchant une excystation. Ceci comporte une différenciation rapide des kystes en trophozoïtes végétatifs via le stade excyzoïte de courte durée (Ankarklev et al., 2010).

Au début de l'excystation, l'espace pérityrophe s'élargit à mesure que le trophozoïte émergent se sépare de la paroi du kyste (Figure 3). Durant l'excystation, les enzymes contenues dans des vacuoles périphériques de type lysosome telles que les cysteine protéases sont libérées dans l'espace entre le trophozoïte et la paroi cellulaire (Ward et al., 1997). Ensuite, à travers une ouverture dans l'un des pôles du kyste, les flagelles émergent suivies par le corps de l'excyzoïte (Buchel et al., 1987).

La différence entre l'excyzoïte et le trophozoïte réside dans le fait que le premier n'a pas encore assemblé le disque adhésif et qu'il contient quatre noyaux tétraploïdes. L'excyzoïte se divise deux fois, sans réplication d'ADN entre les divisions, donnant naissance à quatre trophozoïtes contenant chacun deux noyaux diploïdes (Bernander et al., 2001) (Figure 4). Au cours du processus de division, le métabolisme et l'expression des gènes de l'excyzoïte

augmentent, entraînant une séparation des organites et régulation à la hausse des protéines associées à la motilité et assemble le disque adhésif (Paget et al., 1998; Palm et al., 2005), par lequel, les trophozoïtes s'attachent à la surface de l'épithélium intestinal et se divisent avec un temps de génération de 6 à 12 heures *in vitro* (Ankarklev et al., 2010).

Expérimentalement, il a été démontré que l'excystation *in vitro* est induite par l'exposition des kystes à un milieu où régnait un pH acide, comparable à celui de l'estomac, qui est généralement compris entre 2-2,7, en utilisant par exemple, des solutions salines acidifiées, souvent complétées par du chlorhydrate de L-cystéine et du glutathion (Rousseau et al., 2018; Tysnes and Robertson, 2016). Cette étape est suivie d'une deuxième dans laquelle les kystes sont exposés à un milieu tel que la trypsine dans une solution de Tyrodes à pH 8, créant un environnement qui rappelle l'intestin grêle (Boucher and Gillin, 1990).

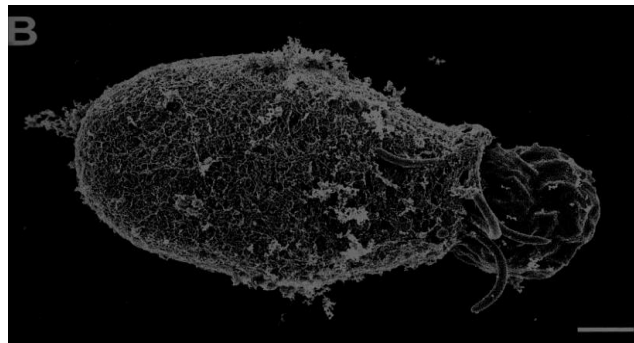


Figure 3. Désenkystement de *Giardia*, échelle 2 μm (Erlandsen et al., 2002)

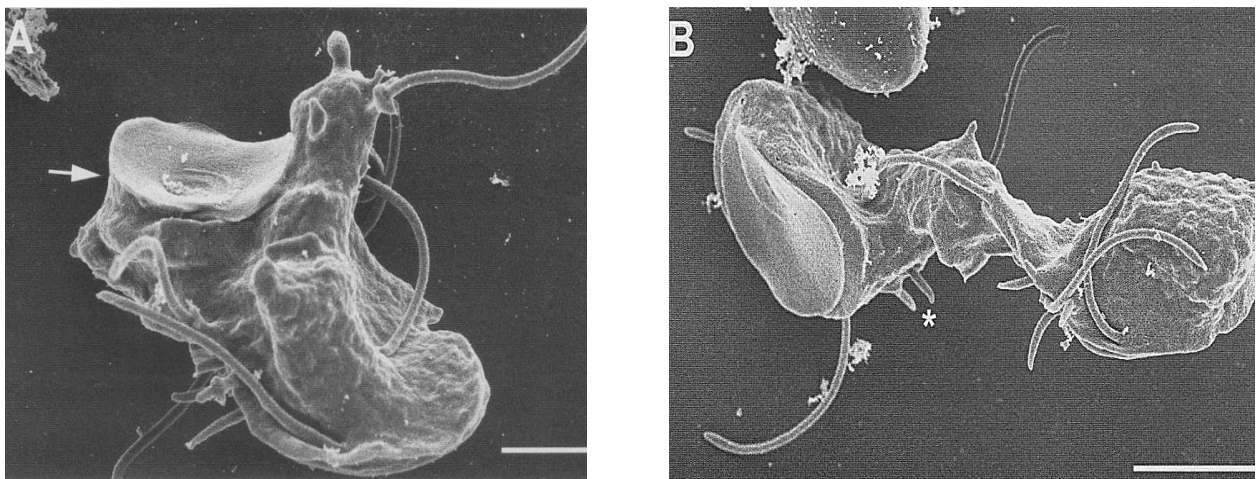


Figure 4. Division binaire et obtention des trophozoïtes (Erlandsen et al., 2002)

La flèche et l'astérisque correspondent respectivement à un disque ventral et une paire de flagelles en formation, échelle 5 μm .

2.3.2. Encystation

Les trophozoïtes commencent à s'enkyster *in vivo* lorsqu'ils migrent vers la partie inférieure de l'intestin grêle (Gillin et al., 1987). L'encystation comprend deux phases à savoir : une phase précoce et une phase tardive. La phase précoce est un processus de transformation qui se traduit par des changements dans la division cellulaire, le métabolisme, l'ultrastructure, le transport des protéines et l'expression des gènes (Svård et al., 2003), durant laquelle, les trophozoïtes adoptent la forme arrondie et les organismes ne peuvent plus se fixer aux surfaces, les vésicules spécifiques à l'enkystation (les structures de type Golgi, ESVs) deviennent alors visibles (Figure 5). Ces vésicules ont pour rôle d'assurer le transport sélectif des protéines de la paroi kystique vers la surface du trophozoïtes (Ankarklev et al., 2010; Svård et al., 2003). En outre, pendant l'enkystation, le disque adhésif se fragmente en quatre structures en forme de croissant qui sont maintenues dans le cytoplasme (Palm et al., 2005). La cellule subit une répllication de l'ADN mais quitte ensuite le cycle cellulaire au stade G2, pour donner une cellule à deux noyaux tétraploïdes. Au cours de l'encystation tardive, ces noyaux se divisent (donnant naissance à quatre noyaux diploïdes) et l'ADN est répliqué une fois de plus, générant des kystes matures à quatre noyaux et une ploïdie de 16n (Bernander et al., 2001). Les kystes ont un taux métabolique inférieur à celui des trophozoïtes et sont très résistants aux facteurs environnementaux pouvant survivre plusieurs semaines dans l'eau froide à l'extérieur de l'hôte (Ankarklev et al., 2010). L'activation du phénomène semble dépendre de plusieurs facteurs environnementaux tels que le pH, la concentration en sels biliaires, en acide lactique ou en acides gras (Gillin et al., 1989, 1987). La membrane plasmique du trophozoïte devenait perméable lorsque l'environnement était pauvre en cholestérol, ce qui induisait une cascade enzymatique (transduction du signal) à l'origine de l'expression des gènes impliqués dans le phénomène d'enkystement (Luján et al., 1998).

Expérimentalement, plusieurs protocoles d'encystation ont été développés *in vitro* pour induire et mettre en évidence le processus d'encystation. Le protocole le plus utilisé comprend deux étapes (Boucher and Gillin, 1990) consistant à affamer les trophozoïtes de bile avant l'addition de milieu d'encystation contenant des niveaux élevés de bile porcine et d'acide lactique. D'autres protocoles utilisent du sérum appauvri en cholestérol (Luján et al., 1996) ou des niveaux élevés de bile bovine (Kane et al., 1991). Ces protocoles semblaient avoir une efficacité pour produire des kystes matures (Einarsson and Svård, 2015).

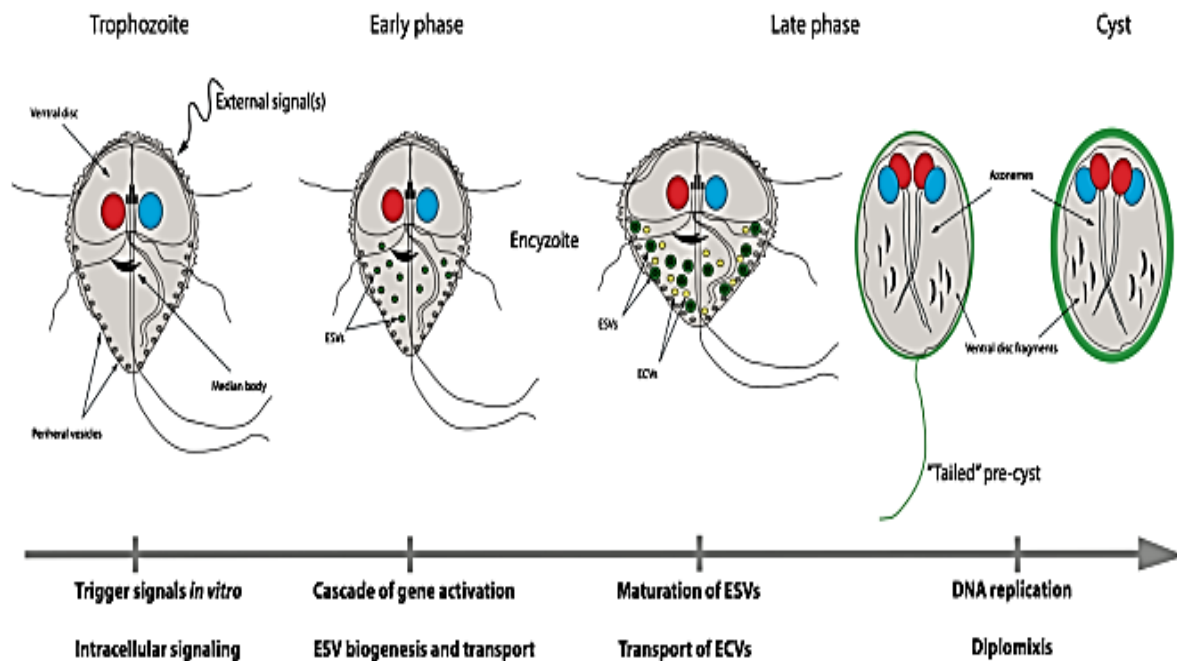


Figure 5. Schéma illustrant la transformation progressive du trophozoïte mobile via l'encyzoïte au stade final du kyste (Einarsson and Svärd, 2015).

2.4. Morphologie

Le trophozoïte se présente sous la forme d'un corps piriforme avec une extrémité antérieure arrondie et une extrémité postérieure effilée. Il mesure approximativement 12–15 μm de long et 5–9 μm de large (Adam, 2001; Ankarklev et al., 2010). La face dorsale du parasite est convexe tandis que sa face ventrale est concave, lui conférant une forme de croissant sur les coupes histologiques (Euzéby, 1986). Le trophozoïte montré ici est vu dorsalement (Figure 6a). Il y a huit flagelles organisés en quatre paires : les flagelles antérieurs (AF), les flagelles ventraux (VF), les flagelles postérieurs / latéraux (PLF) et les flagelles caudaux (CF) ; les lignes pointillées indiquent les structures internes. Les corps basaux sont les sites d'où proviennent les flagelles. Le corps médian est une structure microtubulaire de fonction inconnue (Euzéby, 1986). Quant à sa face ventrale se trouve un disque adhésif de forme subcirculaire qui est une grande structure de fixation rigide composée de microtubules, agissant comme une ventouse et intervenant dans le mécanisme de fixation du parasite aux cellules intestinales (Lanfredi-Rangel et al., 1999) où ils obtiennent les nutriments nécessaires et évitent le transport au-delà du jéjunum (Adam, 2001) (Figure 6a). Plusieurs éléments du cytosquelette entrent dans la composition des disques adhésifs des trophozoïtes comprenant des microtubules, adjacents et parallèles à la surface du disque et des

microrubans (rubans dorsaux), qui sont perpendiculaires et sous-jacents aux microtubules dont la base moléculaire serait des protéines de type giardines, qui sont des hélices à enroulement alpha protéines d'environ 29 à 38 kDa et occupe les deux tiers de la face ventrale du parasite (Heyworth et al., 1999; Peattie et al., 1989).

Il existe plusieurs mitosomes centraux et périphériques dans la cellule. Les vésicules périphériques sont des vésicules de type lysosome qui se trouve sous la membrane plasmique dans toute la cellule. Dans le kyste, la paroi du kyste est une couche interne composée de deux membranes qui protègent le parasite.

Les kystes de *Giardia* sont de forme ovale à subsphérique, non mobiles, mesurant 8–12 μm de long par 7–10 μm de large (Figure 6b). La paroi externe du kyste a une épaisseur de 0,3 à 0,5 μm et est composée d'un réseau de filaments de 7 à 20 nm de diamètre (Ankarklev et al., 2010; Erlandsen et al., 1990, 1989). Cette paroi est principalement composée de 63% d'hydrates de carbone sous forme d'un polymère de N-acétylgalactosamine et de trois protéines différentes des parois des kystes (CWP1, CWP2 et CWP3) (Gerwig et al., 2002) dont le poids moléculaire est respectivement de 26,39 et 27,3 KDa (Jarroll and Şener, 2003). Toutes ces protéines contiennent des répétitions riches en leucine et ont des résidus de cystéine conservés en position (Lujan et al., 1995; Mowatt et al., 1995; Sun et al., 2003). Le disque adhésif et les flagelles sont démontés et stockés dans le parasite. Le kyste a quatre noyaux tétraploïdes (Ankarklev et al., 2010).

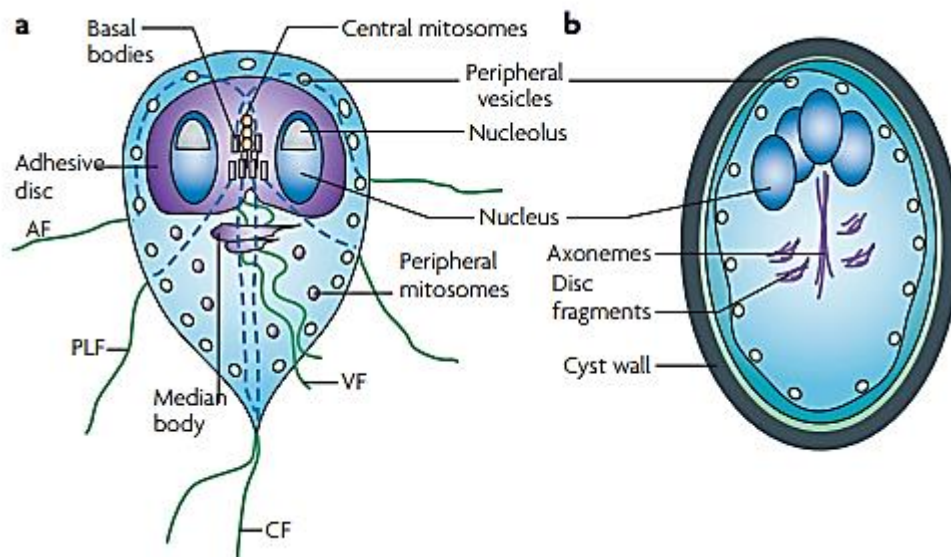


Figure 6. Représentation schématique montrant les principales caractéristiques d'un trophozoïte et d'un kyste de *G. intestinalis*. AF : flagelles antérieurs (x2), CF : flagelles caudaux (x2), PLF : flagelles latéro-postérieurs (x2) et VF : flagelles ventraux (x2) (Ankarklev et al., 2010).

2.5. Méthodes de détection et de caractérisation moléculaire de *Giardia* spp.

Giardia est un parasite connu pour être transmis par voie fécale-orale suite à l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminés. Un certain nombre de méthodes a été développé pour la détection de ces types d'échantillons (Thompson and Ash, 2016).

L'introduction et l'utilisation des techniques moléculaires pour détecter *Giardia*, en particulier celles basées sur l'amplification *in vitro* des acides nucléiques (c'est-à-dire la PCR et les méthodologies associées), a révolutionné l'étude de l'épidémiologie de *Giardia* (Cacciò and Ryan, 2008; Ryan and Cacciò, 2013) en ayant beaucoup aidé à mieux comprendre sa diversité génétique et à résoudre beaucoup de questions sur son mode de transmission et les impacts associés sur la santé publique (Thompson and Ash, 2016).

Des techniques de diagnostic allant de la microscopie traditionnelle, aux tests d'anticorps immunofluorescents et aux protocoles moléculaires à base d'ADN sont en constante évolution et largement utilisés (Thompson and Ash, 2019); offrant souvent une gamme de sensibilité et de spécificité plus élevée pour identifier *Giardia* au niveau des espèces, des assemblages, des sous-assemblages et des génotypes comme rapporté dans de nombreuses études récentes (Adeyemo et al., 2018; Efstratiou et al., 2017; Koehler et al., 2014; Ryan et al., 2019; Soares and Tasca, 2016).

La fiabilité de la sensibilité est probablement un facteur limitant pour la détection moléculaire. Certaines études ont rapporté que l'application de la PCR est plus sensible comparativement aux autres méthodologies telles que la microscopie ou les tests ELISA pour la détection de certains protozoaires tels que *Giardia* (Helmy et al., 2018; Hijjawi et al., 2018; Pan et al., 2018). Tandis que d'autres études rapportent un manque significatif de sensibilité (Imre et al., 2017; Ma et al., 2016; Mero et al., 2017). Cette différence dans la sensibilité entre les différentes études peut s'expliquer par le choix de la méthode d'extraction de l'ADN, la région ciblée du gène à amplifier, le type d'échantillon et la présence des inhibiteurs de PCR (Gasser, 2006; Piggott and Taylor, 2003). Vu la nécessité des études épidémiologiques afin de comprendre la transmission des pathogènes, les techniques moléculaires s'avèrent plus prometteuses surtout lorsque la caractérisation génétique semble être le seul moyen de déterminer l'espèce et le génotype / sous-type de *Giardia* (Thompson and Ash, 2019).

Des techniques d'une grande utilité pour le diagnostic et qui fournissent des dosages quantitatifs, rapides et à haut débit avec une capacité de détecter simultanément plusieurs pathogènes ont été mise au point (Mero et al., 2017; Platts-Mills et al., 2018; Sánchez et al.,

2018; Tsui et al., 2018). Parmi celles-ci, la PCR multiplex, la PCR quantitative (ou qPCR) ou encore la PCR en temps réel peuvent être utilisées à la fois comme des méthodologies individuelles ou en combinaison (Tsui et al., 2018). La capacité de faire la distinction entre des kystes / oocystes viables et non viables en utilisant des analyses d'ARNm est l'une des vertus des outils moléculaires, elles permettent aussi de détecter les cellules métaboliquement fonctionnelles et actives qui sont considérées comme viables, une exigence nécessaire pour déterminer l'infectiosité potentielle d'un nombre d'échantillons donné (Alonso et al., 2014; Ma et al., 2016; Rousseau et al., 2018; Travaillé et al., 2016). Pour la caractérisation des espèces de *Giardia*, des fragments de gènes eucaryotes bien conservés ont été ciblés pour les premiers tests PCR en utilisant des amorces dégénérées qui comprennent la petite sous-unité (SSU) des gènes de l'ARN ribosomal nucléaire (gène codant l'ARNr 18S), deux régions des espaceurs internes transcrits (ITS1 et ITS2), facteur d'élongation EF1-alpha (*Ef1-α*) ou des gènes spécifiques au parasite comme les gènes de *bg*, *gdh* et/ou *tpi* (Cacciò et al., 2010, 2002; Monis et al., 1999; Sulaiman et al., 2003) (Tableau 2). En termes de variabilité génétique, il est important de souligner que ces marqueurs diffèrent largement (Wielinga and Thompson, 2007). L'utilisation des marqueurs fortement conservés tels que l'ARNr 18S et l'*Ef1-α* pour l'identification de *Giardia* au niveau des assemblages est peu utile surtout lorsque la variation génétique au sein des assemblages doit être déterminée (Ryan and Cacciò, 2013). La PCR qui cible l'ARNr 18S a prouvé une sensibilité élevée et elle est souvent utilisée pour la détection de *Giardia* à partir de différentes matrices (par exemple, excréments humains et animaux, échantillons d'eau...), en raison de la nature de ce gène « gène à copie multiple » par rapport aux autres marqueurs tels que *bg*, *gdh* et *tpi* « gènes à copie unique » (Thompson and Ash, 2016). La discordance des résultats entre les études, est probablement due à l'appui sur l'amplification de l'ARNr 18S dans les essais PCR qui ciblent de très petits fragments fortement tributaires de quelques sites polymorphes (Ryan and Cacciò, 2013). En raison de la richesse du locus 18S en GC et pour améliorer la sensibilité de la détection, l'utilisation des tampons PCR spéciaux s'avère nécessaire. La nature clonale de la structure de la population de *Giardia* suggère que l'utilisation d'un marqueur avec une grande hétérogénéité génétique comme *tpi* s'est généralement avéré un marqueur robuste et peut être utilisé seul, il peut fournir une résolution aussi élevée que le typage de séquence multilocus (MLST) et des informations de base lorsqu'aucune connaissance a priori n'est disponible (Figure 7) (Sulaiman et al., 2003). De nombreuses études ont prouvé l'utilisation d'un seul gène dans les essais PCR pour le typage de *Giardia*, cependant, le typage de séquence multilocus MLST

semble être l'approche la plus informative pour le génotypage de *Giardia* (Ankarklev et al., 2018; Ryan and Cacciò, 2013).

La variation génétique des gènes de ménage (Housekeeping genes) utilisés actuellement dans les schémas MLST semble être suffisante pour le génotypage et la discrimination. D'autres marqueurs moléculaires qui présentent aussi une variabilité tels que les microsatellites et d'autres séquences d'ADN répétées peuvent également être utilisées pour la détermination des sous-types mais il s'avère qu'elles soient minoritaires et rarement représentées dans le génome (Ryan and Cacciò, 2013).

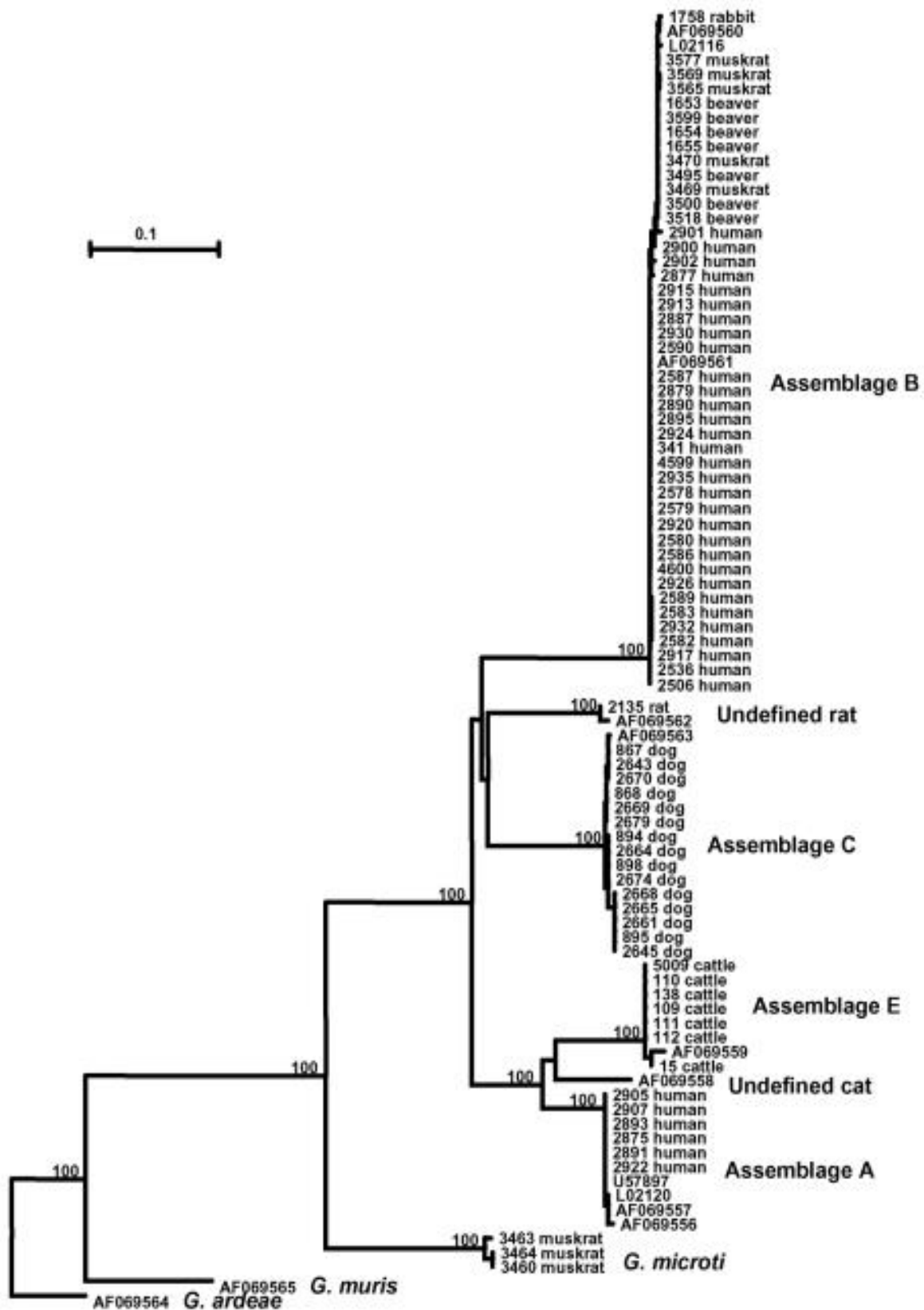


Figure 7. Les relations phylogénétiques des parasites *Giardia* inférées par l'analyse du voisinage des séquences nucléotidiques du *tpi* (Sulaiman et al., 2003).

Tableau 2. Gènes fréquemment utilisés pour le typage moléculaire de *Giardia*. Une grande base de données contenant des informations génomiques et protéomiques sur *Giardia intestinalis* est disponible sur <http://giardiadb.org/giardiadb/> (Cacciò and Sprong, 2011; Ryan and Cacciò, 2013).

Marqueur génétique	Fonction	Localisation	Disponibilité des séquences	Références
Mlh1	Impliqué dans la réparation de l'ADN	CH991767	<i>G. intestinalis</i> assemblage A and B	(Lasek-Nesselquist et al., 2009)
Glutamate dehydrogenase	Enzyme de ménage	CH991814	Tous les assemblages de <i>G. intestinalis</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. ardeae</i>	(Monis et al., 1999)
Triose phosphate isomerase	Enzyme de ménage	CH991767	Tous les assemblages de <i>G. intestinalis</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. ardeae</i>	(Sulaiman et al., 2003)
Beta-giardin	Protéine structurale	CH991793	Tous les assemblages de <i>G. intestinalis</i> , <i>G. muris</i>	(Cacciò et al., 2002)
Elongation factor 1- α (Ef1- α)	Composant de l'appareil de traduction	CH991798	Tous les assemblages de <i>G. intestinalis</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. ardeae</i>	(Monis et al., 1999)
Ferredoxin	Méiateur du transfert d'électrons	CH991769	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B	(Lasek-Nesselquist et al., 2009)
Histone H2B	Protéine nucléosomique	CH991767	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B	(Lasek-Nesselquist et al., 2009)
Histone H4	Protéine nucléosomique	CH991767	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B	(Lasek-Nesselquist et al., 2009)
Actin	Protéine structurale	CH991776	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B, <i>G. ardeae</i>	(Drouin et al., 1995)
α -tubulin	Protéine structurale	CH991767	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B	(Kim et al., 2009)
Chaperonin 60	Protéine de choc thermique	CH991769	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B	(Lee et al., 2009)
Open reading frame C4	Protéine de choc thermique hypothétique	CH991763	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B	(Yong et al., 2002)
18S rDNA	Petite sous-unité du ribosome	Multiple chromosomes	Tous les assemblages de <i>G. intestinalis</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. ardeae</i> , <i>G. agilis</i>	(Monis et al., 1999)
Intergenic ribosomal spacer	Séquence ribosoMasculin non codante	Multiple chromosomes	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B	(Lee et al., 2006)
ITS1, ITS2 et 5.8S rDNA	Ribosomal	Multiple chromosomes	Tous les assemblages de <i>G. intestinalis</i> , <i>G. muris</i> , <i>G. microti</i> , <i>G. ardeae</i>	(Cacciò et al., 2010)
Ribosomal protein L7a	Ribosomal	CH991782	<i>G. intestinalis</i> assemblage A et B	(Lasek-Nesselquist et al., 2009)

2.6. Épidémiologie moléculaire de la giardiose humaine

Les humains sont connus pour être infecté par deux assemblages de *Giardia*, à savoir les assemblages A et B (Mayrhofer et al., 1995). L'analyse moléculaire de plus de 2800 échantillons provenant de différents emplacements géographiques a montré presque exclusivement, seuls les assemblages A et B de *Giardia* sont associés à des infections humaines et que l'assemblage B (58%) a une prévalence plus élevée que l'assemblage A (37%) dans le monde (Ryan and Cacciò, 2013). Il est à noter que la répartition de ces deux assemblages chez l'homme varie à la fois temporellement et spatialement selon les études, parfois au sein d'un même pays (Carvalho-Costa et al., 2007). La mise en évidence des différences géographiques ou socioéconomiques dans la distribution des assemblages A et B et l'évaluation du rôle des infections anthropiques et zoonotiques dans la giardiose humaine n'est pas possible due aux nombre restreint des études épidémiologiques moléculaires conduites chez l'homme (Feng and Xiao, 2011). Cependant, dans les pays en voie de développement, la prévalence des infections mixtes est plus élevée (5.2%) par rapport aux pays développés (3.2%) (Ryan and Cacciò, 2013). Il convient de noter que le biaisement des analyses moléculaire basées sur des PCR classiques pour détecter la population de parasites la plus abondante ont fait que la prévalence d'infections mixtes soit susceptible d'être sous-estimée (Ryan and Cacciò, 2013). Une étude épidémiologique moléculaire antérieure de la variabilité génétique intra-assemblage au sein des assemblages basée sur des polymorphismes protéiques de 23 loci a montré que les isolats de l'assemblage A peuvent être subdivisés en quatre sous-assemblages à savoir : AI, AII, AIII et AIV (Monis et al., 2003). Par ailleurs, la distribution chez l'hôte a indiqué que les isolats humains appartenaient à AI et AII, tandis que les isolats animaux appartenaient à AI, AIII et AIV. De même, l'assemblage B peut être subdivisé en quatre sous-assemblages à savoir : BI, BII, BIII et BIV, comme c'était le cas pour l'assemblage A. Les isolats humains semblaient former deux groupes (BIII et BIV), tandis que les sous-assemblages BI et BII semblaient appartenir aux isolats animaux (singes et chien) (Monis et al., 2003). Cependant, les sous-assemblages BIII et BIV identifiés par électrophorèse des allozymes ne sont pas pris en charge par l'analyse des séquences d'ADN (Feng and Xiao, 2011).

2.6.1. Hétérozygotie de séquence allélique (Allelic Sequence Heterozygosity ou ASH)

Les trophozoites de *Giardia* sont supposés avoir une ploïdie de quatre (Ryan and Cacciò, 2013), avec deux ensembles de cinq différents chromosomes dans chaque noyau résultant en un génome haploïde de 12 Mb de taille (Adam, 2000), avec une asymétrie nucléaire maintenue tout au long du cycle de réplication due au mode de réplication qui est plutôt équationnelle que réductionnelle (Yu et al., 2002). *Giardia* a été considéré comme un organisme strictement asexuel (Adam, 2001; Birky, 2005) sans aucun moyen d'échange d'ADN entre les deux noyaux. Sans ce dernier, une augmentation des différences de séquence entre les deux noyaux est induite due à la mutation aléatoire, par conséquent, une augmentation de l'hétérozygotie au sein de l'individu (Kooyman et al., 2019). Le faible niveau d'hétérozygotie pourrait être dû à l'échange limité d'ADN, connu sous le nom de « diplomixis » (Poxleitner et al., 2008) (Figure 8).

En effet, la présence de chevauchement des pics de nucléotides « doubles pics » à des positions spécifiques dans les chromatogrammes a été principalement observée parmi les isolats de l'assemblage B mais pas de l'assemblage A (Gelanew et al., 2007; Lebbad et al., 2008). Il a été rapporté que le niveau de l'hétérozygotie de séquence allélique (ASH) de l'assemblage B était ($> 0.43\%$) et ($< 0.01\%$) pour les assemblages A et E (Kooyman et al., 2019). L'analyse de 1290 séquences de l'assemblage A, a révélé la présence d'ASH dans 64 séquences, tandis que l'analyse de 1151 séquences de l'assemblage B a montré que 242 séquences présentaient des ASH (Sprong et al., 2009). Vu que l'assignement avec précision des isolats pour l'assemblage B à des sous-types ou sous-assemblages spécifiques est compliqué en raison de la présence des ASH (Ryan and Cacciò, 2013), il a été rapporté que les niveaux relativement faible d'ASH dans l'assemblage A ($< 0.01\%$) par rapport à l'assemblage B (0.5%) pourraient être dus à des composants méiotiques hautement actifs, à une diplomixie efficace ou à des systèmes de réparation d'ADN efficaces. Une autre possibilité encore est que les niveaux très élevés d'ASH dans les isolats de l'assemblage B soient dus aux fréquences plus élevées de fusions cellulaires (sexe) dans les isolats de l'assemblage B (Ankarklev et al., 2012).

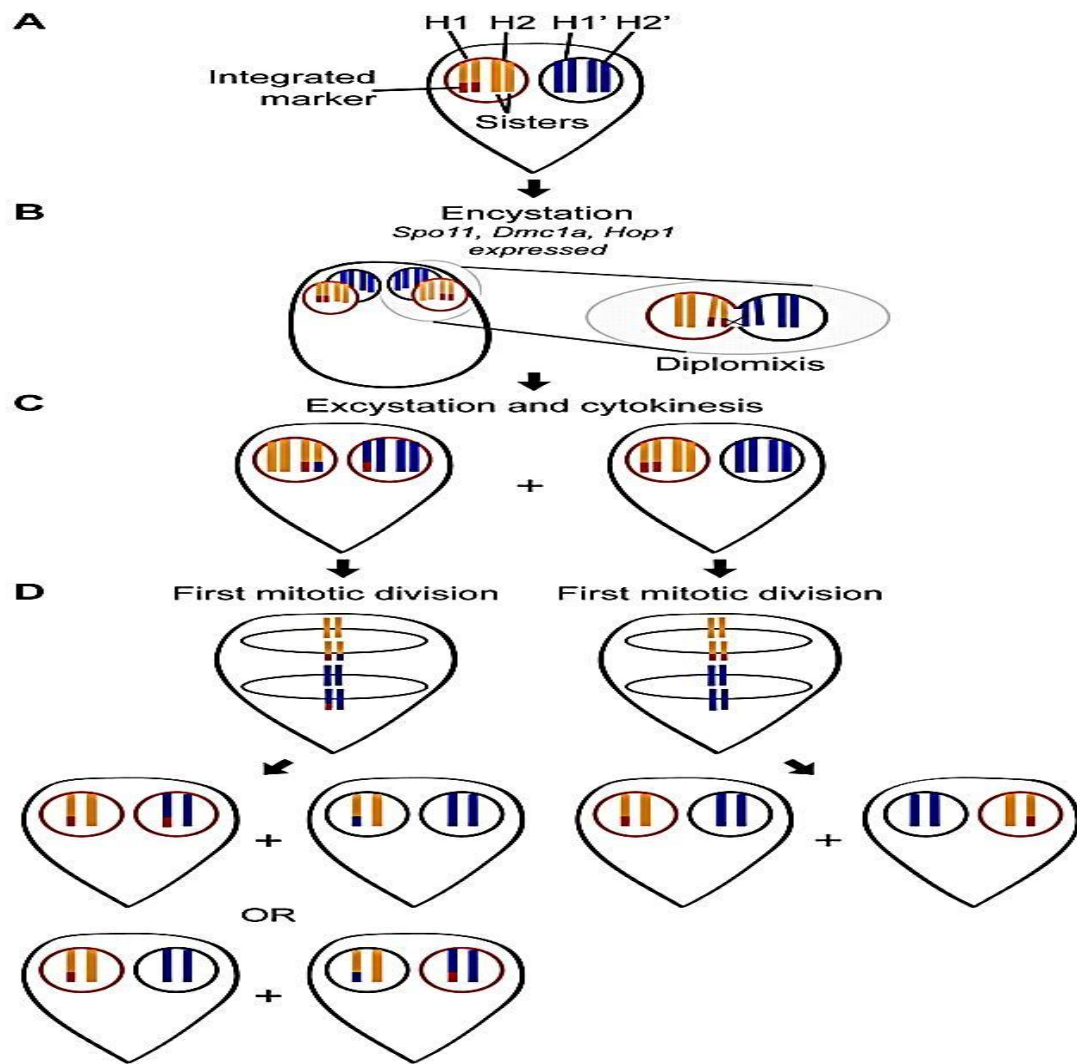


Figure 8. Modèle hypothétique de l'ASH et de recombinaison homologue chez *Giardia* pendant la diplomixie (Carpenter et al., 2012).

2.7. Transmission

2.7.1. Transmission fécale-orale

Chez l'homme, la contamination fécale-orale est la voie principale de transmission de *Giardia* suite à l'ingestion de kystes, ce qui se traduit par des niveaux d'infection plus élevés lorsque les conditions et les niveaux d'hygiène et d'assainissement s'avèrent insuffisants et compromis, en particulier dans les environnements tropicaux et subtropicaux (Balcioglu et al., 2007; Savioli et al., 2006). La contamination peut se faire soit par contact direct avec les selles d'un animal excréteur, soit de façon indirecte. En tant que telle, la transmission directe de personne à personne est considérée comme plus importante que la transmission par voie

hydrique, d'origine alimentaire ou zoonotique (Hunter and Thompson, 2005; Thompson, 2004; Thompson and Smith, 2011). La fréquence de la transmission fécale-orale peut être aggravée par d'autres facteurs environnementaux tels que les garderies où les conditions propices à la contamination fécale-orale sont courantes et des taux de prévalence élevés d'infection à *Giardia* ont souvent été observés (Thompson, 2000; Thompson and Monis, 2012). Quant à la transmission indirecte, les mouches et autres animaux tels que les chiens ou le bétail, qui peuvent être considérés comme des vecteurs mécaniques du parasite, elle représente une menace importante, en particulier, dans les pays en développement (Szostakowska et al., 2004; Thompson and Smith, 2011). Les infections à *Giardia* sont plus courantes chez les animaux domestiques dans le cas où les niveaux de contamination environnementale par les kystes sont élevés, tels que les établissements d'élevage, les chenils, les chatteries, les parcs à chiens, les animaux, les laiteries, les étables et dans le cas des communautés de chiens avec les chiens errants (Itoh et al., 2011; Wang et al., 2012). En outre, Le pelage d'animaux contaminé par des kystes dans les zones de reproduction et de sevrage constitue une voie de transmission directe fréquente (Thompson and Monis, 2012).

2.7.2. Transmission hydrique

La giardiase diagnostiquée dans les pays développés est souvent d'origine hydrique (Karanis et al., 2007; Robertson and Lim, 2011; Smith et al., 2007; Thompson, 2004). La consommation d'eau potable autre que celle provenant des conduites métropolitaines ou d'autres sources filtrées entraînent un risque accru de contamination par la giardiase (Robertson and Lim, 2011). Chez l'homme, la plupart des épidémies de giardiase d'origine hydrique surviennent dans des systèmes d'eau de surface ou souterraine non filtrés suite au contact par le ruissellement de surface ou les rejets d'eaux usées (Ciara et al, 2007; Robertson and Lim, 2011). Les systèmes d'adduction d'eau mal entretenus pourraient également être à l'origine de cette maladie (Daly et al., 2010). L'utilisation d'eaux souterraines pour l'irrigation des cultures vivrières traditionnellement consommées crues semblent peut être avoir un risque accru en tant que source de *Giardia* (Thurston-Enriquez et al., 2002). Dans les pays développés, la contamination par *Giardia* d'origine humaine et la défaillance du processus par les services d'eau, l'industrie ou dans les piscines sont à l'origine de transmission par voie hydrique (Dale et al., 2010; Shields et al., 2008; Stuart et al., 2003).

La santé de l'écosystème peut avoir un effet négatif suite à une telle contamination entraînant des infections chez la faune aquatique pouvant alors servir de réservoirs pour

l'infection humaine. L'exemple le plus connu est celui du rôle du castor en tant que réservoir de «déversement» de *Giardia* en Amérique du Nord (Thompson et al., 2009). Il a été démontré que les mollusques filtreurs et les poissons d'eau douce peuvent servir comme des indicateurs utiles de la présence de *Giardia* d'origine humaine y compris la présence d'autres agents pathogènes d'origine hydrique (Nappier et al., 2010; Thompson and Monis, 2012; Thompson and Smith, 2011).

Dans les pays en voie de développement, pour boire, préparer des aliments, laver les vêtements et encore pour l'hygiène personnelle, les lacs, les ruisseaux et les autres sources naturelles d'eau de surface sont beaucoup plus utilisés, ce qui peut augmenter les risques d'infection hydrique (Hunter and Thompson, 2005; Thompson and Smith, 2011). L'infection d'origine hydrique est accrue dans les zones sujettes aux inondations surtout lorsque des systèmes d'égouts de base sont utilisés et que le confinement est susceptible d'être compromis (Thompson and Smith, 2011). La transmission d'agents pathogènes d'origine hydrique tels que les espèces zoonotiques de *Giardia*, dans et entre les systèmes terrestres et marins peut être augmentée suite à une fréquence et une ampleur accrue des inondations due aux changements climatiques (Kutz et al., 2009).

2.7.3. Transmission d'origine alimentaire

Giardia figure parmi les parasites protozoaires entériques connus pour être transmis facilement par les aliments (Robertson, L.J., Lim, 2011; Thompson and Monis, 2012). L'utilisation de déchets humains comme engrais et des techniques de pasteurisation inadéquates peuvent augmenter la transmission d'origine alimentaire (Thompson and Smith, 2011). Cependant, les manipulateurs d'aliments infectés et la mauvaise hygiène s'avèrent être associés à la transmission d'origine alimentaire, généralement au niveau local plutôt que comme source d'épidémies d'infection à *Giardia* (Robertson and Lim, 2011; Smith et al., 2007). Il a été rapporté que le nombre de cas de transmission d'origine alimentaire est estimé entre 13 à 76 millions dans le monde (Thompson and Monis, 2012; Thompson and Smith, 2011). La contamination par des kystes peut être due à la consommation de plusieurs aliments tels que le saumon en conserve, les salades, les sandwiches, les crudités et la glace (Robertson and Lim, 2011; Smith et al., 2007). Les épidémies d'infection à *Giardia* associées à des aliments contaminés est moindre due probablement au manque d'outils appropriés ou à leur application, à la nature sporadique de ces épidémies, au manque de sensibilisation et à la sous-déclaration (Robertson and Lim, 2011; Thompson and Smith, 2011).

2.7.4. Transmission zoonotique

Concernant la répartition des espèces zoonotiques et spécifiques de *Giardia* et le suivi de la transmission, l'application d'outils de la biologie moléculaires pour le «typage» d'isolats de *Giardia* à partir d'échantillons fécaux d'hôtes de mammifères humains et non humains dans différentes parties du monde a permis d'élargir les connaissances en fournissant une quantité considérable d'informations. Ces études montrent clairement que la contamination de l'environnement par les kystes zoonotiques de *Giardia* se fait dans les zones où existe un potentiel de transmission zoonotique. Le nombre de loci utilisé pour le génotypage d'espèces, la sensibilité de méthodes de typage utilisée ainsi que le nombre d'espèces hôtes échantillonnées peuvent avoir un impact sur la valeur épidémiologique de ces études. Cependant, pour mettre en évidence la preuve de la fréquence du risque de transmission zoonotique, des études focales sont nécessaires dans des zones d'endémie définies où la dynamique de transmission et la gamme d'hôtes sont connues (Thompson and Monis, 2012). Les assemblages zoonotiques et spécifiques à l'hôte de *Giardia* qui sont morphologiquement identiques peuvent être hébergés par les animaux qui servent de réservoir. Ainsi, afin de déduire l'origine de la transmission, des outils de typage sensibles sont nécessaires (Feng and Xiao, 2011; Ryan and Cacciò, 2013). En vue d'une distinction génétique efficace et suffisante permettant de déduire les origines ou les sources de transmission de *Giardia*, des outils qui permettent une amplification sensible des loci génétiques à partir d'échantillons cliniques doivent encore être mis au point (Ryan and Cacciò, 2013). La classification de l'hétérogénéité génétique qui se présente au sein d'un assemblage où la non-concordance entre les loci est un problème sérieux, il doit être interprété prudemment et complété sur la base des données MLST lors de l'application de l'analyse moléculaire pour identifier des assemblages chez des hôtes animaux. Vu la prévalence élevée d'infections mixtes rapportée lors de la comparaison des amorces spécifiques à l'assemblage versus la PCR suivie d'un séquençage, il s'avère plus judicieux d'utiliser des amorces spécifiques à l'assemblage en plus des données MLST dans les enquêtes épidémiologiques moléculaires ; ceci est due à la susceptibilité de la sous-estimation des infections mixtes (Geurden et al., 2009; Levecke et al., 2007; Ryan and Cacciò, 2013) qui est l'une des raisons pour lesquelles plusieurs marqueurs génétiques peuvent identifier différents assemblages dans le même échantillon (Ryan and Cacciò, 2013).

Par définition, une zoonose est une infection humaine acquise à partir d'hôtes non humains dans des conditions naturelles à travers l'ingestion de kystes de *G. intestinalis* excrétés par les animaux (Heyworth, 2016). Les preuves directes et non équivoques que la

giardiase humaine peut en être un exemple sont limitées (Heyworth, 2016). Il a été démontré lors d'une étude menée au Royaume-Uni que le contact avec les animaux de compagnie particulièrement les chiens et les chats et les animaux de ferme particulièrement les porcs constituait un facteur de risque d'acquisition de la giardiase chez les sujets humains (Heyworth, 2016). Il a été aussi rapporté d'après une étude menée dans une communauté productrice de thé dans le Nord-Est de l'Inde que *G. intestinalis* peut être transmis entre chiens et sujets humains (Traub et al., 2004) (Figure 9). Une association entre la présence d'une infection à *G. intestinalis* chez des sujets humains et chez des chiens occupant le même foyer a été signalée au sein d'une même étude. Une identité génétique entre *G. intestinalis* chez un chien et chez un ou plusieurs sujets humains a été signalée (Traub et al., 2004).

En raison de l'existence de plusieurs preuves stipulant que l'environnement et les mammifères sauvages soient contaminés et infectés par les kystes de *Giardia* d'origine humaine (qui, à leur tour, peuvent servir de réservoir pour une infection future de sujets humains), la majeure partie de la littérature sur la transmission inter-espèces de *G. intestinalis* se soit focalisée sur la transmission réelle ou présumée d'animal à humain, ceci pourrait être illustré par l'étude menée en Australie chez les otaries australiennes (*Neophoca cinerea*) exposés à divers niveaux d'interaction humaine où les auteurs concluent que la probabilité d'infection initiale des animaux par des kystes d'origine humaine est témoignée par l'excrétion des kystes de l'Assemblage B par les otaries australiennes, et la proximité relative des colonies de ces animaux avec les établissements humains sur les sites côtiers (Delport et al., 2014). De même la transmission interhumaine du parasite peut être reflétée par la présence d'une infection des assemblages A et B par *G. intestinalis* chez les gorilles en liberté (Graczyk et al., 2002; Hogan et al., 2014).

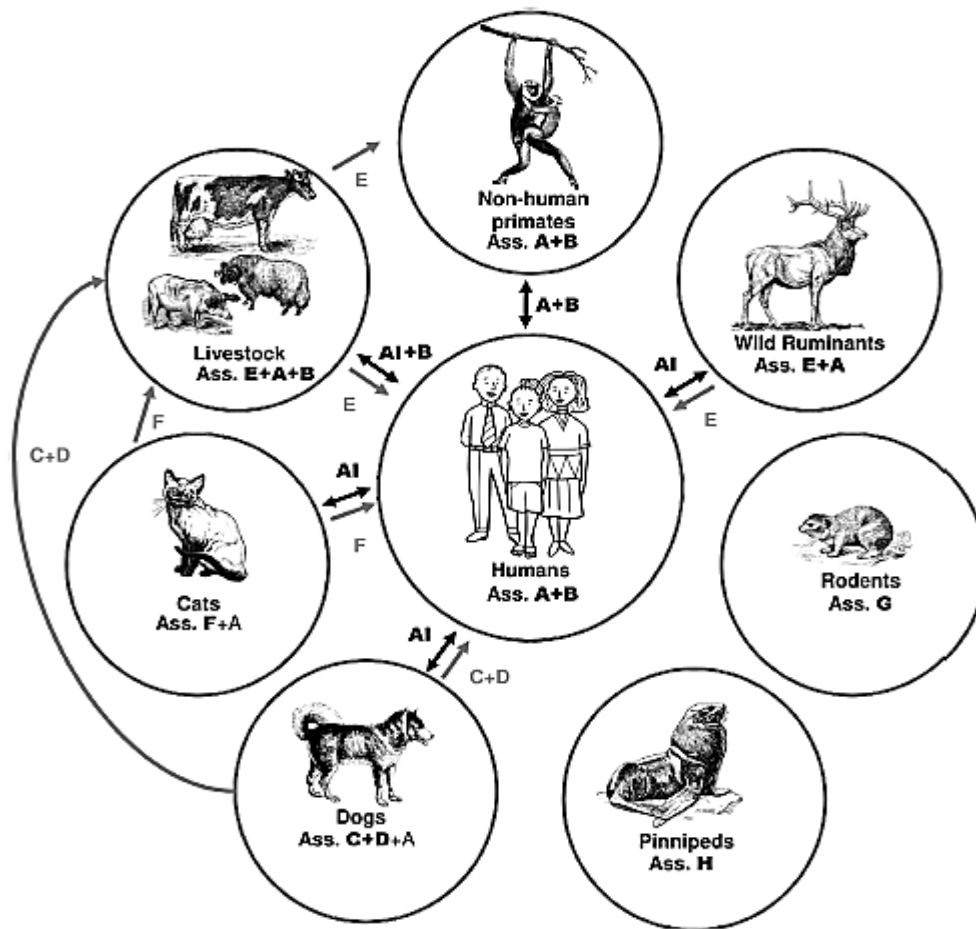


Figure 9. Les principales voies de transmission des assemblages de *Giardia* (Cacciò et al., 2018).

2.8. Pathogénie

La giardiase est une maladie à large éventail de symptômes qui semblent être due à plusieurs facteurs considérés comme importants dans l'étiologie de la giardiase à savoir : les espèces et / ou souches de *Giardia*, l'immunité de l'hôte, l'âge, le plan nutritionnel, le stress et la dysfonction épithéliale, reflétant l'interaction complexe entre l'hôte et le parasite (Einarsson et al., 2016; Thompson and Ash, 2019). L'induction de la maladie implique plusieurs mécanismes induits par les parasites (Figure 10). *Giardia* est un parasite non invasif dont la réplication se fait lorsqu'il est attaché à l'épithélium intestinal (Einarsson et al., 2016). Les symptômes se manifestent généralement environ 7 à 12 jours après l'infection et incluent des changements pathogènes à savoir : la diarrhée (avec ou sans syndrome de malabsorption), les nausées, les vomissements et la perte de poids (Bartelt and Sartor, 2015; Einarsson et al., 2016; Thompson and Ash, 2019).

La plupart des patients infestés par *Giardia* se trouvent généralement entre deux extrêmes; certains souffrent d'une maladie bénigne qui disparaît spontanément, tandis que d'autres souffrent d'une maladie grave qui dure longtemps et qui est rebelle au traitement (Bartelt and Sartor, 2015; Einarsson et al., 2016).

Il est à signaler, que dans les pays en développement, les maladies diarrhéiques représentent une cause majeure de décès chez les jeunes enfants (Einarsson et al., 2016). A cet effet, de nombreuses études ont été menées dans le but de mettre en évidence le degré d'incrimination de *Giardia* dans les maladies diarrhéiques. De nombreux cas d'infection à *Giardia* sont apparemment asymptomatiques. Une étude communautaire récente à grande échelle portant sur environ 30 000 enfants âgés de 0 à 24 mois a montré que *Giardia* n'était associé à la diarrhée pour aucun groupe d'âge, site ou syndrome diarrhéique (Platts-Mills et al., 2015). Une tendance similaire a été rapportée dans une autre étude Multicentrique Entérique Global (GEMS) indiquant que les enfants d'âge préscolaire infectés par *Giardia* avaient significativement moins d'épisodes de diarrhée aiguë que ceux non infectés par *Giardia*, suggérant que l'infection par *Giardia* pourrait avoir un effet protecteur contre la diarrhée, par conséquent, réduisant l'incidence des maladies diarrhéiques graves chez les enfants (Muhsen et al., 2014). Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine des différences de résultats de la maladie observée entre les individus des pays en développement et des pays développés. Parmi ceux-ci, le statut immunitaire (développement de réponses immunitaires croisées, réponse inflammatoire réduite), différences dans l'état nutritionnel, modification de la composition du microbiote due à des co-infections et l'exposition à d'autres bactéries commensales, et une flore normale intestinale (Einarsson et al., 2016; Fink and Singer, 2017). Néanmoins, *Giardia* semble être le quatrième agent pathogène le plus fréquemment trouvé dans les selles des enfants de moins de 1 an et le deuxième agent pathogène le plus fréquent chez les enfants entre 1 et 2 ans (Platts-Mills et al., 2015). Les mesures de la taille et du poids réduits chez les enfants de 2 ans s'avéraient être associées à la détection de *Giardia* (Rogawski et al., 2017), bien que le retard de croissance et l'émaciation étaient quelque peu variables entre les études (Bartelt and Sartor, 2015).

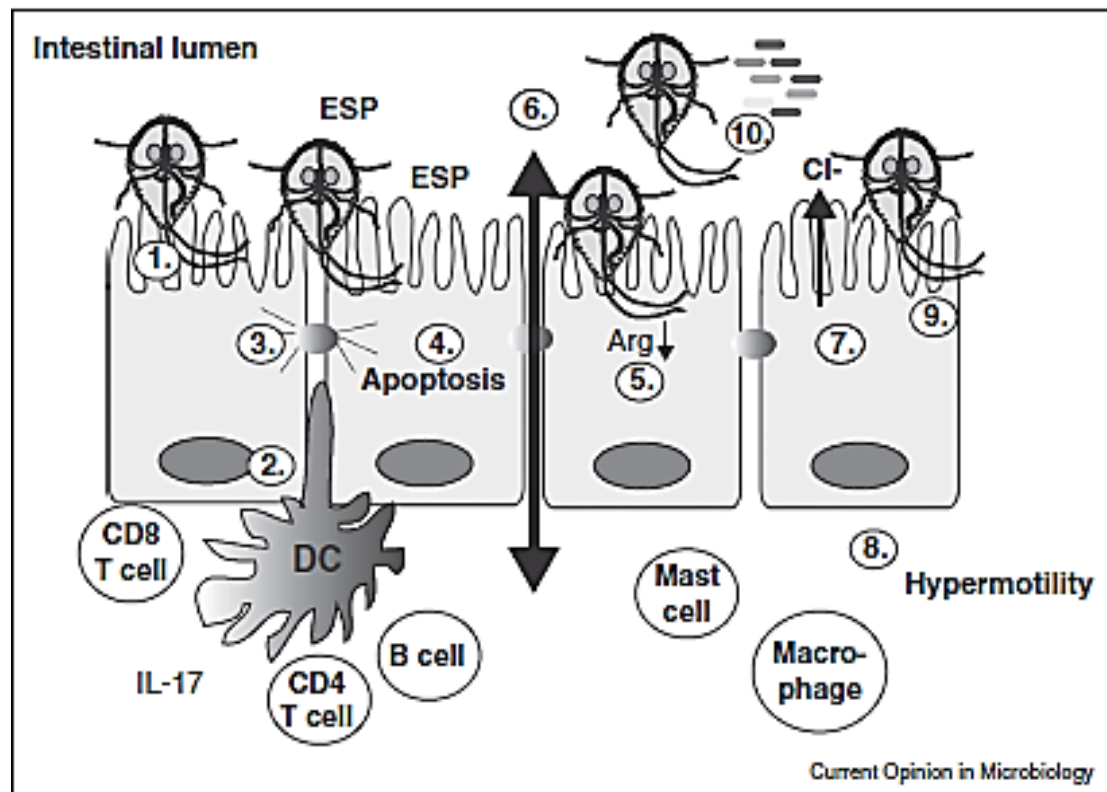


Figure 10. Représentation schématisée de l'interaction complexe entre *Giardia* et l'hôte (Einarsson et al., 2016).

- 1) Raccourcissement diffus des microvillosités et inhibition des enzymes de bordure de brosse. Cela implique la fixation des parasites et des cellules T CD8 +.
- 2) Induction de chimiokines dans les cellules épithéliales intestinales (IECs), entraînant l'attraction de cellules immunitaires comme les mastocytes et les cellules dendritiques (DC).
- 3) Perturbation des jonctions serrées.
- 4) Induction de l'apoptose.
- 5) Privation pour l'arginine dans les cellules épithéliales intestinales, entraînant moins de l'oxyde nitrique (NO), l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.
- 6) Augmentation de la perméabilité intestinale induite par les mécanismes trois à cinq.
- 7) Augmentation de la sécrétion d'ions chlorure.
- 8) Hypermotilité intestinale.
- 9) Hyperplasie des cryptes et augmentation de la sécrétion de mucus.
- 10) Modification de la composition de la flore bactérienne normale. Les cellules parasites et hôtes sécrètent des protéines spécifiques à l'enkystement (ESP) lors de l'interaction.

2.9. Réponse immunitaire

L'épithélium intestinal joue un rôle important durant les infections à *Giardia*. Il constitue une barrière sûre contre les microbes envahisseurs. La perméabilité augmente pendant la colonisation par *Giardia* de l'intestin grêle, ce qui entraîne la translocation des microbes intact et / ou des antigènes microbien dans la lamina propria (Fink and Singer, 2017). La réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de *Giardia* fait intervenir des réactions à médiations humorales et cellulaires.

Les cellules immunitaires innées telles que les macrophages et les cellules dendritiques sont activées et initiées en aval de la réponse immunitaire adaptative. Il n'est pas aussi évident de savoir quels sont les récepteurs et les parasites qui servent à l'activation de ces réponses, autres que l'Interleukine 6 (IL-6). Les cytokines qui conduisent au développement de réponses immunitaires adaptatives sont inconnues (Fink and Singer, 2017).

Giardia est capable d'induire une réponse immunitaire adaptative robuste chez les humains et les animaux (Singer et al., 2019), qui se manifeste par la production de grande quantité d'immunoglobulines A (IgA) spécifique du parasite par les cellules B suite à une infection. La production de l'interleukine cytokine IL-17 par les cellules T CD4⁺ Th17 et l'activation des cellules T CD8⁺, contribuent à la protection et au contrôle de l'infection ou à l'immunopathologie.

Des peptides antimicrobiens sont sécrétés et les IgA sont transportés dans la lumière par les cellules épithéliales intestinales (IECs) en réponse à l'IL-17 où elles peuvent aider à assurer la protection contre *Giardia* en ayant aussi un effet sur les microbes commensaux. En outre, en réponse à *Giardia*, l'oxyde nitrique peut être produit par les IECs et utilisé pour aider l'immunité protectrice en inhibant la réplication de *Giardia*, mais aussi, libérer des chimiokines pour recruter des cellules immunitaires innées (Eckmann et al., 2000; Fink and Singer, 2017). L'activation des cellules T CD8⁺ induit des symptômes pathologiques, notamment le raccourcissement des microvillosités de la bordure en brosse et la réduction de l'activité disaccharidase par un mécanisme inconnu (Fink and Singer, 2017).

2.10. Traitement

Il existe plusieurs médicaments anti-giardiques, dont le plus utilisé est le métronidazole (MTZ) qui est un médicament de la classe des 5-nitroimidazoles (5-NI). Il a été considéré comme un traitement de première intention contre l'infection à *Giardia* (Ordóñez-Mena et al.,

2018), dont le mécanisme d'action est plus étudié. Pour devenir toxique, le métronidazole doit être réduit en induisant des dommages à l'ADN et aux protéines dans les organismes microaérophiles et anaérobies (Einarsson et al., 2016; Müller et al., 2015; Watkins and Eckmann, 2014) entraînant la perte de la structure hélicoïdale de l'ADN et inhibant les étapes de réplication et transcription provoquant la mort des trophozoïtes. Le métronidazole peut également cibler d'autres enzymes telles que l'enzyme redox, la thiorédoxine réductase, dont l'inactivation provoque un stress oxydatif sévère (Einarsson et al., 2016; Leitsch et al., 2012).

Cependant, une étude récente portant sur l'efficacité comparative des médicaments pour traiter la giardiose avec une mise à jour systématique de la littérature et méta-analyse en réseau d'essais cliniques randomisés, a conclu que le traitement par le Tinidazole (TNZ) est supérieur et peut offrir un traitement plus court avec moins d'effets secondaires (Ordóñez-Mena et al., 2018). La Société Américaine des Maladies Infectieuses (IDSA) le recommande en première intention chez les patients de plus de 3 ans (Shane et al., 2017).

Chez les enfants, le métronidazole est administré à des doses de 15 mg/kg par voie orale divisées trois fois par jour pendant 5 à 7 jours et de 250 mg par voie orale trois fois par jour ou 500 mg par voie orale deux fois par jour pendant 5 à 7 jours chez les adultes. Le Tinidazole est administré par voie orale 40 à 50 mg/kg chez l'enfant et 2 g en 1 dose chez l'adulte. Un traitement alternatif inclus le Nitazoxanide (NTZ), un médicament antiparasitaire récent qui s'avère très efficace mais nécessitant une étude plus approfondie (Escobedo and Cimerman, 2007).

Deux autres médicaments alternatifs appartenant à différentes familles chimiques et ciblant des voies différentes sont recommandés pour traiter les femmes atteintes de giardiose pendant la grossesse, à savoir : la paromomycine (PRM), au cours du premier trimestre et la paromomycine ou le métronidazole au cours des deux derniers trimestres. Tant que les symptômes de la femme sont légers au cours du premier trimestre, il est recommandé de retarder le traitement (Escobedo and Cimerman, 2007).

En cas d'échec thérapeutique et de résistance au premier traitement, un deuxième traitement du même médicament, un traitement différent ou une co-thérapie avec des médicaments de deux classes peuvent être utilisés (Escobedo and Cimerman, 2007).

2.11. Prévention

Il a été suggéré qu'il est hautement improbable que la giardiose puisse être éliminée en tant qu'infection humaine en raison d'un certain nombre de facteurs clés qui existe. Etant donné la large distribution de *Giardia* parmi de nombreuses espèces de mammifères et

d'autres animaux, et la découverte que les isolats d'animaux et d'humains sont génétiquement identiques et qu'un isolat animal a été utilisé avec succès pour produire une infection humaine, se traduit par le fait qu'il existe un énorme réservoir, dont une grande partie est totalement incontrôlable (Farthing, 1996). En outre, le problème est encore aggravé par le fait que ce parasite peut survivre dans l'environnement dans des conditions fraîches et humides, ce qui lui permet de persister même en l'absence de réservoirs animaux. Donc, toutes les approches de prévention doivent se focaliser sur des mesures pour interrompre la transmission et le développement de vaccins (Farthing, 1996). Etant donné que la giardiose est maladie à transmission hydrique, donc, pour s'assurer que l'approvisionnement en eau est exempt de *Giardia* et que des méthodes sont disponibles pour surveiller la présence du parasite dans l'eau potable, des interventions de santé publique doivent s'imposer. Les kystes de *Giardia* sont généralement détectés dans l'eau potable en filtrant de grands volumes d'eau entrant dans l'approvisionnement en eau domestique et en examinant les filtres pour détecter la présence de ces kystes. Le développement de techniques basées sur la détection de l'ADN combinant des méthodologies d'amplification, devrait cependant réduire le volume d'eau à filtrer et rendre la technique suffisamment sensible pour que les kystes soient détectés sans avoir recours à la microscopie (Farthing, 1996). Le potentiel et le niveau de contamination sont souvent difficiles à prévoir ; par conséquent, les approches de prévention doivent inclure une variété de pratiques sanitaires de routine telles que le lavage des mains, surfaces et produits (Rose and Slifko, 1999).

La transmission de personne à personne pourrait donc être minimisée par l'éducation à l'hygiène personnelle, en particulier dans les situations à haut risque telles que les garderies, les institutions résidentielles et pendant les contacts sexuels. Par exemple, dans les garderies, la transmission se fait généralement entre les nourrissons et les très jeunes enfants qui n'apprécient pas facilement la pertinence de la voie fécale-orale pour la transmission des entéropathogènes (Farthing, 1996).

La question portant sur le fait de savoir si la vaccination peut prévenir contre la giardiose ou s'il est même approprié d'envisager de consacrer des ressources au développement d'un vaccin contre cette infection est sujette à de nombreuses controverses. Il a été suggéré lors d'une étude expérimentale chez des volontaires humains et des études épidémiologiques qu'une immunité protectrice est acquise après une exposition à *Giardia* (Farthing, 1996, 1990; Rendtorff, 1954). Bien que la giardiose soit rarement une maladie mortelle, cependant, elle devrait avoir une priorité pour le développement de vaccins qui seraient bénéfiques aussi bien pour l'homme que pour les animaux et qui permettraient

d'immuniser les réservoirs de *Giardia* constitués par l'homme et les animaux favorisant, par conséquent la diminution du nombre de kystes excrétés dans l'environnement, le risque de transmission fécale-orale ainsi que le niveau de contamination environnementale de l'eau et des aliments (Farthing, 1996; Olson et al., 2000).

PARTIE EXPERIMENTALE

***Article 1 :
Prevalence and Clinical
Manifestations of Giardia
intestinalis and Other Intestinal
Parasites in Children and Adults
in Algeria***

Partie expérimentale (Article 1)

1. Objectifs

- Élucidation de l'épidémiologie et la signification clinique des infections par *G.intestinalis* dans la région d'Alger, en identifiant la prévalence de l'infection à *Giardia* et en comparant les données sociodémographiques et cliniques des individus infectés avec celles des individus infectés par d'autres protistes parasites intestinaux.

2. Matériel et méthodes

2.1. Population d'étude et prélèvement d'échantillons

Une étude descriptive transversale communautaire a été réalisée entre septembre 2012 et octobre 2013 dans le Centre Hospitalo-Universitaire (C.H.U) Issad Hassani, Beni Messous dans la partie Ouest d'Alger, en Algérie. Des échantillons de selles consécutifs ont été prélevés, i) des patients ambulatoires qui allaient et venaient le même jour après avoir fourni un échantillon et ii) des personnes hospitalisées pour diverses conditions médicales. Pour les patients positifs aux parasites, les informations épidémiologiques ont été fournies soit à l'aide d'un questionnaire, soit à partir de dossiers médicaux. Aucune information épidémiologique n'était disponible pour les individus négatifs aux parasites.

Des échantillons fécaux frais ont été collectés de chaque patient dans un récipient pour prélèvement de selles étiqueté et stérile. Un consentement écrit, éclairé a été fourni pour les enfants impliqués dans l'étude, par les parents ou les tuteurs. Un seul échantillon de selles de chaque individu de l'étude a été examiné par microscopie pour la détection de parasites intestinaux. Tous les échantillons testés positifs pour *Giardia* ont été conservés à +4°C dans une solution de bichromate de potassium à 2.5% (p / v) pour une extraction ultérieure d'ADN suivie d'analyses moléculaires (ces données ne sont pas incluses dans le présent article). Les personnes âgées de 15 ans ou plus étaient considérées comme des adultes.

2.2. Questionnaires

Un questionnaire structuré a été soumis aux personnes positives aux parasites enrôlées dans l'étude dans le but de collecter des données relatives aux caractéristiques épidémiologiques telles que l'âge, le sexe et les symptômes éventuellement liés à des infections parasitaires intestinales telles que diarrhée, nausées, vomissements, douleurs

abdominales, prurit anal, pâleur, retard de croissance et fièvre. La diarrhée a été définie comme l'émission d'au moins trois selles non formées sur une période de 24 h (Mathan, 1998).

2.3. Traitement des échantillons

Les échantillons de selles ont été examinés à l'œil nu pour la couleur, la consistance et la présence d'helminthes, puis examinés par microscopie directe en utilisant la technique modifiée de Ritchie (Allen and Ridley, 1970). Une petite quantité de selles (de la taille d'un pois) a été mélangée avec 7 ml de solution de formol à 10% et tamisée à travers de la gaze double couche et recueillies dans un bécher. Ensuite, la suspension a été transférée dans un tube à centrifuger de 15 ml et complétée avec trois millilitres d'éther diéthylique. Ensuite, nous avons bouché le tube à centrifuger et mélangé la suspension en agitant avant de centrifuger pendant 3 min à 1500 tour/ min. Les trois couches supérieures (éther, débris et formaline) ont été enlevées, tandis que les sédiments ont été retenus. Des montages humides de chaque échantillon fécal concentré frais ont été préparés dans une solution saline et iodée et observés par microscopie optique pour les œufs de parasites, les kystes et les trophozoïtes en utilisant un grossissement x100 et x400. De plus, une lame colorée en permanence a été préparée pour chaque échantillon en utilisant une coloration de Ziehl–Neelsen modifiée pour la détection de *Cryptosporidium* spp. (Henriksen and Pohlenz, 1981) et oocystes d'autres protozoaires.

2.4. Analyses statistiques

Les données ont été saisies dans Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) et l'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA 6.0 (Tibco Software Inc. Palo Alto, USA) adapté à l'épidémiologie. Le test de χ^2 square a été utilisé pour tester les différences de prévalence parasitaire selon le groupe d'âge, le sexe, les symptômes (diarrhée, nausées, fièvre et troubles gastro-intestinaux). Les valeurs de probabilité (P) ont été calculées avec un risque alpha = 5% pour un intervalle de confiance (IC) de 95%. Une différence était considérée comme significative lorsque la valeur P était < 0.05 .

3. Résultats

Au total, 2054 personnes ont été testées. Un nombre de 567 échantillons (27.6%), provenant de 543 patients externes et 24 patients hospitalisés, ont été évalués comme positifs par microscopie pour les œufs et les parasites. Parmi ces patients, 297 étaient des hommes et

270 des femmes ; 239 étaient des enfants (moins de 15 ans) et 255 des adultes (Tableau 3). Pour 121 individus positifs pour le parasite, aucun âge exact n'a pu être établi, mais pour 16 d'entre eux, l'âge était de moins de 15 ans et pour 32, l'âge était de plus de 15 ans. Pour les 494 personnes avec des informations d'âge spécifique, la tranche d'âge était de 1 à 90 ans (âge médian, 15 ans ; intervalle interquartile [IQR] = 6 à 39).

Les parasites fréquemment observés comprenaient *Blastocystis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica* / *dispar*, *Giardia intestinalis* et *Entamoeba coli*, avec des prévalences globales observées de 15.8%, 11.3%, 5.4%, 4.7% et 3.8%, respectivement. *Entamoeba hartmanni*, *Cryptosporidium* spp., *Chilomastix mesnili* et *Iodamoeba bütschlii* ont tous été détectés dans de très rares cas, avec des prévalences globales observées de moins de 1% pour chacun (Tableau 3).

Sur les 97 cas de *Giardia*, près des deux tiers (62/97, 63.9%) des cas ont été retrouvés chez des enfants âgés de 1 à 10 ans. Chez les adultes positifs aux parasites, la proportion de *Giardia* était de 5.5% contre 27.5% chez les enfants positifs aux parasites ($P < 0.0001$; Tableau 3). Parmi les 239 enfants positifs aux parasites, les cas de *Giardia* semblaient diminuer avec l'âge : chez les tout-petits (1 à 3 ans), la proportion était de 40.7% ; ce taux est resté relativement élevé chez les enfants âgés de 4 à 6 ans et de 7 à 10 ans (33.8% et 29.5%, respectivement), pour diminuer seulement chez les enfants âgés de 11 à 15 ans (4.7%).

Le parasite le plus commun chez les adultes était *Blastocystis* (64.7%), suivi en fréquence par *E. nana* (48.6%) et les espèces d'*Entamoeba* (16.9–18.8%). Le genre *Blastocystis* était également plus fréquent chez les enfants positifs aux parasites (48.8%), principalement chez les enfants âgés de 11 à 15 ans, suivi d'*E. nana* (35.4%) et de *G. intestinalis* (27.5%). *Blastocystis* et *E. nana* étaient plus fréquents chez les adultes que chez les enfants ($P = 0.0006$ et $P = 0.0044$, respectivement ; Tableau 3). Pour les autres parasites mis en évidence, il n'y avait aucune association entre l'âge et la survenue. Aucun lien entre le sexe et le taux de parasitisme n'a pu être identifié pour aucune des espèces (Tableau 3).

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 3. Répartition des parasites intestinaux chez les individus positifs ($N = 567$) selon l'âge et le sexe.

	Tranche d'âge (année) ¹									Sex		
	[1 - 3 (n = 54)]	[4 - 6] (n = 65)	[7 - 10] (n = 61)	[11 - 15] (n = 43)	Individus <15 ans d'âge (n = 239)	Individuals ≥ 15 ans d'âge (n = 255)	Le nombre total d'individus sans âge exact ou approximatif est connu (n = 73)	Total/ Prévalence globale (%) (n = 567)	Niveau de signification statistique des différences de prévalence entre enfants et adultes ²	Prévalence chez les femmes (n = 270)	Prévalence chez les hommes (n = 297)	Niveau de signification statistique des différences de prévalence entre les sexes ²
<i>Giardia intestinalis</i>	22 (40.7%)	22 (33.8%)	18 (29.5%)	2 (4.7%)	66 (27.5%)	14 (5.5%)	17 (23.3%)	97(17.1%)	$P < 0.0001^*$	47 (17.4%)	50 (16.8%)	$P = 0.94$
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	1 (1.5%)	0	0	1 (0.4%)	0	0	1 (0.2%)	$P = 0.97$	0	1 (0.3%)	$P = 0.33$
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	12 (22.2%)	13 (20.0%)	12 (19.7%)	11 (25.6%)	50 (20.8%)	48 (18.8%)	13 (17.8%)	111 (19.6%)	$P = 0.63$	56 (20.7%)	55 (18.5%)	$P = 0.57$
<i>Entamoeba coli</i>	5 (9.2%)	7 (10.7%)	9 (14.8%)	3 (7.0%)	27 (11.3%)	43 (16.9%)	9 (12.3%)	79 (13.9%)	$P = 0.1$	35 (13.0%)	44 (14.8%)	$P = 0.60$
<i>Entamoeba hartmanni</i>	0	1 (1.5%)	0	1 (2.3%)	2 (0.8 %)	1 (0.4%)	0	3 (0.5%)	$P = 0.95$	1 (0.4%)	2 (0.7%)	$P = 0.61$
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	1 (1.9%)	0	0	1(2.3%)	1 (0.4%)	2 (0.8%)	1(1.4%)	4 (0.7%)	$P = 0.60$	1 (0.4%)	3 (1.0%)	$P = 0.68$
<i>Endolimax nana</i>	13 (24.0%)	25 (38.4%)	16 (26.2%)	27 (62.8%)	85 (35.4%)	124 (48.6%)	23 (31.5%)	233 (41.0%)	$P = 0.0044^*$	104 (38.5%)	129 (43.4%)	$P = 0.27$
<i>Chilomastix mesnili</i>	0	0	1 (1.6%)	1 (2.3%)	3 (1.3%)	2 (0.8 %)	1 (1.4%)	6 (1.0%)	$P = 0.94$	2 (0.7%)	4 (1.3%)	$P = 0.76$
<i>Blastocystis hominis</i>	24 (44.4%)	27 (41.5%)	32 (52.5%)	24 (55.8%)	117 (48.8%)	165 (64.7%)	43 (59.0%)	325 (57.3%)	$P = 0.0006^*$	158 (58.5%)	167 (56.2%)	$P = 0.64$

¹ **Aucune donnée sur le facteur âge chez 121**, parmi ceux-là, 32 étaient des adultes, donc inclus dans la tranche individus ≥ 15 ans et 16 étaient des enfants qui étaient inclus dans les individus <15 ans. * Les enfants ont été définis comme des personnes de moins de 15 ans.

² $P > 0.05$: Statistiquement non significatif. * $P < 0.05$: Statistiquement significatif.

PARTIE EXPERIMENTALE

Sur 65/97 (69.1%) des cas positifs à *Giardia*, *Giardia* était le seul parasite détecté (Tableau 4) ; dans les 32 autres cas, un ou plusieurs parasites ont également été détectés. Comme prévu, *Blastocystis* et *Endolimax* étaient les parasites le plus souvent associés à *Giardia* (12 et 8 cas, respectivement). Les co-infections étaient aussi fréquentes dans tous les groupes d'enfants que chez les adultes.

Tableau 4. Répartition des cas de co-infection impliquant *Giardia intestinalis* et d'autres espèces de protozoaires par tranche d'âge en cas de présence de diarrhée.

Infection par <i>Giardia intestinalis</i>	Tranche d'âge (ans)						Présence/Absence de diarrhée	
	[1-3]	[4-6]	[7-10]	[11-15]	>15	Age indéterminé	Présence de diarrhée	Absence de diarrhée
<i>Giardia intestinalis</i>	15	15	14	1	9	11	3	62
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	3	1	2	-	1	5	1	11
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Endolimax nana</i>	2	3	1	1	1	0	1	7
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Endolimax nana</i>	1	1	-	-	-	-	-	2
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	-	1	-	-	1	-	-	2
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba coli</i>	-	-	-	-	1	1	-	2
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Iodamoeba bütschlii</i>	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Entamoeba coli</i> + <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>Endolimax nana</i> + <i>Entamoeba histolytica/dispar</i> + <i>Iodamoeba bütschlii</i>	-	-	-	-	-	1	-	1
Total	22	22	18	2	14	19	5	92

Sur 567 individus positifs aux parasites, 103 (18.2%) étaient symptomatiques, alors que les 464 autres (81.8%) ne l'étaient pas. Les symptômes les plus fréquemment rapportés étaient les douleurs abdominales et la diarrhée, rapportés respectivement chez 56/567 (9.9%) et 35/567 (6.2%) des cas positifs (Tableau 5). Il est à préciser que sur les 62/65 (95.4%) cas de mono-infection à *Giardia*, aucun signe de diarrhée n'a été signalé. Par ailleurs, les cas de co-infection où *Giardia* était aussi présent, l'épisode diarrhéique n'a été signalé que dans 6.3% des cas (Tableau 4). Ainsi, seuls cinq échantillons (trois avec *Giardia* seul, deux avec *Giardia* + *Blastocystis* et *Giardia* + *E. nana*, respectivement) pourraient être liés à des épisodes diarrhéiques (Tableaux 4 et 5). En effet, en comparant les 35 rapports sur le signe diarrhée, 30 cas négatifs vis-à-vis de *Giardia*, étaient positifs pour : *Blastocystis* (48.6%; 17/35), *E. nana* et *E. histolytica* /*dispar* (31.4%; 11/35 et 28.6%; 10/35, respectivement), *C. mesnili* et *Cryptosporidium* spp. (2.9%; 1/35 de chacun).

Le nombre total de cas positifs à *Giardia* avec présence de symptômes était de 21. Lors de l'examen de tous les rapports sur les symptômes gastro-intestinaux, aucun n'était plus fréquent chez les individus testés positifs vis-à-vis de *Giardia* que chez les individus testés positifs pour les autres parasites (Tableau 5).

Tableau 5. Symptômes cliniques observés chez les patients positifs vis-à-vis de *Giardia* et pour les autres parasites respectivement, pour lesquels des informations cliniques étaient disponibles.

Signes cliniques	Total no. des patients	Positif pour <i>Giardia</i> n = 97		Positif pour des parasites autres que <i>Giardia</i> n = 470		X ²	Valeur P
Douleur abdominale	56	13	(13.4%)	43	(9.1%)	1.19	0.28
Diarrhée	35	5	(5.2%)	30	(6.4%)	0.05	0.82
Constipation	17	2	(2.1%)	15	(3.2%)	0.07	0.79
Anorexie	4	2	(2.1%)	2	(0.4%)	1.18	0.28
Vomissement, Nausée	11	3	(3.1%)	8	(1.7%)	0.25	0.62
Fièvre	18	5	(5.2%)	13	(2.8%)	0.82	0.37
Prurit Anal	22	5	(5.2%)	17	(3.6%)	0.18	0.67
Pâleur	5	2	(2.1%)	3	(0.6%)	0.59	0.44
Retard de croissance	8	3	(3.1%)	5	(1.1%)	1.14	0.28

$P > 0.05$: Statistiquement non-significatif

4. Discussion

La prévalence globale du parasitisme intestinal dans la présente étude (27.6%) est en accord avec les données précédemment rapportées en Afrique du Nord (Ayadi et al., 1991; Bachta et al., 1990; Faye et al., 1998). En effet, le taux de parasitisme intestinal est situé entre 26.6% et 30.6%. D'autres études dans le même contexte ont obtenu des prévalences plus faibles, allant de 6.7% à 19.7% (Benouis et al., 2013; El Guamri et al., 2009; Mergani et al., 2014; Nicolas et al., 2006), alors qu'une seule étude publiée a indiqué un taux de parasitisme plus élevé comparé au nôtre (42.6% à 44.6%) (Shehata and Hassanein, 2015). Dans notre étude, la prévalence de *Giardia* était significativement plus élevée chez les enfants que chez les adultes. À l'inverse, la prévalence vis-à-vis des autres parasites, en particulier *Blastocystis* et *Endolimax*, était plus élevée plutôt chez les adultes que chez les enfants. Certaines études ont montré un schéma similaire, où l'âge semblait influencer le taux d'infection par *Giardia*, les enfants étant significativement plus infectés que les adultes (Adou-bryn et al., 2001; El Fatni et al., 2014; Mostafi et al., 2011; Saaed and Ongerth, 2019; Von Huth et al., 2019). Récemment, deux études réalisées en Libye, la première a porté sur 305 individus, d'âge indéterminé souffrant de diarrhée, avec une prévalence vis-à-vis de *Giardia* de 1.3% (Mergani et al., 2014), la seconde étude incluait 505 enfants âgés entre 2 et 17 ans, souffrant aussi de diarrhée et présentant une prévalence de 26.3% (Saaed and Ongerth, 2019).

Des études antérieures ont déjà montré que la présence de certains parasites semble plus fréquente chez les sujets adultes que chez les enfants. Dans la présente étude, *Endolimax nana* et *Blastocystis* ont été plus souvent retrouvés chez les adultes que chez les enfants. Au Nigeria, une étude récente a également révélé une prévalence croissante de *Blastocystis* selon l'âge (Poulsen et al., 2016). Des tendances similaires ont été observées par d'autres équipes de recherche pour *Blastocystis* et pour d'autres espèces appartenant à *Archamoeba* (El Safadi et al., 2014; Poulsen and Stensvold, 2016; Salehi et al., 2017; Scanlan et al., 2018, 2014). Il pourrait y avoir une tendance générale des flagellés tels que *Giardia* et *Dientamoeba* à être plus fréquents chez les enfants que chez les adultes, tandis que les *Blastocystis* et les genres appartenant aux *Archamoebae* deviennent plus fréquents avec l'âge (Benouis et al., 2013; Jokelainen et al., 2017; Pandey et al., 2015; Shaker et al., 2019). Étant donné que tous ces parasites sont communs et transmis par voie fécale-orale et que les adultes et les enfants peuvent ne pas être exposés de manière différentielle, les différences d'infection peuvent refléter des différences dans les facteurs liés à l'immunité et au microbiote intestinal.

Dans notre étude, la microscopie directe des concentrés fécaux a été utilisée pour la détection et la différenciation des protistes intestinaux, tandis que quelques études antérieures (Elswaifi et al., 2016; Hamaidi-Chergui et al., 2013; Saaed and Ongerth, 2019; Shehata and Hassanein, 2015) ont utilisé une combinaison ou différents tests d'examen et de diagnostic, notamment, la microscopie des concentrés fécaux, les dosages immunologiques, un test d'immunofluorescence comprenant le DAPI (4', 6-diamidine-2-phénylindole-dichlorhydrate), la coloration au trichrome et la coloration acido-résistante, qui peuvent tous différer en termes de sensibilité avec une conséquence sur la prévalence de *Giardia* rapportée. Ceci peut être illustré par une étude menée récemment en Égypte (Elswaifi et al., 2016) qui montre une prévalence de *Giardia* de 38% sur la base des résultats des tests immunologiques, contre 18% sur la base des résultats de la microscopie des concentrés fécaux.

L'étendue de la co-infection *Giardia* et autres protistes parasites intestinaux a été étudiée dans la présente étude. L'association de *Giardia* et *Blastocystis* a été retrouvée dans 12 cas (2.1%), ce qui est cohérent avec l'étude réalisée à l'Ouest de l'Algérie plus précisément à Oran (Benouis et al., 2013). Dans une autre étude récente menée dans la zone urbaine de Bissau, en Guinée-Bissau, auprès de 1274 enfants (cohorte I, n = 566 ; cohorte II, n = 708), âgés entre 2 et 15 ans, l'étude a montré la présence de *Giardia* et *Entamoeba histolytica* / *dispar* chez 10 cas (1.8%) et 20 cas (2.8%), respectivement, *Giardia* et *Endolimax nana* dans 7 cas (1.2%) et 9 cas (1.3%), respectivement. Ces résultats corroborent ceux retrouvés dans notre étude (1.4%) (Von Huth et al., 2019).

Dans une étude menée en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud (Kotloff et al., 2013), *Giardia* n'était pas significativement associé à une diarrhée modérée à sévère; une observation similaire a été faite dans un autre rapport sur la giardiose pédiatrique endémique concluant à une association apparemment paradoxale avec une protection contre la diarrhée aiguë causée par d'autres entéro-pathogènes spécifiques, mais avec un risque accru de diarrhée persistante chez les porteurs de *Giardia* (Muhsen and Levine, 2012). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus dans notre étude. En plus de la diarrhée, *Giardia* a été associé à d'autres symptômes gastro-intestinaux, tels que la distension abdominale, les vomissements, de la fièvre et de la perte de poids, principalement chez les enfants (Breurec et al., 2016). Malheureusement, pour toutes les personnes symptomatiques, aucune information n'était disponible sur le fait que si les infections étaient légères, modérées ou lourdes. Ces informations auraient été pertinentes pour éventuellement établir des liens sur l'intensité relative de l'infection telle qu'évaluée, par exemple, par PCR en temps réel où les valeurs de

seuil de cycle pour les patients positifs au *Giardia* pourraient être rassemblées et analysées dans le contexte des symptômes.

Notre étude présente quelques limites, en effet, d'une part, elle a été réalisée sur une courte période de 12 mois, par conséquent, le nombre de cas identifiés était faible. D'autre part, elle était en milieu hospitalier et aucune population témoin en bonne santé n'a été examinée pour obtenir des données sur la prévalence de *Giardia* et d'autres parasites dans la région. Aussi, il est nécessaire de signaler l'absence de données épidémiologiques chez les patients négatifs aux parasites. Nous n'avons pas donc été en mesure de déterminer si la colonisation par des parasites pouvait protéger les symptômes intestinaux. En plus de ces limites, par manque de temps, il n'a pas été possible d'enquêter sur plus d'un échantillon de selles par participant. En effet, il semblerait que la sensibilité du diagnostic par la microscopie augmenterait avec un nombre accru d'échantillons examinés par personne (Von Huth et al., 2019). Il est probable que nos résultats sous-estiment la prévalence, toutefois, la même limite a été relevée dans une étude précédente publiée en Algérie (Benouis et al., 2013), ce qui rend le contexte de notre prévalence comparable.

Article 2 :

Molecular Characterization of Giardia duodenalis in Children and Adults Sampled in Algeria

Partie expérimentale (Article 2)

1. Objectifs

- Caractérisation de *G. intestinalis* chez des enfants et adultes dans deux zones géographiques distinctes en Algérie, en utilisant la PCR en temps réel, une PCR spécifique à l'assemblage, le génotypage basé sur le séquençage du gène *tpi* et l'analyse de l'ASH dans les assemblages de *Giardia*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Collecte d'échantillons de selles

Une étude a été menée de 2013 à 2018 dans deux hôpitaux de la Wilaya d'Alger (Centre Hospitalo-Universitaire Issad Hassani, Beni Messous et Centre Hospitalo-Universitaire Nafissa Hamoud [ex Parnet], Hussein Dey) et deux hôpitaux de la région de Biskra (Hôpital de Tolga et Hôpital Docteur Saadane).

Un total de 119 échantillons fécaux a été inclut dans cette étude, tous prélevés sur des individus soupçonnés de parasitose et / ou souffrant de symptômes gastro-intestinaux (diarrhée, vomissements et/ou crampes abdominales), évalués comme parasite-positifs par microscopie pour les œufs et les parasites.

Parmi les individus participant à l'étude, quarante-huit (n=48) étaient des femmes, (n=66) hommes et (n=5) individus de sexe indéterminé. Parmi les patients, (n=55) avaient moins de 15 ans et (n=37) étaient plus âgés (tranche d'âge, 2 à 74 ans [médiane, 8 ans ; intervalle interquartile (IQR) = 4.25 à 24]) ; l'âge de (n=27) patients était indéterminé. Les patients de moins de 15 ans ont été considérés comme enfants, selon la littérature (Júlio et al., 2012; Pipiková et al., 2018; Rudohradská et al., 2012).

Tous les échantillons ont été criblés par le test PCR en temps réel pour *Giardia*. Certains des échantillons (n = 22) utilisés dans la présente étude ont également été utilisés dans notre étude récente décrivant la prévalence de *Giardia* et de divers parasites chez les enfants et les adultes algériens (Belkessa et al., 2021).

2.2. Extraction et purification de l'ADN génomique

Les échantillons de selles ont été stockés dans du bichromate de potassium (2.5%) ou de l'éthanol (70%) lors du prélèvement (à noter, pour assurer une meilleure conservation, environ un tiers des échantillons de selles ont été complétés par les deux tiers d'agent de conservation dans des tubes secs). Pour éliminer l'agent de conservation, les échantillons ont été lavés dans du PBS une fois, avant l'extraction d'ADN. L'ADN total a été extrait d'échantillons de selles à l'aide du système NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) en suivant les instructions du fabricant avec quelques modifications (Andersen et al., 2013; Budding et al., 2010). Brièvement, environ 200 mg de chaque échantillon ont été placés dans un microtube de 2 ml, mélangés avec 400 µL de tampon de lyse et vortexés à l'aide de Mylab (Vortex-Mixer SLV-6, Seoulin Bioscience Co., Ltd., Seoul, Corée) pendant 2 min pour assurer une fragmentation et homogénéisation. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 5 min à 16,000 tr / min. A partir de chaque échantillon, 100 µl de surnageant ont été lysés dans l'appareil NucliSENS® easyMAG®. Par la suite, 60 µL de silice magnétique ont été ajoutés à chaque échantillon et mélangés soigneusement. Les échantillons d'ADN extraits ont ensuite été conservés à - 20 ° C jusqu'à utilisation.

2.3. PCR en temps réel

Tous les échantillons ($n = 119$) ont été criblés pour *Giardia* par le test PCR en temps réel, en interne au Statens Serum Institut qui amplifie une région de 62 pb du gène de l'ARN ribosomique à petite sous-unité (ARNr SSU) de *Giardia*, à l'aide d'amorces et sondes publiées antérieurement (Verweij et al., 2004) (Tableau 6).

Le mélange réactionnel de la PCR en temps réel de 25 µL consistait en 1x IMMOLASE™ ADN polymérase ImmoMix™, 2x ImmoMix™ rouge (Bioline), 1,25 µL (1 µM) des amorces Giardia-80F et Giardia-127R, 0,125 µL (0,075 µM) des sondes (Giardia 105T) et 5 µL d'éluat d'ADN. La PCR en temps réel a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur de PCR en temps réel rapide Applied Biosystems 7500 (Thermo Fisher Scientific) avec les conditions de cyclage suivantes : dénaturation initiale à 95 ° C pendant 10 min, suivie de 50 cycles à 95 ° C pendant 15 sec et 60 ° C pendant 60 sec. Les produits de PCR ont été analysés en utilisant le logiciel de détection de séquence v.2.3 (Thermo Fisher Scientific). Un échantillon était considéré comme positif si une courbe exponentielle était observée, avec une valeur $C_t \leq 42$. Des contrôles négatifs (eau) et positifs (ADN pour *G. intestinalis*) ont été inclus dans chaque essai ainsi que des contrôles d'inhibition.

Tableau 6. Liste des oligonucléotides utilisés pour la PCR en temps réel, la PCR spécifique à l'assemblage et le génotypage basé sur le gène *tpi* avec des indications de la taille des amplicons.

Essai	Oligonucléotides (amorce/sonde)	Assemblage	Séquences d'amorces et de sondes (5´- 3´)	Taille du produit PCR (pb)	Références
PCR en temps réel	Giardia-80F	NA	For GACGGCTCAGGACAACGGTT	62	(Verweij et al., 2004)
	Giardia-127R		Rev TTGCCAGCGGTGTCCG		
Assemblage-specific PCR	Sonde Giardia-105T	NA	FAM-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ-1	165	(Vanni et al., 2012)
	4E1-HP	A	For AAAGAGATAGTTCGCGATGTC		
		B	Rev ATTAACAAACAGGGAGACGTATG		
			For GAAGTCATCTCTGGGGCAAG	272	
Analyse du gene <i>tpi</i>	Giardia AL3543	Tout les assemblages	Rev GAAGTCTAGATAAACGTGTCGG	605	(Sulaiman et al., 2003)
	Giardia AL3546		For AAATIATGCCTGCTCGTCG		
	Giardia AL3544		Rev CAAACCTTITCCGCAAACC	530	
	Giardia AL3545		For CCCTTCATCGGIGGTAACCTT		
			Rev GTGGCCACCACICCCGTGCC		

NA, n'est pas applicable, For, Forward ; Rev, Reverse

2.4. Typage moléculaire

Une PCR spécifique à l'assemblage (méthode 4E1-HP (Vanni et al., 2012)) a été réalisée sur un thermocycleur LifeECO à 96 puits (technologie Bioer) en utilisant Platinum® Taq DNA Polymerase Master Mix (Invitrogen). La concentration finale de chaque amorce utilisée dans les réactions de PCR était de 0.4 pM, les séquences de chaque paire d'amorces sont présentées dans le tableau 6.

Toutes les réactions ont suivi la même programmation du thermocycleur: une étape d'activation-dénaturation à 94 °C pendant 5 min suivie de 40 cycles, chacun consistant en 94 °C pendant 30 sec, une étape de recuit de 30 sec à 56 °C et une étape d'extension de 72 °C pendant 30 sec. Une étape d'extension finale a été réalisée à 72 °C pendant 7 min. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse verticale (90 V, 60 min) sur TBE 1x gels d'agarose à 1.5% colorés avec EZ-Vision® DNA dye (Amresco Inc., Solon, OH, USA) et photographiés avec le système d'imagerie BioDoc-it™ (transilluminateur 2UV). Un marqueur de poids moléculaire de 1 Kb d'ADN GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) a été utilisé.

Les assemblages ont été identifiés en fonction de la taille des produits de PCR par rapport aux ADN témoins positifs (Assemblage A et Assemblage B) fournis par le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les parasites, Rome, Italie. Le résultat a été considéré comme positif pour *G. intestinalis* Assemblage A ou Assemblage B si la taille de la bande était respectivement de 165 pb ou 272 pb (Vanni et al., 2012). Un échantillon a été considéré comme positif pour les deux assemblages A et B (infection mixte) si les deux bandes étaient présentes. Si d'autres bandes étaient visibles, ce résultat était également rapportée (Tableau 7).

Les échantillons positifs à *Giardia* avec une valeur Ct <32 ont été génotypés au niveau de l'assemblage en utilisant un test PCR niché pour l'amplification d'un fragment de 530 pb du gène *tpi* (Sulaiman et al., 2003); ce seuil de valeur Ct a été choisi selon la littérature qui rapporte que les échantillons avec des valeurs Ct plus élevées étaient peu susceptibles de produire des séquences *tpi* de qualité suffisante.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans des volumes totaux de 25 µL, constitués de 12,5 µL de ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich Co. LLC, CA, USA) (PCR Buffer, MgCl₂, dNTP, DNA Polymerase Taq polymerase), 1 µL (0.4 µM) de chacune des amorces externes AL3543 et AL3546, 8,5 µL d'eau distillée UltraPure™ DNase / RNase-Free Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) et 2 µL d'ADN pour

l'amplification primaire. La PCR a été réalisée avec un démarrage à chaud initial de 94 ° C pendant 5 min, 35 cycles de 94 ° C pendant 45 sec, 50 ° C pendant 45 sec et 72 ° C pendant 60 sec, suivi d'une extension finale de 72 ° C pendant 10 min à l'aide d'un thermocycleur LifeECO à 96 puits. Les mêmes conditions ont été appliquées à la deuxième réaction de PCR où 2 µL de produit de PCR de la réaction primaire et 1 µL (0.4 µM) des amorces internes AL3544 et AL3545 ont été utilisés pour la réaction (17). Les échantillons positifs à la PCR ont été purifiés avec le kit de purification QIAquick® PCR (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant et séquencés dans les deux sens par Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne).

2.5. Analyse de séquence

Les séquences d'ADN spécifiques au gène *tpi* ont été éditées et découpées à l'aide du logiciel Staden Package 2.0.0b11-2016 et alignées à l'aide d'outils en ligne (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>). L'analyse de l'ASH dans les séquences *tpi* impliquait l'identification de «doubles pics» ; c'est-à-dire des nucléotides chevauchants. Les séquences *tpi* ont été traduites en séquences d'acides aminés (aa) à l'aide d'un outil de traduction en ligne (<http://web.expasy.org/translate>) et alignées pour identifier les différences dans les séquences d'aa reflétant les doubles pics. Les séquences de référence pour comparaison ont été extraites de GenBank et choisies sur la base d'études antérieures (Akinkuotu et al., 2019a, 2019b; Ankarklev et al., 2012; Pipiková et al., 2018) et récupérées de GenBank (numéros d'accès: AF069556, AF069557, MF169203, DQ650648, MK509037, MH644770, JX266842, AY228628, AF069560, AY228641, DQ246216, KF891311 et AF069558). Les séquences d'ADN reflétant le gène *tpi* obtenues dans cette étude ont été soumises à GenBank sous les numéros d'accès : MW251133-MW251180.

Pour afficher la ségrégation des séquences d'ADN en assemblages, un arbre phylogénétique a été construit dans le logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X version 10) (Kumar et al., 2018) en utilisant la méthode de Minimum – Evolution. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide du modèle Tamura-Nei et le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les taxons associés regroupés ont été estimés à l'aide du test bootstrap (1,000 répliques) (Felsenstein, 1985).

2.6. Analyses statistiques

Les valeurs de seuil (Ct) du cycle de PCR en temps réel ont été évaluées à l'aide du logiciel StepOne, version 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les différences

de prévalence de *Giardia* entre les groupes ont été testées en calculant et en comparant les intervalles de confiance (IC) de Wilson pour les proportions, complétés par le test du Chi-carré N-1 (https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php, date d'accès : 10/07/2020).

Les différences entre les valeurs Ct pour les échantillons positifs et négatifs pour la microscopie, ainsi que pour l'utilisation de stockage d'échantillons à base d'éthanol (70%) et de bichromate de potassium (2.5%) ont été évaluées à l'aide du t-test non apparié implémenté dans Microsoft Excel 2016. Les différences dans la sensibilité et la spécificité entre la microscopie et la PCR en temps réel ont été analysées à l'aide du test Fisher's Exact (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>). Les valeurs de probabilité (P) < 0.05 ont été considérées comme indiquant une signification statistique.

La sensibilité et la spécificité de la microscopie et de la PCR en temps réel ont été calculées à l'aide d'un calculateur d'évaluation de test de diagnostic en ligne (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). L'accord inter-tests entre la microscopie et la PCR en temps réel a été quantifié à l'aide de l'indice Kappa de Cohen (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>).

3. Résultats

3.1. Confirmation des résultats de la microscopie par PCR en temps réel spécifique à *Giardia* spp.

Pour cette étude, nous avons utilisé des ADN d'échantillons de selles positifs aux parasites prélevés dans des hôpitaux en Algérie auprès de 119 patients suspectés de parasitose et / ou souffrant de symptômes gastro-intestinaux. Sur les 119 échantillons, 80 (67%) étaient positifs à *Giardia* par PCR en temps réel (médiane de la valeur Ct, 26.56 ; intervalle interquartile [IQR], 23.11 à 32.22), parmi ces échantillons positifs, 66 avaient été évalués positifs pour *Giardia* par microscopie (médiane de la valeur Ct pour les échantillons positifs à la microscopie, 26.04 ; IQR, 22.78–31.86). Quatorze échantillons (n=14) positifs par PCR en temps réel se sont révélés négatifs pour *Giardia* par microscopie (médiane de la valeur Ct, 28.59 ; IQR, 24.92–34.95) (Figure 11). Les 39 échantillons restants (33%) étaient négatifs à la PCR en temps réel pour *Giardia* ; parmi ceux-ci, sept avaient été évalués positifs pour *Giardia* par microscopie et 32 étaient négatifs à la fois par PCR en temps réel et par microscopie.

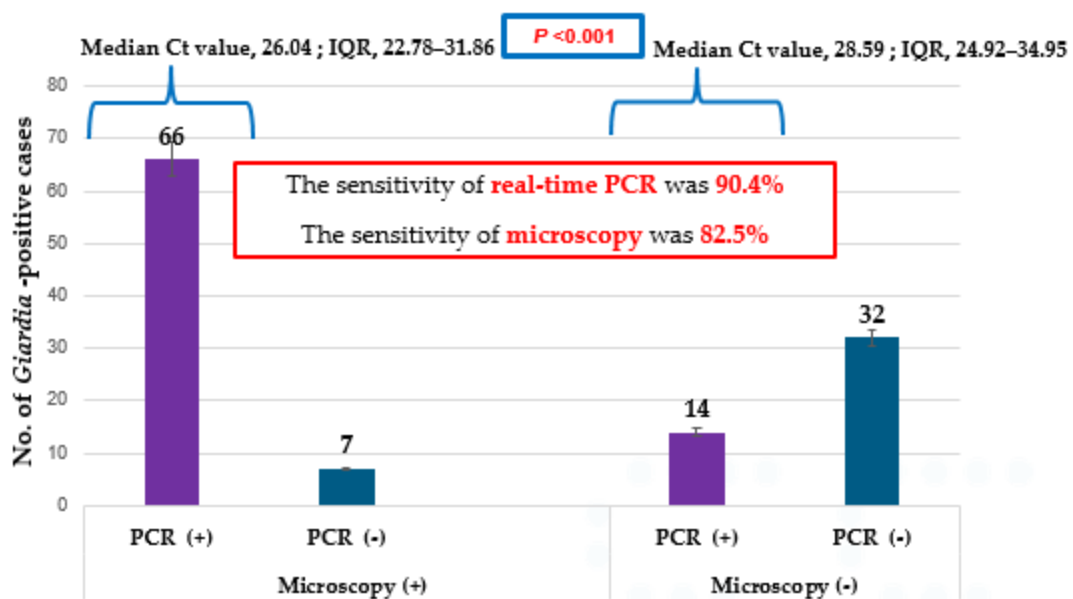


Figure 11. Comparaison de la sensibilité entre la PCR en temps réel et la microscopie

Les valeurs Ct des échantillons positifs à la fois par PCR en temps réel et par microscopie avaient tendance à être inférieures aux valeurs Ct des échantillons positifs par PCR en temps réel mais négatifs par microscopie (Figure 12A).

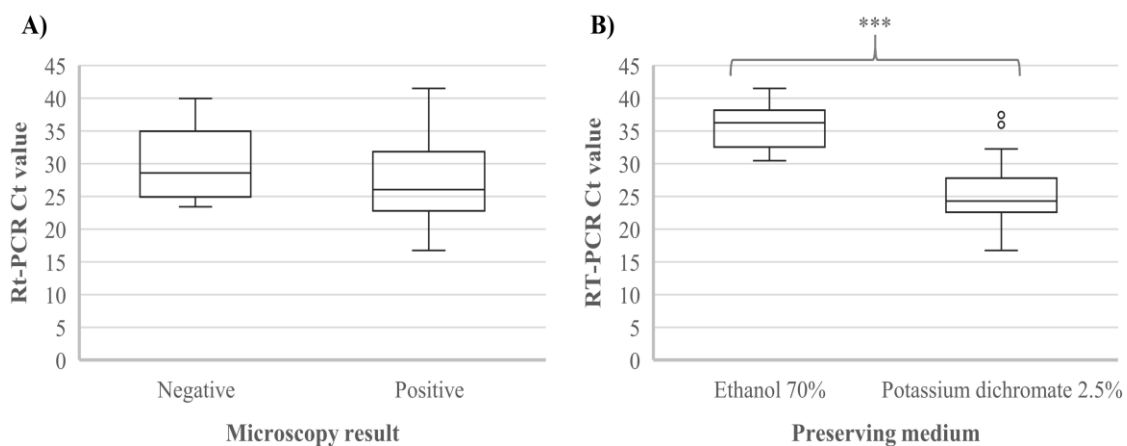


Figure 12. Valeurs de seuil du cycle de PCR en temps réel selon **A)** résultats de microscopie (négatifs vs positifs pour *Giardia intestinalis*) **B)** milieu de conservation (éthanol 70% vs bichromate de potassium 2.5%). *** indique $P < 0.001$.

Tel qu'évalué par PCR en temps réel, les enfants étaient plus fréquemment infectés par *Giardia* ($P < 0.001$), avec 45/55 (82%) enfants positifs comparés à 11/37 (30%) adultes positifs (Figure 13). Ces résultats sont concordants avec ceux trouvés dans notre étude

précédente (Belkessa et al., 2021). Les valeurs Ct des échantillons qui avaient été stockés dans du bichromate de potassium (2.5%) étaient significativement inférieures aux valeurs Ct des échantillons qui avaient été stockés dans de l'éthanol (70%) ($P < 0.001$) (Figure 12B).

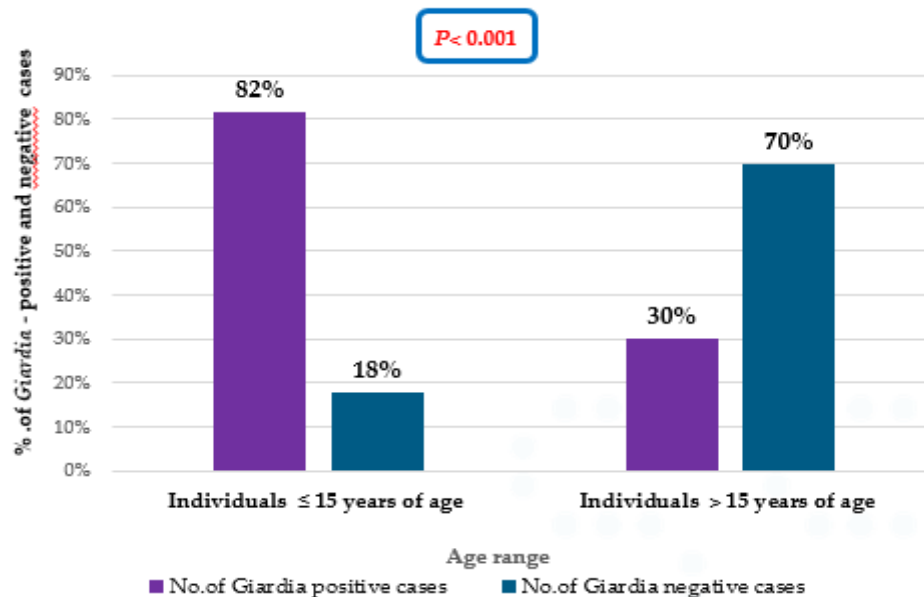


Figure 13. Proportion des cas positifs de *Giardia* parmi les individus positifs aux parasites selon les tranches d'âge (enfants vs adultes).

Comme la plupart des individus étaient des enfants, nous avons effectué la même analyse en excluant les adultes et les individus d'âge inconnu pour éliminer tout effet potentiel de l'âge. Des résultats similaires ont été obtenus ($P < 0.001$) (données non présentées).

La sensibilité de la PCR en temps réel et de la microscopie en utilisant l'une ou l'autre comme référence était de 90.4% et 82.5%, tandis que la spécificité était de 69.6% et 82%, respectivement. La concordance diagnostique entre la PCR en temps réel et la microscopie était substantielle (valeur Kappa de Cohen = 0.61).

3.2. Analyse spécifique à l'assemblage

En utilisant le test PCR spécifique à l'assemblage, nous avons constaté que sur les 80 échantillons positifs pour *Giardia* par PCR en temps réel, des produits de PCR visibles par électrophorèse sur gel ont été obtenus pour 25 (31%), parmi ces derniers, 4 (5%) indiquaient l'assemblage A et 21 (26%) ont indiqué l'assemblage B. Les 55 autres (69%) échantillons positifs à *Giardia* n'ont pas fourni de résultats clairs ; parmi ceux-ci, 8 (10%) échantillons ont produit des bandes supplémentaires/multiples, y compris la bande spécifique de *Giardia*

Assemblage B ; les 47 autres échantillons (59%) ne montraient aucun produit de PCR visible par analyse sur gel (Figure 14).

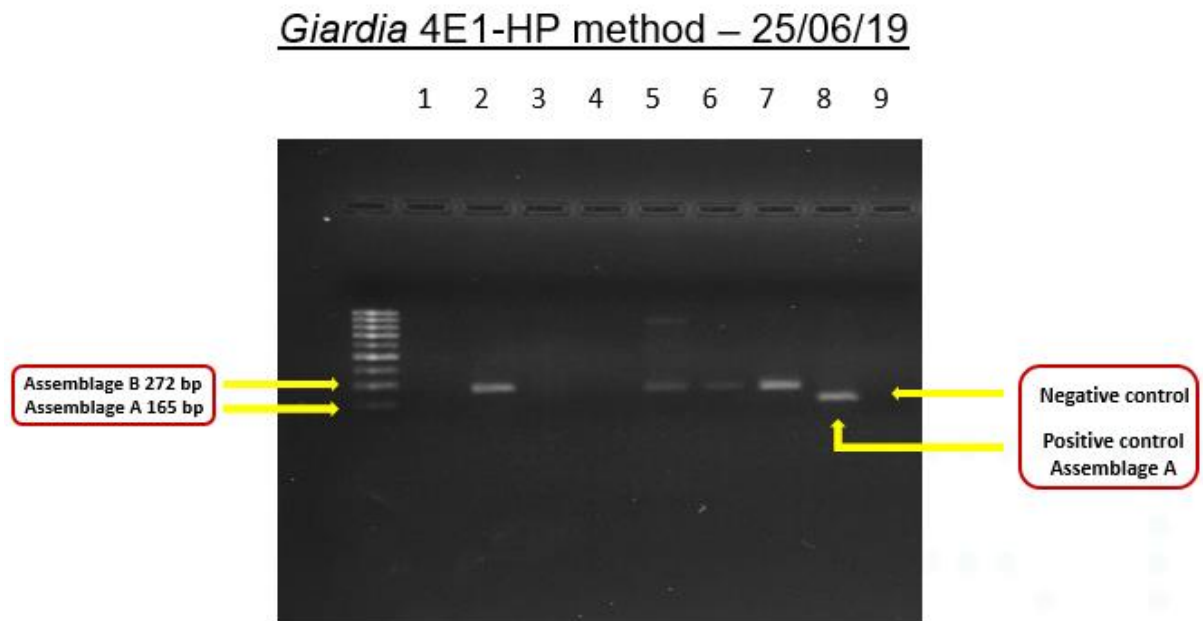


Figure 14. Amplification par PCR de *Giardia intestinalis* en utilisant la méthode 4E1-HP sur des gels d'agarose à 1.5% colorés avec le colorant ADN EZ-Vision®

La médiane de la valeur Ct pour les échantillons positifs à la PCR spécifique à l'assemblage était de 23.91 (IQR, 22.75–26), tandis que la médiane de la valeur Ct pour les échantillons négatifs à la PCR spécifique à l'assemblage était de 30.98 (IQR, 24.24–36.68) ($P < 0.001$).

Afin de valider les résultats obtenus avec le test PCR spécifique à l'assemblage et d'obtenir des informations de séquence sur les échantillons sans produits de PCR visibles par analyse sur gel, nous avons effectué un génotypage *tpi*. Pour les 48 échantillons (61%) qui étaient positifs par PCR en temps réel vis-à-vis de *Giardia* et avaient des valeurs Ct inférieures à 32 (médiane de la valeur Ct, 24.07 ; IQR, 22.61– 26.63), le gène *tpi* a été amplifié avec succès par PCR nichée et séquencé (Figure 15) (à noter, trois échantillons analysés avec le test spécifique à l'assemblage n'ont pas été soumis au génotypage *tpi* en raison du manque de disponibilité d'ADN).

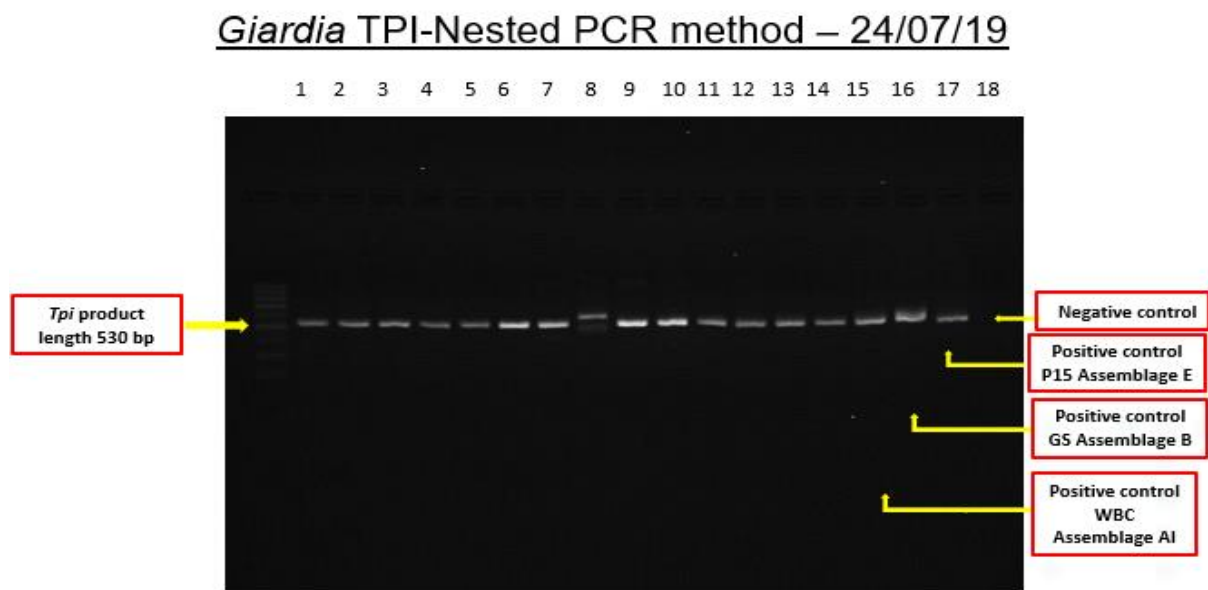


Figure 15. Amplification par PCR de *Giardia intestinalis* à l'aide du gène *tpi* sur des gels d'agarose à 1.5% colorés avec le colorant ADN EZ-Vision®

Sur les 48 séquences *tpi*, l'analyse phylogénétique a abouti à 22 (46%) séquences d'Assemblage A appartenant à des échantillons de 10 enfants, 6 adultes et 6 individus d'âge inconnu. Les 26 séquences restantes (54%) ont été attribuées à l'Assemblage B et correspondaient à des échantillons de 15 enfants, un adulte et 10 d'âge inconnu (Tableau 7).

Tableau 7. Résumé des assemblages de *Giardia* détectés par l'analyse du gène *tpi* selon les caractéristiques démographiques de base de la population étudiée.

Population étudiée (N = 119)	<i>Giardia</i>-positif (PCR en temps réel)	Assemblage A échantillons typés/ positif *	Assemblage B échantillons typés/ positif *
Enfants (N = 55)	45/55 (82%)	10/25 (40%)	15/25 (60%)
Garçons (n = 30)	24/30 (80%)	5/14 (36%)	9/14 (64%)
Filles (n = 25)	21/25 (84%)	5/11 (45%)	6/11 (55%)
Adultes (N = 37)	11/37 (30%)	6/7 (86%)	1/7 (14%)
Masculin (n = 23)	5/23 (22%)	3/3 (100%)	0/3 (00%)
Féminin (n = 14)	6/14 (43%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)
Age indéterminé (N = 27)	24/27 (89%)	6/16 (37%)	10/16 (63%)
Masculin (n = 13)	12/13 (92%)	4/8 (50%)	4/8 (50%)
Féminin (n = 9)	9/9 (100%)	1/6 (17%)	5/6 (83%)
Inconnu (n = 5)	3/5 (60%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
TOTAL	80/119 (67%)	22/48 (46%)	26/48 (54%)

* Les résultats des échantillons positifs référés aux assemblages A et B étaient basés sur l'analyse du gène *tpi*.

L'analyse phylogénétique des gènes *tpi* a montré que les échantillons des assemblages A et B formaient deux groupes très distincts (Figure 16). Les échantillons appartenant à l'Assemblage B n'ont pas pu être affectés au niveau du sous-assemblage par alignement ou analyse phylogénétique, par conséquent, ils sont appelés Assemblage B uniquement. Tandis que, les échantillons appartenant à l'Assemblage A étaient tous identiques à 100% à la séquence de référence du sous-type A2 disponible dans GenBank (Figure 16).

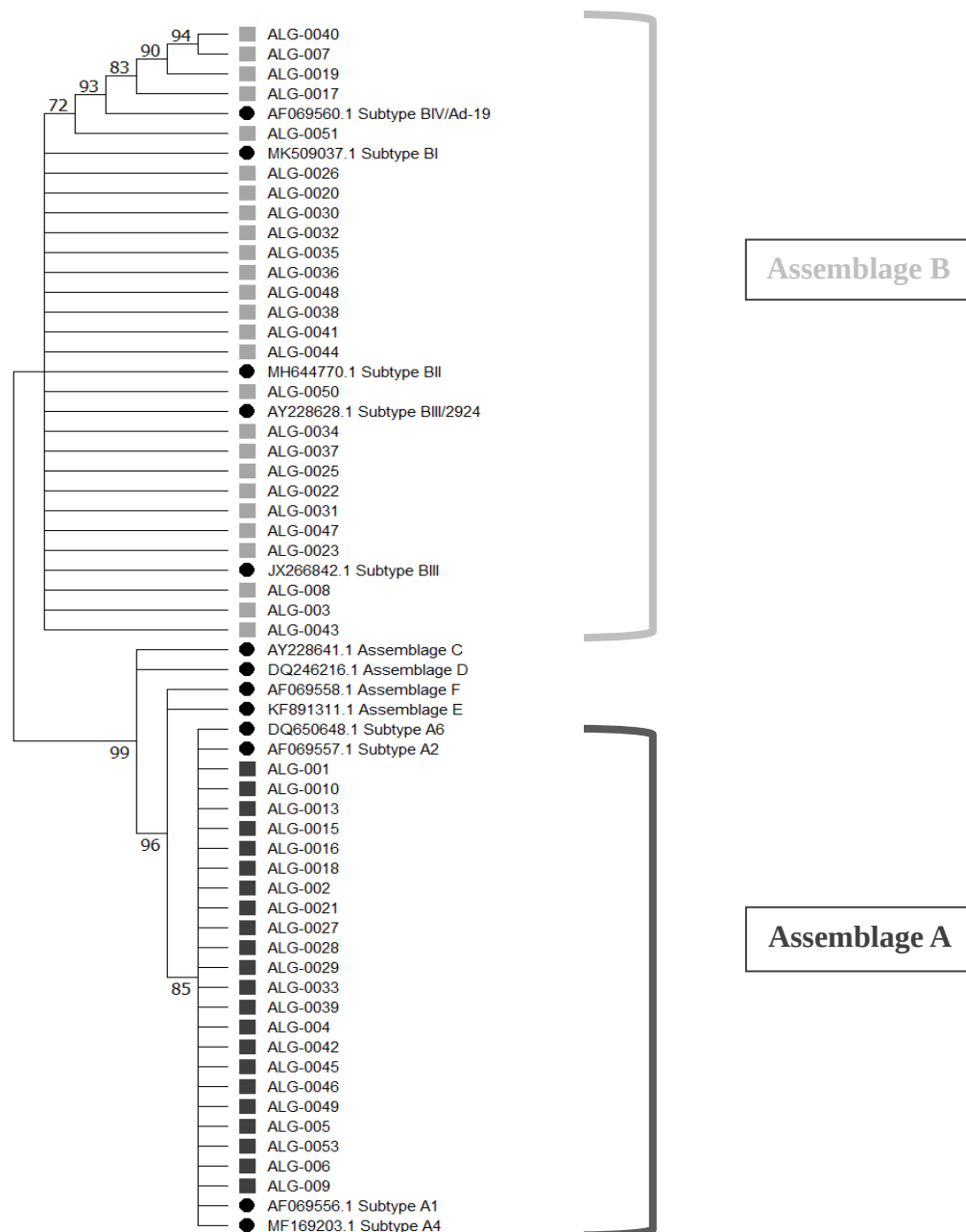


Figure 16. Analyse phylogénétique condensé de *G. intestinalis* basée sur les séquences du gène *tpi*. L'arbre a été construit en utilisant la méthode de Minimum-Evolution basée sur la distance génétique calculée par le modèle Tamura-Nei. Les valeurs de bootstrap supérieures à 70% à partir de 1000 répliques sont affichées sur les nœuds. Les séquences de référence des principaux assemblages et sous-types de *G. intestinalis* sont marquées par des cercles noirs pleins. Les échantillons d'étude sont marqués respectivement par des carrés gris foncé (Assemblage A) ou gris clair (Assemblage B).

Sur les 22 échantillons identifiés comme assemblage A par le marqueur *tpi*, quatre ont été marqués positifs pour l'Assemblage A par PCR spécifique à l'assemblage, quatre ont été marqués positifs pour l'Assemblage B en présence d'autres bandes et 14 ont échoués à produire un produit de PCR.

Sur les 26 échantillons positifs au *tpi* pour l'Assemblage B, 21 étaient positifs pour l'Assemblage B par PCR spécifique à l'assemblage (trois de ces échantillons produisaient plusieurs produits PCR), tandis que les cinq autres étaient négatifs à la PCR spécifique à l'assemblage.

Tableau 8. Résumé des résultats obtenus à l'aide de la PCR en temps réel, de la PCR spécifique à l'assemblage et de l'analyse du gène *tpi* d'échantillons positifs aux *Giardia* prélevés dans deux zones géographiques distinctes en Algérie, précédemment testés positifs pour *G. intestinalis* par microscopie des concentrés fécaux et conservés dans l'un ou l'autre du bichromate de potassium 2.5% ou de l'éthanol à 70% avant l'analyse.

ID d'échantillon	Date d'échantillonnage	Location	Milieu de conservation	Sexe	Groupe d'âge	Microscopie pour <i>Giardia intestinalis</i>	Résultats de la PCR en temps réel (Ct value)	Résultat de PCR spécifique à l'assemblage	Résultat de <i>tpi</i>
ALG-001	25/03/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	16.75	Assemblage B + autre bande/s	Assemblage A
ALG-002	05/03/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Féminin	Adulte	Positif	19.27	Négatif	Assemblage A
ALG-003	03/09/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Indéterminé	Positif	19.87	Assemblage B	Assemblage B
ALG-004	01/02/2016	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Indéterminé	Positif	20.16	Assemblage A	Assemblage A
ALG-005	14/11/2018	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	20.93	Négatif	Assemblage A
ALG-006	19/01/2017	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Indéterminé	Indéterminé	Positif	20.96	Négatif	Assemblage A
ALG-007	10/09/2017	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Indéterminé	Positif	21.1	Négatif	Assemblage B
ALG-008	27/08/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Indéterminé	Positif	21.11	Assemblage B	Assemblage B
ALG-009	19/12/2016	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Indéterminé	Positif	21.11	Négatif	Assemblage A
ALG-0010	11/03/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Féminin	Adulte	Positif	21.55	Négatif	Assemblage A
ALG-0011	02/04/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	22.16	Assemblage B	Non effectué
ALG-0012	18/09/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	22.17	Assemblage B	Non effectué
ALG-0013	28/01/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Indéterminé	Positif	22.49	Négatif	Assemblage A
ALG-0014	08/10/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Adulte	Positif	22.54	Assemblage B	Non effectué
ALG-0015	06/11/2017	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Indéterminé	Positif	22.56	Négatif	Assemblage A
ALG-0016	02/04/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	22.78	Assemblage B + autre bande/s	Assemblage A
ALG-0017	31/05/2018	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	22.79	Assemblage B + autre bande/s	Assemblage B
ALG-0018	19/09/2017	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	22.79	Négatif	Assemblage A
ALG-0019	07/01/2016	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Indéterminé	Positif	22.97	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0020	03/10/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Indéterminé	Positif	23.07	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0021	25/02/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	23.25	Assemblage B + autre bande/s	Assemblage A
ALG-0022	26/03/2018	Hôpital de Tolga - Biskra	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Négatif	23.42	Assemblage B	Assemblage B

PARTIE EXPERIMENTALE

ALG-0023	05/03/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	23.56	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0024	27/03/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	23.6	Négatif	Non effectué
ALG-0025	24/03/2018	Hôpital de Tolga - Biskra	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Négatif	23.61	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0026	23/04/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	23.71	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0027	03/12/2017	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	23.8	Négatif	Assemblage A
ALG-0028	26/02/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Masculin	Adulte	Positif	23.91	Assemblage A	Assemblage A
ALG-0029	13/02/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	24.24	Négatif	Assemblage A
ALG-0030	25/01/2016	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Indéterminé	Positif	24.26	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0031	24/03/2018	Hôpital de Tolga - Biskra	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Négatif	24.32	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0032	27/04/2018	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	24.81	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0033	27/03/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	25.02	Négatif	Assemblage A
ALG-0034	25/03/2018	Hôpital de Tolga - Biskra	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Négatif	25.12	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0035	31/03/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Indéterminé	Indéterminé	Positif	25.5	Assemblage B + autre bande/s	Assemblage B
ALG-0036	21/08/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Indéterminé	Positif	25.5	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0037	24/03/2018	Hôpital de Tolga - Biskra	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Négatif	25.59	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0038	10/04/2018	Hôpital de Tolga - Biskra	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	25.84	Négatif	Assemblage B
ALG-0039	01/10/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	26.24	Négatif	Assemblage A
ALG-0040	22/05/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	26.42	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0041	27/03/2018	Hôpital de Tolga - Biskra	BP 2.5%	Féminin	Adulte	Négatif	26.7	Négatif	Assemblage B
ALG-0042	27/03/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Masculin	Adulte	Positif	26.73	Assemblage A	Assemblage A
ALG-0043	21/08/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Négatif	26.75	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0044	03/09/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	26.76	Assemblage B + autre bande/s	Assemblage B
ALG-0045	02/09/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Adulte	Positif	27.4	Assemblage B + autre bande/s	Assemblage A
ALG-0046	27/03/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Masculin	Adulte	Positif	27.92	Assemblage A	Assemblage A
ALG-0047	05/04/2016	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Indéterminé	Positif	28	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0048	27/03/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	28.36	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0049	16/09/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	28.41	Négatif	Assemblage A
ALG-0050	06/10/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	29.5	Négatif	Assemblage B
ALG-0051	01/08/2016	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Indéterminé	Positif	29.76	Négatif	Assemblage B
ALG-0052	14/04/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	30.03	Négatif	Non effectué

PARTIE EXPERIMENTALE

ALG-0053	28/12/2016	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Masculin	Indéterminé	Négatif	30.44	Négatif	Assemblage A
ALG-0054	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Indéterminé	Positif	30.49	Négatif	Non effectué
ALG-0055	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Positif	30.86	Négatif	Non effectué
ALG-0056	14/02/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Masculin	Adulte	Positif	30.98	Négatif	Non effectué
ALG-0057	10/04/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	31.1	Négatif	Non effectué
ALG-0058	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Indéterminé	Positif	31.76	Négatif	Non effectué
ALG-0059	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Féminin	Indéterminé	Positif	32.18	Négatif	Non effectué
ALG-0060	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Indéterminé	Positif	32.21	Négatif	Non effectué
ALG-0061	22/09/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	32.23	Autre bandes	Non effectué
ALG-0062	08/04/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Masculin	Enfant	Positif	32.27	Négatif	Non effectué
ALG-0063	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Féminin	Indéterminé	Négatif	33.54	Négatif	Non effectué
ALG-0064	03/10/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Féminin	Adulte	Négatif	33.84	Négatif	Non effectué
ALG-0065	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Indéterminé	Positif	34.15	Négatif	Non effectué
ALG-0066	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Féminin	Indéterminé	Négatif	34.22	Négatif	Non effectué
ALG-0067	15/05/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Positif	35.88	Négatif	Non effectué
ALG-0068	26/02/2018	Hôpital de Tolga - Biskra	BP 2.5%	Féminin	Adulte	Positif	35.93	Négatif	Non effectué
ALG-0069	23/07/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Positif	36.68	Négatif	Non effectué
ALG-0070	Indéterminé	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Indéterminé	Indéterminé	Positif	36.71	Négatif	Non effectué
ALG-0071	08/10/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Positif	36.89	Négatif	Non effectué
ALG-0072	10/10/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Négatif	37.15	Négatif	Non effectué
ALG-0073	27/05/2013	CHU IH, BM - Alger	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Positif	37.43	Négatif	Non effectué
ALG-0074	21/10/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Positif	37.47	Négatif	Non effectué
ALG-0075	04/04/2018	Hôp Dr Saadane- Biskra	BP 2.5%	Féminin	Enfant	Négatif	38	Négatif	Non effectué
ALG-0076	03/07/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Positif	38.39	Négatif	Non effectué
ALG-0077	24/07/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Féminin	Enfant	Positif	39.1	Négatif	Non effectué
ALG-0078	02/05/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Positif	39.93	Négatif	Non effectué
ALG-0079	10/10/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Masculin	Enfant	Négatif	39.97	Négatif	Non effectué
ALG-0080	26/06/2018	CHU NH, HD - Alger	Ethanol 70%	Féminin	Enfant	Positif	41.51	Négatif	Non effectué

Hôp Dr Saadane : Hôpital Docteur Saadane, CHU IH, BM : Centre Hospitalo-Universitaire Isaad Hassani, Beni-Messous, CHU NH, HD : Centre Hospitalo-Universitaire Nafissa Hamoud, Hussein Dey, BP : Bichromate de potassium

3.3. Hétérozygotie de séquence allélique

Pour les 22 échantillons de *Giardia* Assemblage A, l'analyse de la séquence du gène *tpi* a révélé des données de séquence non ambiguës sans preuve d'ASH ; de plus, les 22 séquences étaient toutes identiques et regroupées avec la séquence de référence du sous-type A2 (numéro d'accès GenBank AF069557) (Figure 16).

Pour les 26 échantillons de l'assemblage B, le séquençage des produits PCR du *tpi* a produit vingt-et-une variantes de séquence distinctes (Tableau 9). Sept séquences n'avaient aucun double pic visible dans aucune position nucléotidique. Parmi ces séquences, quatre (ALG-007, ALG-0017, ALG-0019 et ALG-0040) étaient identiques à 100% à la séquence de référence de *Giardia* sous-type BIV / Ad-19 (numéro d'accès GenBank AF069560) (Figure 16, Tableau 9), et une séquence (ALG-0050) était identique de 100% à la séquence de référence de *Giardia* sous-type BIII / 2924 (numéro d'accès GenBank AY228628) (Tableau 9).

Les 19 séquences d'Assemblage B restantes avaient des nucléotides chevauchants (doubles pics) dans au moins une position. Parmi ces séquences, les séquences ALG-0022, ALG-0025 et ALG-0031 étaient identiques à 100%, avec des doubles pics aux positions suivantes : 77, 162, 165, et 168.

Tableau 9. Analyse comparative de l'étendue de l'hétérozygotie de séquence allélique dans le gène *tpi* de *Giardia intestinalis* Assemblage B identifié dans l'étude.

Assemblage/Sous-type	Materiel	Position des nucléotides depuis le début du gène																				
		77	91*	105	111	121	132	141	162	165*	168*	205	216	261	271	280	297	312	333	407	429	448
BIII/ 2924 (AY228628)		C	C	G	G	G	C	C	G	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
BIV/Ad-19 (AF069560)		C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-003	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	Y	R	C	Y	C	C	G	Y	R	R	C	Y	A	G	G
ALG-007	Échantillon de selles	C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-008	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	Y	R	Y	Y	C	C	G	Y	R	R	C	Y	A	G	G
ALG-0017	Échantillon de selles	C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-0019	Échantillon de selles	C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-0020	Échantillon de selles	C	Y	G	R	R	C	C	G	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0022	Échantillon de selles	Y	C	G	G	G	C	C	R	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0023	Échantillon de selles	C	Y	R	G	G	C	C	R	C	C	C	C	G	C	A	A	Y	T	A	G	R
ALG-0025	Échantillon de selles	Y	C	G	G	G	C	C	R	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0026	Échantillon de selles	C	T	G	G	G	C	C	G	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0030	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	C	R	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0031	Échantillon de selles	Y	C	G	G	G	C	C	R	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0032	Échantillon de selles	C	Y	G	G	G	C	C	R	C	C	Y	C	G	C	A	R	C	Y	A	G	G
ALG-0034	Échantillon de selles	T	C	G	G	G	C	C	A	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0035	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	C	R	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0036	Échantillon de selles	C	T	G	G	G	C	C	A	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0037	Échantillon de selles	Y	C	G	G	G	C	C	R	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0038	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	C	G	C	C	C	Y	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0040	Échantillon de selles	C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-0041	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	Y	C	G	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0043	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	C	R	C	C	C	C	G	Y	R	R	C	Y	A	G	G
ALG-0044	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	C	R	Y	C	C	C	G	C	A	A	C	T	W	G	G
ALG-0047	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	C	R	C	C	C	C	R	C	A	A	Y	T	A	G	G
ALG-0048	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	C	G	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0050	Échantillon de selles	C	C	G	G	G	C	C	G	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0051	Échantillon de selles	C	T	G	G	G	C	C	G	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	R	G

Clés: les astérisques (*) représentent des modèles de substitution suggérés comme marqueurs pour différents *Giardia* sous-types B (Ankarklev et al., 2012; Wielinga and Thompson, 2007).

La traduction des séquences nucléotidiques en séquences acide aminé a révélé des mutations silencieuses et non synonymes parmi les séquences de *Giardia* Assemblage B. Tous les profils de substitution observés étaient des mutations de transition ($T \leftrightarrow C$ ou $A \leftrightarrow G$), à l'exception d'une mutation de transversion ($A \leftrightarrow T$) observée dans l'échantillon ALG-0044. Les substitutions nucléotidiques de sept séquences (ALG-0026, ALG-0030, ALG-0035, ALG-0038, ALG-0041, ALG-0048 et ALG-0051) correspondaient à des mutations silencieuses et n'ont donc pas provoqué de changement dans la séquence d'acide aminé, tandis que les substitutions de nucléotides observées dans 12 séquences (ALG-003, ALG-008, ALG-0020, ALG-0022, ALG-0023, ALG-0025, ALG-0031, ALG-0032, ALG-0037, ALG-0043, ALG-0044 et ALG-0047) étaient des mutations non synonymes (Figure 17, Tableau 10).

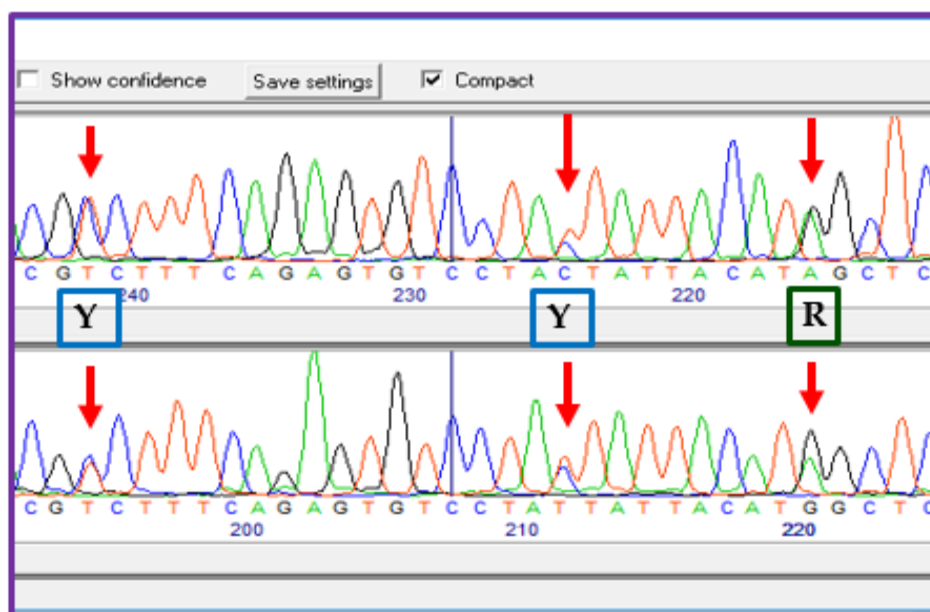


Figure 17. Chromatogramme d'une séquence générée à partir de l'ADN de l'isolat ALG-003 illustrant des variations nucléotidiques où les positions indiquées par une flèche montrent la présence d'un double pic.

Tableau 10. Analyse comparative de la séquence des substitutions d'acides aminés exprimées dans le gène *tpi* des échantillons de *Giardia intestinalis* Assemblage B identifiés dans l'étude. Seuls les échantillons avec des doubles pics entraînant l'existence de substitutions non-synonymes ont été inclus.

Séquences d'acides aminés	Position des acides aminés depuis le début du gène							
	26	31	41	87	91	94	136	150
sequence de référence <i>tpi</i> (KP687784.1)	A	Y	V	M	H	I	K	A
ALG-003	A	H	V	M	(H ↔ Y)	(I ↔ V)	K	A
ALG-008	A	H	V	M	(H ↔ Y)	(I ↔ V)	K	A
ALG-0020	A	(H ↔ Y)	(I ↔ V)	M	H	I	K	A
ALG-0022	(A ↔ V)	H	V	M	H	I	K	A
ALG-0023	A	(H ↔ Y)	V	M	H	I	K	(T ↔ A)
ALG-0025	(A ↔ V)	H	V	M	H	I	K	A
ALG-0031	(A ↔ V)	H	V	M	H	I	K	A
ALG-0032	A	(H ↔ Y)	V	M	H	I	K	A
ALG-0037	(A ↔ V)	H	V	M	H	I	K	A
ALG-0043	A	H	V	M	(H ↔ Y)	(I ↔ V)	K	A
ALG-0044	A	H	V	M	H	I	(K ↔ M)	A
ALG-0047	A	H	V	(I ↔ M)	H	I	K	A

L'analyse d'alignement des séquences de nucléotides traduites en acides aminés avec la séquence de référence complète du gène *tpi* (numéro d'accès GenBank : KP687784.1) a indiqué que les échantillons ALG-003, ALG-008 et ALG-0043 avaient deux substitutions d'acide aminé exprimées à la position 91 (H ↔ Y) et 94 (I ↔ V) entraînant le remplacement de l'acide aminé Histidine en Tyrosine et de l'Isoleucine en Valine, respectivement. L'échantillon ALG-0020 avait deux substitutions d'acide aminé exprimées en positions 31 (H ↔ Y) et 41 (I ↔ V) induisant le remplacement de l'acide aminé Histidine en Tyrosine et Isoleucine en Valine, respectivement. Les échantillons ALG-0022, ALG-0025, ALG-0031 et ALG-0037 ont indiqué une substitution exprimée en position 26 (A ↔ V) déclenchant un changement de l'acide aminé Alanine en Valine. L'échantillon ALG-0023 présentait deux substitutions exprimées en position 31 (H ↔ Y) et 150 (T ↔ A) induisant un changement de l'acide aminé Histidine en Tyrosine et de la Thréonine en Alanine. Les échantillons ALG-0032, ALG-0044 et ALG-0047 présentaient une substitution exprimée en positions 31 (H ↔

Y), 136 (K ↔ M) et 87 (I ↔ M) entraînant le changement de l'acide aminé Histidine en Tyrosine, Lysine en Méthionine et l'Isoleucine en Méthionine, respectivement. Tous les remplacements d'acides aminés sont réversibles.

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons fourni des informations de base sur les assemblages de *Giardia* circulant dans la population humaine en Algérie en utilisant le génotypage basé sur des séquences, et nous fournissons certaines des premières données de génotypage à émerger dans ce domaine dans toute l'Afrique. De plus, notre étude fournit des informations sur la prévalence de *Giardia* chez les individus positifs aux parasites intestinaux dans des zones sélectionnées en Algérie et des informations sur les facteurs en amont susceptibles d'influencer le processus menant à un génotypage réussi.

Sur la base de la PCR en temps réel, le taux global de *Giardia intestinalis* chez les individus microscopiquement positifs pour les parasites intestinaux était de 67%, les enfants étant plus fréquemment infectés que les adultes (82% contre 30%), confirmant la tendance identifiée dans notre étude précédente (Belkessa et al., 2021).

La PCR en temps réel était plus sensible pour la détection de *Giardia* que la microscopie, ce qui est en accord avec les résultats précédents (Beyhan and Taş Cengiz, 2017; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., 2009; Schuurman et al., 2007; Stensvold and Nielsen, 2012). Cependant, nous avons identifié sept échantillons qui étaient positifs pour la microscopie vis-à-vis de *Giardia* mais négatifs par PCR en temps réel. Ce résultat pourrait s'expliquer en partie par une mauvaise interprétation lors du diagnostic (échantillons faux positifs) ou par la présence de kystes 'vides' (considérés comme vrais positifs), qui seraient observables par microscopie mais manqueraient de matériel génétique qui pourrait être amplifié par PCR en temps réel comme précédemment observé par des collègues (Lebbad et al., 2011).

La différence entre les valeurs Ct observées lors de l'utilisation du bichromate de potassium (2.5%) ou de l'éthanol (70%) pour le stockage des échantillons pourrait indiquer que le premier est plus optimal pour la conservation des échantillons prélevés pour la caractérisation moléculaire de *Giardia*. Ce résultat doit être interprété avec prudence, car les informations cliniques ou épidémiologiques qui pourraient autrement expliquer cette différence n'étaient pas disponibles pour cette analyse. Nous avons remarqué que l'ADN extrait d'échantillons collectés en 2013 et stockés dans du bichromate de potassium était de

qualité suffisante pour l'extraction d'ADN. L'analyse de l'ADN effectuée en 2019 illustre bien l'applicabilité du bichromate de potassium à cette fin.

Le test PCR spécifique à l'assemblage s'est avéré fiable et sensible dans les cas d'échantillons fortement déséquilibrés avec des proportions variables d'ADN des assemblages A et B même lorsque des échantillons extrêmement dilués sont utilisés (Vanni et al., 2012). Cependant, dans notre étude, seuls les échantillons fortement positifs à la PCR en temps réel ont donné des résultats interprétables.

Le typage d'assemblage en utilisant le gène *tpi* comme marqueur génétique a révélé une amplification cohérente lorsque des échantillons positifs à la PCR avec des valeurs $Ct \leq 32$ étaient utilisés. De plus, en termes de concordance, la PCR spécifique à l'assemblage a montré un résultat similaire avec le typage par assemblage utilisant *tpi* pour 52% (25/48) des échantillons soumis à l'analyse du gène *tpi*. Cependant, 40% (19/48) des échantillons négatifs par PCR spécifique à l'assemblage étaient positifs par typage d'assemblage à l'aide de *tpi*, ce qui suggère que la PCR spécifique à l'assemblage est peut-être moins sensible que la PCR nichée basée sur l'amplification et le séquençage du gène *tpi*. La plupart des échantillons identifiés comme Assemblage B-positifs par séquençage *tpi* ont été correctement identifiés comme Assemblage B par une PCR spécifique à l'assemblage, seuls quatre des 22 échantillons identifiés comme Assemblage A par séquençage *tpi* ont été notés comme Assemblage A - positifs par PCR spécifique à l'assemblage ; la plupart des échantillons restants étaient négatifs. Cela indique que la PCR spécifique à l'assemblage était spécifique et que la sensibilité était similaire à celle du test *tpi* pour l'Assemblage B, mais remarquablement moins sensible en ce qui concerne l'Assemblage A.

Dans l'ensemble, l'assemblage B a été principalement identifié chez les enfants ; cependant, la majorité des séquences *tpi* obtenues à partir d'individus d'âge inconnu ont également été attribuées à l'Assemblage B ; par conséquent, nous ne pouvions pas relier avec certitude l'Assemblage B au jeune âge (Tableaux 7 et 8).

Une variation génétique étendue a été observée dans les séquences de *Giardia* Assemblage B, avec 21 exemples d'ASH identifiés parmi un total de 19 échantillons de *Giardia* Assemblage B, alors qu'aucune variation génétique n'a été notée dans les séquences de *Giardia* Assemblage A.

Dans notre étude, toutes les séquences de l'Assemblage A étaient identiques. On sait que le gène *tpi* est hautement conservé dans l'Assemblage A (Ankarklev et al., 2012). Pendant ce temps, le séquençage du *tpi* a révélé une grande variation génétique dans les échantillons

de *Giardia* Assemblage B. L'observation de l'hétérogénéité des séquences dans 19/26 séquences comme en témoigne la présence d'un ou plusieurs doubles pics dans les deux séquences (avant et arrière) indique que l'ASH dans l'Assemblage B se produit souvent dans cette population.

Cette hétérozygotie peut être due à des infections mixtes courantes avec des parasites de plusieurs sous-assemblages de l'Assemblage B ou à l'ASH dans les noyaux de kystes uniques (Aguiar et al., 2016; Ankarklev et al., 2012; Cacciò et al., 2008; Lalle et al., 2009; Sprong et al., 2009).

Plusieurs études portant sur divers hôtes ont rapporté que l'ASH peut se produire à des positions spécifiques et que sa configuration peut différer d'une étude à l'autre en raison probablement d'une importante variabilité intra-génique au sein des séquences des Assemblages B.

Les modèles de substitution aux positions 91, 162, 165, 168 et 280 ont été signalés à partir d'échantillons humains en Suède (Ankarklev et al., 2012), au Pérou, en Inde et aux États-Unis (Sulaiman et al., 2003; Wielinga and Thompson, 2007). Les modèles de substitution aux positions 216, 297 et 429 ont été signalés à partir d'échantillons d'eau (Wielinga and Thompson, 2007); le premier (position 216) a également été signalé à partir d'échantillons de rats musqués aux États-Unis (Sulaiman et al., 2003; Wielinga and Thompson, 2007), le second (position 297) a été signalé à partir d'échantillons humains au Pérou, respectivement (Wielinga and Thompson, 2007), tandis que le dernier (position 429) a été signalé à partir d'échantillons de lapins et humain en Chine et en Australie, respectivement (Wielinga and Thompson, 2007). Le modèle de substitution à la position 77 a été signalé à partir d'échantillons humains dans l'Éthiopie centrale (Wegayehu et al., 2016b) ainsi que d'échantillons de chiens aux États-Unis (Sulaiman et al., 2003). Le modèle de substitution à la position 333 a été signalé chez le chien en Allemagne (Wielinga and Thompson, 2007).

Dans la présente étude, nous avons pris en compte uniquement les chromatogrammes de séquençage avec des pics clairs et très peu de «bruit de fond». Des pics doubles d'approximativement la même intensité ont été observés sur les brins d'ADN avant et arrière. Ainsi, la possibilité qu'un séquençage de faible qualité puisse être la raison du nombre élevé de variants d'allèles pourrait être exclue, également parce que les séquences des échantillons de l'assemblage A ne présentaient aucun bruit de fond. Dans notre étude, nous avons observé l'ASH dans 73% des échantillons de l'Assemblage B. Notre étude a certaines limites à considérer, premièrement, l'étude n'a été menée que dans deux zones géographiques, de sorte

que les données pourraient ne pas refléter la situation dans l'ensemble du pays. De plus, nous n'avons enquêté que sur les personnes qui avaient été en contact avec le système de soins de santé, de sorte que la prévalence et la distribution des assemblages de *Giardia* dans la population de base restent inconnues. De plus, si des informations cliniques étaient disponibles, nous aurions pu déterminer si les symptômes ou l'intensité de l'infection mesurés par PCR en temps réel différaient entre les personnes atteintes de l'Assemblage A et celles atteintes de l'Assemblage B. De même, l'âge n'était pas connu pour plusieurs individus. Si les patients d'âge inconnu étaient tous des adultes, la différence de prévalence de *Giardia* ne serait pas aussi grande que celle prise en compte ici. De plus, nous n'avons utilisé que deux méthodes de typage (PCR spécifique à l'assemblage et génotypage *tpi*) pour l'attribution des échantillons de *Giardia* au niveau de l'assemblage, ce qui n'est pas toujours fiable sachant que des méthodes utilisant différents marqueurs génétiques peuvent donner des résultats différents. Des résultats plus cohérents sont obtenus lors de la combinaison des informations de plusieurs marqueurs (Sprong et al., 2009). Sur la base des données disponibles, l'appel de sous-assemblage n'était pas possible en raison de la diversité génétique et du taux élevé de substitutions des échantillons de l'Assemblage B, ce qui rend les modèles de sous-assemblage difficile à déterminer (Wielinga et al., 2011) ainsi que le manque d'informations dans la base de données GenBank.

Plusieurs études antérieures ont également signalé la difficulté d'attribuer des sous-assemblages dans des échantillons d'Assemblage B (Cacciò et al., 2008; Ferreira et al., 2012; Gasparinho et al., 2017; Lebbad et al., 2008).



CONCLUSION

Deux études ont été menées, la première menée entre 2012 et 2013 dans la partie Ouest d'Alger à l'hôpital universitaire Beni-Messous d'Alger. La seconde étude a été réalisée de 2013 à 2018 dans quatre hôpitaux en Algérie. La première étude donne un aperçu sur la prévalence des parasites intestinaux avec un accent particulier sur *Giardia* dans la population humaine en indiquant l'importance du niveau d'infection par *Giardia* chez les enfants et les adultes. Nous avons constaté que *Giardia* était plus fréquent chez les sujets jeunes (enfants) et n'était pas particulièrement associé aux symptômes intestinaux. Ainsi, nous n'avons pas pu déterminer dans quelle mesure les symptômes pourraient être en relation avec l'intensité de l'infection. Enfin, en vue de la nette différence dans la distribution de *Giardia*, *Blastocystis* et archamoebids entre les groupes d'âge, il serait pertinent d'étudier la distribution de ces parasites dans le contexte du microbiome intestinal bactérien pour savoir si les différences de distribution parasitaire se reflètent dans la différence du microbiome intestinal et quelles pourraient être celles-ci.

Dans la seconde étude, la plupart des enfants parasités positifs avaient *Giardia*. Nous avons en outre observé que la PCR en temps réel semble être plus sensible que la microscopie pour détecter *Giardia* dans les échantillons de selles. Une amplification et un séquençage robustes du gène *tpi* sont possibles lorsque des échantillons de PCR en temps réel hautement positifs sont utilisés. Nous avons pu identifier que le bichromate de potassium semble bien être un meilleur agent de conservation des échantillons de selles collectés pour le typage de *Giardia* que l'éthanol. Enfin, nous avons observé que la plupart des séquences de l'Assemblage B présentaient des pics de nucléotides se chevauchant à des positions spécifiques dans les chromatogrammes par rapport aux séquences de l'Assemblage A, suggérant une ASH substantielle et une nette différence de diversité génétique entre les assemblages A et B. Pour compléter notre étude, d'autres recherches sont nécessaires avec des données claires sur l'âge, le sexe, la zone géographique et les données cliniques, y compris une enquête sur la population de base. Le but est de déterminer si cette dernière est plus ou moins infectée que celle en contact avec le système de santé, mais aussi pour déterminer les assemblages de cette population de base (les personnes infectées par *Giardia* qui ne demandent pas de traitement/conseil médical). Ceci est d'une importance substantielle pour la mise en œuvre de stratégies de prévention et de politiques de santé publique pour ce pathogène.

Compte tenu des limites de cette étude, une étude épidémiologique exhaustive sur une période plus longue couvrant la population dans plusieurs régions du pays (à la fois en milieu urbain et rural) devrait être menée pour mieux comprendre l'impact réel de cette infection.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Latif, N.F., El-Taweel, H.A., Gaballah, A., Salem, A.I., Abd El-Malek, A.H.M., 2020. Molecular Characterization of *Giardia intestinalis* Detected in Humans and Water Samples in Egypt. *Acta Parasitol.* 65, 482–489.
- Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447–475.
- Adam, R.D., 2000. The *Giardia lamblia* genome. *Int. J. Parasitol.* 30, 475–484.
- Adeyemo, F.E., Singh, G., Reddy, P., Stenström, T.A., 2018. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Trop.* 184, 15–28.
- Adou-bryn D, Kouassi M, Brou J, Ouhon J, Assoumou A., 2001. Prévalence globale des parasitoses à transmission orale chez les enfants à Toumodi (Cote d’Ivoire). *Med. Afr. Noire* 48, 394–398.
- Aguiar, J.M., Silva, S.O., Santos, V.A. dos, Taniwaki, S.A., Oliveira, T.M.F. de S., Ferreira, H.L., Keid, L.B., Gregori, F., Soares, R.M., 2016. Evidence of heterozygosity and recombinant alleles in single cysts of *Giardia duodenalis*. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 25, 187–195.
- Akinkuotu, O.A., Takeet, M.I., Otesile, E.B., Olufemi, F., Greenwood, S.J., McClure, J.T., 2019a. Prevalence and multilocus genotypes of *Giardia duodenalis* infecting pigs in Ogun state, Nigeria. *Infect. Genet. Evol.* 70, 53–60.
- Akinkuotu, O.A., Takeet, M.I., Otesile, E.B., Olufemi, F., Greenwood, S.J., McClure, J.T., 2019b. Multi-locus genotyping and phylogenetic analyses of *Giardia intestinalis* isolates from indigenous goats in Ogun State, Nigeria. *Acta Trop.* 195, 15–22.
- Allen AVH, Ridley DS, 1970. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J. Clin. Pathol.* 23, 545–546.
- Alonso, J.L., Amorós, I., Guy, R.A., 2014. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Parasitol. Res.* 113, 2671–2678.
- Andersen L.O.B., Röser, D., Nejsun, P., Nielsen, H.V., Stensvold, C.R., 2013. Is Supplementary Bead Beating for DNA Extraction from Nematode Eggs by Use of the NucliSENS easyMag Protocol Necessary?. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1345–1347.
- Andrews, R.H., Adams, M., Boreham, P.F.L., Melonis, B.P., 1989. *Giardia intestinalis*: Electrophoretic Evidence for a Species Complex. *Int. J. Parasitol.* 19, 183–190.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., Svärd, S.G., 2010. Behind the smile: Cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 413–422.

- Ankarklev, J., Lebbad, M., Einarsson, E., Franzén, O., Ahola, H., Troell, K., Svärd, S.G., 2018. A novel high-resolution multilocus sequence typing of *Giardia intestinalis* Assemblage A isolates reveals zoonotic transmission, clonal outbreaks and recombination. *Infect. Genet. Evol.* 60, 7–16.
- Ankarklev, J., Svärd, S.G., Lebbad, M., 2012. Allelic sequence heterozygosity in single *Giardia* parasites. *BMC Microbiol.* 12–65.
- Ayadi, A., Mahfoudh, A., Mahjoubi, F., 1991. Parasitoses intestinales chez l'enfant : bilan de 2 ans dans le centre hospitalo-universitaire de Sfax. *Med. Afr. Noire* 38, 557–560.
- Bachta, E., Zenaidi, N., Belkaid, M., Tabet Derraz, O., Boudhane, L., 1990. Bilan des parasitoses intestinales rencontrées dans l'Algérois (années 1984-1988). *Bull. la Société Pathol. Exot.* 83, 510–516.
- Balcioglu, I.C., Kurt, Ö., Limoncu, M.E., Dinç, G., Gümüş, M., Kilimcioglu, A.A., Kayran, E., Özbilgin, A., 2007. Rural life, lower socioeconomic status and parasitic infections. *Parasitol. Int.* 56, 129–133.
- Barry, M.A., Weatherhead, J.E., Hotez, P.J., Woc-Colburn, L., 2013. Childhood Parasitic Infections Endemic to the United States. *Pediatr. Clin. North Am.* 60, 471–485.
- Bartelt, L.A., Sartor, R.B., 2015. Advances in understanding *Giardia*: Determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep.* 7, 62. <https://doi.org/10.12703/P7-62>
- Belkessa, S., Ait-Salem, E., Laatamna, A., Houali, K., Sönksen, U.W., Hakem, A., Bouchene, Z., Ghalimi, F., Stensvold, C.R., 2021. Prevalence and Clinical Manifestations of *Giardia intestinalis* and Other Intestinal Parasites in Children and Adults in Algeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 104(3), 910–916.
- Benouis, A., Bekkouche, Z., Benmansour, Z., 2013. Etude épidémiologique des parasitoses intestinales humaines au niveau du C.H.U. d'Oran (Algérie). *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 2, 613–620.
- Bernander, R., Palm, J.E.D., Svärd, S.G., 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell. Microbiol.* 3, 55–62.
- Bertrand, I., 2005. Détection et génotypage des kystes de *Giardia lamblia* à partir de matrices environnementales et d'échantillons biologiques. Thèse de Doctorat. - Université Henri Poincaré- Nancy I. 1–229.
- Beyhan, Y.E., Taş Cengiz, Z., 2017. Comparison of microscopy, ELISA, and real-time PCR for detection of *Giardia intestinalis* in human stool specimens. *Turkish J. Med. Sci.* 47, 1295–1299.

- Birky Jr., C.W., 2005. Sex: Is *Giardia* Doing It in the Dark? *Curr. Biol.* 15, R56–R58.
- Boucher, S.E.M., Gillin, F.D., 1990. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect. Immun.* 58, 3516–3522.
- Breurec, S., Vanel, N., Bata, P., Chartier, L., Farra, A., Favennec, L., Franck, T., Giles-Vernick, T., Gody, J.C., Luong Nguyen, L.B., Onambélé, M., Rafaï, C., Razakandrainibe, R., Tondeur, L., Tricou, V., Sansonetti, P., Vray, M., 2016. Etiology and Epidemiology of Diarrhea in Hospitalized Children from Low Income Country: A Matched Case-Control Study in Central African Republic. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004283.
- Broglia, A., Weitzel, T., Harms, G., Cacciò, S.M., Nöckler, K., 2013. Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from German travellers. *Parasitol. Res.* 112, 3449–3456.
- Bruijnesteijn van Coppenraet, L.E.S., Wallinga, J.A., Ruijs, G.J.H.M., Bruins, M.J., Verweij, J.J., 2009. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 869–874.
- Buchel, L.-A., Gorenflot, A., Chochillon, C., Savel, J., Gobert, J.-G., 1987. In vitro Excystation of *Giardia* from Humans: A Scanning Electron Microscopy Study. *J. Parasitol.* 73, 487–493.
- Budding, A.E., Grasman, M.E., Lin, F., Bogaards, J.A., Soeltan-Kaersenhout, D.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Van Bodegraven, A.A., Savelkoul, P.H.M., 2010. IS-pro: High-throughput molecular fingerprinting of the intestinal microbiota. *FASEB J.* 24, 4556–4564.
- Cacciò, S.M., Beck, R., Almeida, A., Bajer, A., Pozio, E., 2010. Identification of *Giardia* species and *Giardia duodenalis* assemblages by sequence analysis of the 5.8S rDNA gene and internal transcribed spacers. *Parasitology* 137, 919–925.
- Cacciò, S.M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., Pozio, E., 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int. J. Parasitol.* 38, 1523–1531.
- Cacciò, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E., 2002. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int. J. Parasitol.* 32, 1023–1030.

- Cacciò, S.M., Lalle, M., Svärd, S.G., 2018. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infect. Genet. Evol.* 66, 335–345.
- Cacciò, S.M., Ryan, U., 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160, 75–80.
- Cacciò, S.M., Sprong, H., 2011. Epidemiology of Giardiasis in Humans. In: Luján, H.D., Svärd, S. (Eds.), *Giardia. A Model Organism*. Springer-Werlag/Wien, Austria 17–28.
- Cacciò, S.M., Thompson, R.C.A., McLauchlin, J., Smith, H. V., 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21, 430–437.
- Carpenter, M.L., Assaf, Z.J., Gourguechon, S., Cande, W.Z., 2012. Nuclear inheritance and genetic exchange without meiosis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J. Cell Sci.* 125, 2523–2532.
- Carvalho-Costa, F.A., Gonçalves, A.Q., Lassance, S.L., Da Silva Neto, L.M., Salmazo, C.A.A., Bóia, M.N., 2007. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49, 147–153.
- Cernikova, L., Faso, C., Hehl, A.B., 2018. Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* 14, e1007250.
- Chilvers, B.L., Cowan, P.E., Waddington, D.C., Kelly, P.J., Brown, T.J., 1998. The prevalence of infection of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in wild animals on farmland, southeastern North Island, New Zealand. *Int. J. Environ. Health Res.* 8, 59–64.
- Ciara E O'Reilly, Anna B Bowen, Nytzia E Perez, John P Sarisky, Craig A Shepherd, Mark D Miller, et al., 2007. A Waterborne Outbreak of Gastroenteritis With Multiple Etiologies Among Resort Island Visitors and Residents: Ohio, 2004. *Clin. Infect. Dis.* 44, 506–512.
- Colli, C.M., Bezagio, R.C., Nishi, L., Bignotto, T.S., Ferreira, É.C., Falavigna-Guilherme, A.L., Gomes, M.L., 2015. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in Southern Brazil indicates a relationship among them. *PLoS One* 10, e0118065.
- Cotton, J.A., Beatty, J.K., Buret, A.G., 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int. J. Parasitol.* 41, 925–933.
- Dale, K., Kirk, M., Sinclair, M., Hall, R., Leder, K., 2010. Reported waterborne outbreaks of gastrointestinal disease in Australia are predominantly associated with recreational exposure. *Aust. N. Z. J. Public Health* 34, 527–530.

- Daly, E.R., Roy, S.J., Blaney, D.D., Manning, J.S., Hill, V.R., Xiao, L., Stull, J.W., 2010. Outbreak of giardiasis associated with a community drinking-water source. *Epidemiol. Infect.* 138, 491–500.
- Delpont, T.C., Asher, A.J., Beaumont, L.J., Webster, K.N., Harcourt, R.G., Power, M.L., 2014. *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* occurrence in Australian sea lions (*Neophoca cinerea*) exposed to varied levels of human interaction. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 269–275.
- DeRegnier, D.P., Cole, L., Schupp, D.G., Erlandsen, S.L., 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1223–1229.
- Dobell, C., 1920. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proc. R. Soc. Med.* 13, 1–15.
- Drouin, G., de Sá, M.M., Zuker, M., 1995. The *Giardia lamblia* actin gene and the phylogeny of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 41, 841–849.
- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T.D., Hetsko, M.L., Smith, J.R., Kagnoff, M.F., Gillin, F.D., 2000. Nitric Oxide Production by Human Intestinal Epithelial Cells and Competition for Arginine as Potential Determinants of Host Defense Against the Lumen-Dwelling Pathogen *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* 164, 1478–1487.
- Efstratiou, A., Ongerth, J.E., Karanis, P., 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Res.* 114, 14–22.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., Svärd, S.G., 2016. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* 34, 47–52.
- Einarsson, E., Svärd, S.G., 2015. Encystation of *Giardia intestinalis*—a Journey from the Duodenum to the Colon. *Curr. Trop. Med. Reports* 2, 101–109.
- Einarsson, E., Svärd, S.G., Troell, K., 2015. UV irradiation responses in *Giardia intestinalis*. *Exp. Parasitol.* 154, 25–32.
- Eisenberg, J.N.S., Brookhart, M.A., Rice, G., Brown, M., Colford, J.M., 2002. Disease transmission models for public health decision making: Analysis of epidemic and endemic conditions caused by waterborne pathogens. *Environ. Health Perspect.* 110, 783–790.
- El Fatni, C., Olmo, F., El Fatni, H., Romero, D., Rosales, M.J., 2014. First genotyping of *Giardia duodenalis* and prevalence of enteroparasites in children from Tetouan (Morocco). *Parasite* 21, 48.

- El Guamri, Y., Belghyti, D., Achicha, A., Tiabi, M., Aujjar, N., Barkia, A., El Kharrim, K., Barkia, H., El-Fellaki, E., Mousahel, R., Bouachra, H., Lakhal, A., 2009. Enquête épidémiologique rétrospective sur les parasitoses intestinales au Centre hospitalier provincial El Idrissi (Kénitra, Maroc): Bilan de 10 ans (1996-2005). *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 67, 191–202.
- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., Viscogliosi, E., 2014. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* 14, 164.
- Elswaifi, S.F., Palmieri, J.R., El-Tantawy, N., El-Hussiny, M., Besheer, T., Abohashem, E., 2016. Comparison of microscopic and immunoassay examination in the diagnosis of intestinal protozoa of humans in Mansoura, Egypt. *J. Parasit. Dis.* 40, 580–585.
- Erismann, S., Diagbouga, S., Odermatt, P., Knoblauch, A.M., Gerold, J., Shrestha, A., Grissoum, T., Kaboré, A., Schindler, C., Utzinger, J., Cissé, G., 2016. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among schoolchildren in the Plateau Central and Centre-Ouest regions of Burkina Faso. *Parasit Vectors* 9, 554.
- Erlandsen, S.L., Bemrick, W.J., 1987. SEM Evidence for a New Species, *Giardia psittaci*. *J. Parasitol.* 73, 623–629.
- Erlandsen, S.L., Bemrick, W.J., Pawley, J., 1989. High-Resolution Electron Microscopic Evidence for the Filamentous Structure of the Cyst Wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.* 75, 787–797.
- Erlandsen, S.L., Bemrick, W.J., Schupp, D.E., Shields, J.M., Jarroll, E.L., Sauch, J.F., Pawley, J.B., 1990. High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 625–632.
- Erlandsen, S.L., Weissner, S., Ottenwaelter, C., 2002. Investigation into the life cycle of *Giardia* using videomicroscopy and field emission SEM. In *Giardia. The Cosmopolitan Parasite*, Edited by B Olson, M Olson P Wallis, 3-14. Oxon CABI Publ. 2002.
- Escobedo, A.A., Cimerman, S., 2007. Giardiasis: A pharmacotherapy review. *Expert Opin. Pharmacother.* 8, 1885–1902.
- Ey, P.L., Mansouri, M., Kulda, J., Nohýnková, E., Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., 1997. Genetic Analysis of *Giardia* from Hoofed Farm Animals Reveals Artiodactyl-Specific and Potentially Zoonotic Genotypes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44, 626–635.

- Farthing, M.J., 1996. Giardiasis. *Gastroenterol Clin North Am* 25, 493–515.
- Farthing, M.J.G., 1990. Immunopathology of giardiasis. *Springer Semin. Immunopathol.* 12, 269–282.
- Faso, C., Hehl, A.B., 2019. A cytonaut's guide to protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Advances in Parasitology.* 106:105-127.
- Faso, C., Konrad, C., Schraner, E.M., Hehl, A.B., 2013. Export of cyst wall material and Golgi organelle neogenesis in *Giardia lamblia* depend on endoplasmic reticulum exit sites. *Cell. Microbiol.* 15, 537–553.
- Faye, O., N'dir, O., Gaye, O., Dieng, Y., Dieng, T., Bah, I.B., Diallo.S., 1998. Les parasitoses intestinales dans le bassin du fleuve Sénégal. Résultats d'enquêtes effectuées en milieu rural. *Médecine d'Afrique Noire* 45, 491–495.
- Feely, D.E., 1988. Morphology of the Cyst of *Giardia microti* by Light and Electron Microscopy. *J. Protozool.* 35, 52–54.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies : An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N. Y). 39, 783–791.
- Feng, Y., Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 110–140.
- Ferreira, F.S., Centeno-Lima, S., Gomes, J., Rosa, F., Rosado, V., Parreira, R., Cravo, L., Atouguia, J., Távora Tavira, L., 2012. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children from the Cufada Lagoon Natural Park, Guinea-Bissau. *Parasitol. Res.* 111, 2173–2177.
- Filice, F.P., 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 57, 53–146.
- Fink, M.Y., Singer, S.M., 2017. The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends Parasitol.* 33, 901–913.
- Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J., Ellis, J., 2012. Enteric protozoa in the developed world: A public health perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 420–449.
- Gasparinho, C., Ferreira, F.S., Mayer, A.C., Mirante, M.C., Nery, S.V., Santos-Reis, A., Portugal-Calisto, D., Brito, M., 2017. Molecular characterization of *Giardia lamblia* in children less than 5 years of age with diarrhoea attending the Bengo General Hospital, Angola. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 111, 497–503.
- Gasser, R.B., 2006. Molecular tools - Advances, opportunities and prospects. *Vet. Parasitol.* 136, 69–89.

- Gelanew, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E., Cacciò, S.M., 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop.* 102, 92–99.
- Gerwig, G.J., Van Albert Kuik, J., Leeflang, B.R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Karr, C.D., Jarroll, E.L., 2002. The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel β (1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: A structural and conformational study. *Glycobiology* 12, 499–505.
- Geurden, T., Levecke, B., Cacci, S.M., Visser, A., De Groote, G., Casaert, S., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2009. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-outbreak related cases of diarrhoea in human patients in Belgium. *Parasitology* 136, 1161–1168.
- Geurden, T., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2010. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp. Parasitol.* 124, 98–106.
- Gillin, F.D., Boucher, S.E., Rossi, S.S., Reiner, D.S., 1989. *Giardia lamblia*: The roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Exp. Parasitol.* 69, 164–174.
- Gillin, F.D., Reiner, D.S., Gault, M.J., Douglas, H., Das, S., Wunderlich, A., Sauch, J.F., 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science* (80-.). 235, 1040–1043.
- Graczyk, T.K., Bosco-Nizeyi, J., Ssebide, B., Thompson, R.C.A., Read, C., Cranfield, M.R., 2002. Anthrozoönotic *Giardia duodenalis* Genotype (Assemblage) a Infections in Habitats of Free-Ranging Human-Habituated Gorillas, Uganda. *J. Parasitol.* 88, 905–909.
- Halliez, M.C.M., Buret, A.G., 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J. Gastroenterol.* 19, 8974–8985.
- Hamaidi-Chergui, F., Hamaidi, M.S., Benkhetar, M., Mahieddine, A.O., 2013. Intestinal infections in Boufarik hospital (Blida) Algeria. *Rev Ind Microbiol Sanit Env.* 7, 73–87.
- Helmy, Y.A., Spierling, N.G., Schmidt, S., Rosenfeld, U.M., Reil, D., Imholt, C., Jacob, J., Ulrich, R.G., Aebischer, T., Klotz, C., 2018. Occurrence and distribution of *Giardia* species in wild rodents in Germany. *Parasit Vectors* 11, 213.
- Henriksen, S.A., Pohlenz, J.F.L., 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl Neelsen technique. *Acta Vet. Scand.* 22, 594–596.
- Heyworth, M.F., 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite* 23, 13.

- Heyworth, M.F., Foell, J.D., Sell, T.W., 1999. *Giardia muris*: Evidence for a β -giardin homologue. *Exp. Parasitol.* 91, 284–287.
- Hijawi, N., Yang, R., Hatmal, M., Yassin, Y., Mharib, T., Mukbel, R., Mahmoud, S.A., Al-Shudifat, A.E., Ryan, U., 2018. Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of *Giardia* isolates from Jordan. *Exp. Parasitol.* 185, 23–28.
- Hillman, A., Ash, A., Elliot, A., Lymbery, A., Perez, C., Thompson, R.C.A., 2016. Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isodon obesulus*). *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 5, 110–115.
- Hogan, J.N., Miller, W.A., Cranfield, M.R., Ramer, J., Hassell, J., Bosco Noheri, J., Conrad, P.A., Gilardi, K.V.K., 2014. *Giardia* in mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*), forest buffalo (*Syncerus caffer*), and domestic cattle in Volcanoes national park, Rwanda. *J. Wildl. Dis.* 50, 21–30.
- Hopkins, R.M., Meloni, B.P., Groth, D.M., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C.A., 1997. Ribosomal RNA Sequencing Reveals Differences between the Genotypes of *Giardia* Isolates Recovered from Humans and Dogs Living in the Same Locality. *J. Parasitol.* 83, 44–51.
- Hunter, P.R., Thompson, R.C.A., 2005. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* 35, 1181–1190.
- Imre, K., Morar, A., Ilie, M.S., Plutzer, J., Imre, M., Emil, T., Herbei, M. V., Dărbăuș, G., 2017. Survey of the Occurrence and Human Infective Potential of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in Wastewater and Different Surface Water Sources of Western Romania. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 17, 685–691.
- Itoh, N., Itagaki, T., Kawabata, T., Konaka, T., Muraoka, N., Saeki, H., Kanai, K., Chikazawa, S., Hori, Y., Hoshi, F., Higuchi, S., 2011. Prevalence of intestinal parasites and genotyping of *Giardia intestinalis* in pet shop puppies in east Japan. *Vet. Parasitol.* 176, 74–78.
- Euzeby, J., 1986. Protozoologie medicale comparée. Vol. 1, Généralités. Sarcomastigophores (Flagellés, Rhizopodes). Ciliés. Ed Collect. Fond. Marcel Mérieux- Lyon 463.
- Jarroll, E.L., Şener, K., 2003. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. *Drug Resist. Updat.* 6, 239–246.
- Jokelainen, P., Hebbelstrup Jensen, B., Andreassen, B.U., Petersen, A.M., Röser, D., Krogfelt, K.A., Nielsen, H.V., Stensvold, C.R., 2017. *Dientamoeba fragilis*, a Commensal in Children in Danish Day Care Centers. *J. Clin. Microbiol.* 55, 1707–1713.

- Júlio, C., Vilarés, A., Oleastro, M., Ferreira, I., Gomes, S., Monteiro, L., Nunes, B., Tenreiro, R., Ngelo, H., 2012. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasit Vectors* 5, 22.
- Kane, A.V., Ward, H.D., Keusch, G.T., Pereira, M.E., 1991. In vitro Encystation of *Giardia lamblia*: Large-Scale Production of In vitro Cysts and Strain and Clone Differences in Encystation Efficiency. *J. Parasitol.* 77, 974–981.
- Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health* 5, 1–38.
- Kim, J., Shin, M.H., Song, K.J., Park, S.J., 2009. Evaluation of α -tubulin as an antigenic and molecular probe to detect *Giardia lamblia*. *Korean J. Parasitol.* 47, 287–291.
- Koehler, A. V., Jex, A.R., Haydon, S.R., Stevens, M.A., Gasser, R.B., 2014. *Giardia*/giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol. Adv.* 32, 280–289.
- Kooyman, F.N.J., Wagenaar, J.A., Zomer, A., 2019. Whole-genome sequencing of dog-specific assemblages C and D of *Giardia duodenalis* from single and pooled cysts indicates host-associated genes. *Microb. Genomics* 5, e000302.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S.G., Zaidi, A.K.M., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omore, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio, S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M., Levine, M.M., 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *Lancet* 382, 209–222.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.
- Künstler, J., 1882. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. *Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie et Ses Filiales.* Paris 95, 347–349.
- Kutz, S.J., Dobson, A.P., Hoberg, E.P., 2009. Where are the Parasites? *Science.* 326, 1187–1188.

- Lalle, M., Bruschi, F., Castagna, B., Campa, M., Pozio, E., Cacciò, S.M., 2009. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 834–838.
- Lanfredi-Rangel, A., Diniz, J.A., De Souza, W., 1999. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. *Parasitol. Res.* 85, 951–955.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D.M., Sogin, M.L., 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int. J. Parasitol.* 40, 1063–1074.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D.M., Thompson, R.C.A., Steuart, R.F., Sogin, M.L., 2009. Genetic exchange within and between assemblages of *Giardia duodenalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56, 504–518.
- Lebbad, M., Ankarklev, J., Tellez, A., Leiva, B., Andersson, J.O., Svärd, S., 2008. Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. *Acta Trop.* 106, 44–53.
- Lebbad, M., Mattsson, J.G., Christensson, B., Ljungström, B., Backhans, A., Andersson, J.O., Svärd, S.G., 2010. From mouse to moose: Multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet. Parasitol.* 168, 231–239.
- Lebbad, M., Petersson, I., Karlsson, L., Botero-Kleiven, S., Andersson, J.O., Svenungsson, B., Svärd, S.G., 2011. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1262.
- Lee, G.C., Nam, S.H., Chae, J.C., Lee, C.H., 2009. *Giardia duodenalis*: Improved detection of viable cysts by reverse transcription-PCR of heat shock-inducible hsp70 gene. *Exp. Parasitol.* 123, 377–380.
- Lee, J.H., Lee, J., Park, S.J., Yong, T.S., Hwang, U.W., 2006. Detection and genotyping of *Giardia intestinalis* isolates using intergenic spacers(IGS)-based PCR. *Korean J. Parasitol.* 44, 343–353.
- Leitsch, D., Schlosser, S., Burgess, A., Duchêne, M., 2012. Nitroimidazole drugs vary in their mode of action in the human parasite *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2, 166–170.
- Levecke, B., Dorny, P., Geurden, T., Vercammen, F., Vercruysse, J., 2007. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Vet. Parasitol.* 148, 236–246.

- Liu, A., Yang, F., Shen, Y., Zhang, W., Wang, R., Zhao, W., Zhang, L., Ling, H., Cao, J., 2014. Genetic analysis of the *gdh* and *bg* genes of animal-derived *Giardia duodenalis* isolates in Northeastern China and evaluation of zoonotic transmission potential. *PLoS One* 9, e95291.
- Luján, H.D., Mowatt, M.R., Byrd, L.G., Nash, T.E., 1996. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7628–7633.
- Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B., Nash, T.E., 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine- rich repeats: Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J. Biol. Chem.* 270, 29307–29313.
- Luján, H.D., Mowatt, M.R., Nash, T.E., 1998. The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. *Parasitol. Today* 14, 446–450.
- Lyu, Z., Shao, J., Xue, M., Ye, Q., Chen, B., Qin, Y., Wen, J., 2018. A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcomastigophora: Hexamitidae) in hamsters. *Parasit Vectors* 11, 202.
- Ma, J., Feng, Y., Hu, Y., Villegas, E.N., Xiao, L., 2016. Human infective potential of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in urban wastewater treatment plant effluents. *J. Water Health* 14, 411–423.
- Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Ey, P.L., Chilton, N.B., 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology* 111, 11–17.
- Mergani, M.H., Mohammed, M.A., Khan, N., Bano, M., Khan, A.H., 2014. Detection of intestinal protozoa by using different methods. *Dent. Med. Res.* 2, 28–32.
- Mero, S., Kirveskari, J., Antikainen, J., Ursing, J., Rombo, L., Kofoed, P.E., Kantele, A., 2017. Multiplex PCR detection of *Cryptosporidium* sp, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* directly from dried stool samples from Guinea-Bissauan children with diarrhoea. *Infect. Dis. (Auckl)*. 49, 655–663.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L., 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infect. Genet. Evol.* 3, 29–38.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L., 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1135–1144.

- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Mackrill, J., Kulda, J., Isaac-Renton, J.L., 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitology* 44, 626–635.
- Monis, P.T., Caccio, S.M., Thompson, R.C.A., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 25, 93–100.
- Mostafi, J., Belghyti, D., El Kostali, M., Fatimi, N., Oulkheir, S., Taboz, Y., Arouya, K., 2011. Prévalence des parasitoses intestinales chez les enfants adressés pour coprologie parasitaire à l'hôpital Moulay Abdellah de Salé (Maroc). *World J. Biol. Res.* 4, 1–5.
- Mowatt, M.R., Luján, H.D., Cotten, D.B., Bowers, B., Yee, J., Nash, T.E., Stibbs, H.H., 1995. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol. Microbiol.* 15, 955–963.
- Muhsen, K., Cohen, D., Levine, M.M., 2014. Can *Giardia lamblia* infection lower the risk of acute diarrhea among preschool children? *J. Trop. Pediatr.* 60, 99–103.
- Muhsen, K., Levine, M.M., 2012. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin. Infect. Dis.* 55, (Suppl 4) S271-S293.
- Müller, J., Rout, S., Leitsch, D., Vaithilingam, J., Hehl, A., Müller, N., 2015. Comparative characterisation of two nitroreductases from *Giardia lamblia* as potential activators of nitro compounds. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5, 37–43.
- Nappier, S.P., Graczyk, T.K., Tamang, L., Schwab, K.J., 2010. Co-localized *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* Oysters differ in bioaccumulation, retention and depuration of microbial indicators and human enteropathogens. *J. Appl. Microbiol.* 108, 736–744.
- Nicolas, M., Perez, J.M., Carne, B., 2006. Diagnostic des parasitoses intestinales au CHU de la Guadeloupe : évolution de 1991 à 2003. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 99, 254–247.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., 2000. *Giardia* vaccination. *Parasitol.Today* 16, 213–217.
- Ordóñez-Mena, J.M., McCarthy, N.D., Fanshawe, T.R., 2018. Comparative efficacy of drugs for treating giardiasis: A systematic update of the literature and network meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 596–606.
- Ortega-Pierres, M.G., Argüello-García, R., 2019. *Giardia duodenalis*: Role of secreted molecules as virulent factors in the cytotoxic effect on epithelial cells. *Adv. Parasitol.* 106, 129–169.
- Paget, T.A., Macechko, P.T., Jarroll, E.L., 1998. Metabolic Changes in *Giardia intestinalis* during Differentiation. *J. Parasitol.* 84, 222–226.

- Palm, D., Weiland, M., McArthur, A.G., Winiecka-Krusnell, J., Cipriano, M.J., Birkeland, S.R., Pacocha, S.E., Davids, B., Gillin, F., Linder, E., Svärd, S., 2005. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 141, 199–207.
- Pan, W., Wang, M., Abdullahi, A.Y., Fu, Y., Yan, X., Yang, F., Shi, X., Zhang, P., Hang, J., Li, G., 2018. Prevalence and genotypes of *Giardia lamblia* from stray dogs and cats in Guangdong, China. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 13, 30–34.
- Pandey, P.K., Verma, P., Marathe, N., Shetty, S., Bavdekar, A., Patole, M.S., Stensvold, C.R., Shouche, Y.S., 2015. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect. Genet. Evol.* 31, 296–299.
- Peattie, D.A., Alonso, R.A., Hein, A., Caulfield, J.P., 1989. Ultrastructural Localization of Giardins to the Edges of Disk Microribbons of *Giardia Lamblia* and the Nucleotide and Deduced Protein Sequence of Alpha Giardin. *J. Cell Biol.* 109, 2323–2335.
- Piggott, M.P., Taylor, A.C., 2003. Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. *Aust. J. Zool.* 51, 341–355.
- Pipiková, J., Papajová, I., Majláthová, V., Šoltys, J., Bystrianska, J., Schusterová, I., Vargová, V., 2018. First report on *Giardia duodenalis* assemblage F in Slovakian children living in poor environmental conditions. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 53, 148–156.
- Platts-Mills, J.A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., Shakoor, S., 2018. Use of quantitative molecular diagnostic methods to investigate the effect of enteropathogen infections on linear growth in children in low-resource settings: longitudinal analysis of results from the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob. Heal.* 6, e1319–e1328.
- Platts-Mills, J.A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., McCormick, B.J.J., McGrath, M., Olortegui, M.P., Samie, A., Shakoor, S., 2015. Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: A multisite birth cohort study (MAL-ED). *Lancet Glob. Heal.* 3, e564–e575.
- Pons, W., Young, I., Truong, J., Jones-Bitton, A., McEwen, S., Pintar, K., Papadopoulos, A., 2015. A systematic review of waterborne disease outbreaks associated with small non-community drinking water systems in Canada and the United States. *PLoS One* 10, e0141646.

- Poulsen, C.S., Efunshile, A.M., Nelson, J.A., Stensvold, C.R., 2016. Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95, 175–179.
- Poulsen, C.S., Stensvold, C.R., 2016. Systematic review on *Endolimax nana*: a less well studied intestinal ameba. *Trop. Parasitol.* 6, 8–29.
- Poxleitner, M.K., Carpenter, M.L., Mancuso, J.J., Wang, C.J., Dawson, S.C., Cande, W.Z., 2008. Evidence for Karyogamy and Exchange of Genetic Material in the Binucleate Intestinal Parasite *Giardia intestinalis*. *Science*. 319, 1530–1533.
- Rafiei, A., Baghlaninezhad, R., Köster, P.C., Bailo, B., de Mingo, M.H., Carmena, D., Panabad, E., Beiromvand, M., 2020. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Southwestern Iran. A community survey. *PLoS One* 15, e0228317.
- Rebih, N., Boutaiba, S., Aboualchamat, G., Souttou, K., Hakem, A., Al Nahhas, S., 2020. Molecular and epidemiological characterization of *Giardia Intestinalis* assemblages detected in Djelfa, Algeria. *J. Parasit. Dis.* 44, 281–288.
- Rendtorff, R.C., 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites: II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg* 59, 209–220.
- Robertson, L.J., Lim, Y.A.L., 2011. Waterborne and environmentally-borne giardiasis. In: Lujan, H.D., Svard, S. (Eds.), *Giardia A Model Organism.*, Springer Wien, New York. 29–70.
- Robertson, L.J., 2014. Chapter Nineteen - *Giardia duodenalis*. *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*. Elsevier, London. 375–405
- Rogawski, E.T., Bartelt, L.A., Platts-Mills, J.A., Seidman, J.C., Samie, A., Havt, A., Babji, S., Trigos, D.R., Qureshi, S., Shakoor, S., Haque, R., Mduma, E., Bajracharya, S., Gaffar, S.M.A., Lima, A.A.M., Kang, G., Kosek, M.N., Ahmed, T., Svensen, E., Mason, C., Bhutta, Z.A., Lang, D.R., Gottlieb, M., Guerrant, R.L., Houpt, E.R., Bessong, P.O., 2017. Determinants and impact of *Giardia* infection in the first 2 years of life in the MAL-ED birth cohort. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 6, 153–160.
- Rose, J.B., Slifko, T.R., 1999. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods: A review. *J. Food Prot.* 62, 1059–1070.
- Rousseau, A., La Carbona, S., Dumètre, A., Robertson, L.J., Gargala, G., Escotte-Binet, S., Favennec, L., Villena, I., Gérard, C., Aubert, D., 2018. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Toxoplasma gondii*: A review of methods. *Parasite* 25, 14.

- Rudohradská, P., Halánová, M., Ravaszová, P., Goldová, M., Valenčáková, A., Halán, M., Papajová, I., Pohorencová, A., Valko, J., Čisláková, L., Juriš, P., 2012. Prevalence of intestinal parasites in children from minority group with low hygienic standards in Slovakia. *Helminthologia* 49, 63–66.
- Ryan, U., Cacciò, S.M., 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* 43, 943–956.
- Ryan, U., Hijjawi, N., Feng, Y., Xiao, L., 2019. *Giardia*: an under-reported foodborne parasite. *Int. J. Parasitol.* 49, 1–11.
- Ryan, U., Paparini, A., Oskam, C., 2017. New Technologies for Detection of Enteric Parasites. *Trends Parasitol.* 33, 532–546.
- Ryan, U., Zahedi, A., 2019. Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. *Advances in Parasitology*. 106: 209-254.
- Saaed, F.M.A., Ongerth, J.E., 2019. *Giardia* and *Cryptosporidium* in children with diarrhea, Kufra, Libya, a North African migration route city. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222, 840–846.
- Salehi, R., Haghighi, A., Stensvold, C.R., Kheirandish, F., Azargashb, E., Raeghi, S., Kohansal, C., Bahrami, F., 2017. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* isolated from humans in Ahvaz, Southwestern Iran. *Gastroenterol. Hepatol. from Bed to Bench* 10, 235–241.
- Sánchez, C., López, M.C., Galeano, L.A., Qvarnstrom, Y., Houghton, K., Ramírez, J.D., 2018. Molecular detection and genotyping of pathogenic protozoan parasites in raw and treated water samples from southwest Colombia. *Parasit Vectors* 11, 563.
- Savioli, L., Smith, H., Thompson, A., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative.” *Trends Parasitol.* 22, 203–208.
- Scalia, L.A.M., Fava, N.M.N., Soares, R.M., Limongi, J.E., da Cunha, M.J.R., Pena, I.F., Kalapothakis, E., Cury, M.C., 2016. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Brazilian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 343–349.
- Scanlan, P.D., Hill, C.J., Ross, R.P., Ryan, C.A., Stanton, C., Cotter, P.D., 2018. The intestinal protist *Blastocystis* is not a common member of the healthy infant gut microbiota in a Westernized country (Ireland). *Parasitology* 145, 1274–1278.
- Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G.H.J., De Vos, W.M., O’Toole, P.W., Cotter, P.D., 2014. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 326–330.

- Schuurman, T., Lankamp, P., van Belkum, A., Kooistra-Smid, M., van Zwet, A., 2007. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. Clin. Microbiol. Infect. 13, 1186–1191.
- Shaker, D., Anvari, D., Hosseini, S.A., Fakhar, M., Mardani, A., Ziaei Hezarjaribi, H., Gholami, Sara, Gholami, Shirzad, 2019. Frequency and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes among patients attending to health centers in Mazandaran, northern Iran. J. Parasit. Dis. 43, 537–543.
- Shane, A.L., Mody, R.K., Crump, J.A., Tarr, P.I., Steiner, T.S., Kotloff, K., Langley, J.M., Wanke, C., Warren, C.A., Cheng, A.C., Cantey, J., Pickering, L.K., 2017. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. Clin. Infect. Dis. 65, e45–e80.
- Shehata, A.I., Hassanein, F., 2015. Intestinal parasitic infections among mentally handicapped individuals in Alexandria, Egypt. Ann. Parasitol. 61, 275–281.
- Shields, J.M., Gleim, E.R., Beach, M.J., 2008. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia intestinalis* in swimming pools, Atlanta, Georgia. Emerg. Infect. Dis. 14, 948–950.
- Singer, S.M., Fink, M.Y., Angelova, V. V., 2019. Recent insights into innate and adaptive immune responses to *Giardia*. Advances in Parasitology 106:171-208.
- Smith, H. V., Cacciò, S.M., Cook, N., Nichols, R.A.B., Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. Vet. Parasitol. 149, 29–40.
- Soares, R., Tasca, T., 2016. Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. J. Microbiol. Methods 129, 98–102.
- Sprong, H., Cacciò, S.M., Van Der Giessen, J.W.B., 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e558.
- Squire, S.A., Ryan, U., 2017. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. Parasit Vectors 10, 195.
- Stensvold, C.R., Nielsen, H.V., 2012. Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. J. Clin. Microbiol. 50, 540–541.
- Štrkolcová, G., Madár, M., Hinney, B., Goldová, M., Mojžišová, J., Halánová, M., 2015. Dog's genotype of *Giardia duodenalis* in human: First evidence in Europe. Acta Parasitol. 60, 796–799.

- Stuart, J.M., Orr, H.J., Warburton, F.G., Jeyakanth, S., Pugh, C., Morris, I., Sarangi, J., Nichols, G., 2003. Risk factors for sporadic giardiasis: A case-control study in Southwestern England. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 229–233.
- Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M., Das, P., Lal, A.A., Xiao, L., 2003. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1444–1452.
- Sun, C.H., McCaffery, J.M., Reiner, D.S., Gillin, F.D., 2003. Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 21701–21708.
- Svärd, S.G., Hagblom, P., Palm, J.E.D., 2003. *Giardia lamblia* - A model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 3–7.
- Szostakowska, B., Kruminis-Lozowska, W., Racewicz, M., Knight, R., Tamang, L., Myjak, P., Graczyk, T., 2004. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a landfill. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3742–3744.
- Thompson, R.C.A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* 126, 15–35.
- Thompson, R.C.A., 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* 30, 1259–1267.
- Thompson, R.C.A., Ash, A., 2019. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections – What’s new? *Infect. Genet. Evol.* 75, 103951.
- Thompson, R.C.A., Ash, A., 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect. Genet. Evol.* 40, 315–323.
- Thompson, R.C.A., Kutz, S.J., Smith, A., 2009. Parasite zoonoses and wildlife: Emerging issues. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 678–693.
- Thompson, R.C.A., Monis, P., 2012. *Giardia*-From Genome to Proteome. *Advances in Parasitology.* 78: 57-95.
- Thompson, R.C.A., Monis, P.T., 2004. Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* 58, 69–137.
- Thompson, R.C.A., Smith, A., 2011. Zoonotic enteric protozoa. *Vet. Parasitol.* 182, 70–78.
- Thurston-Enriquez, J.A., Watt, P., Dowd, S.E., Enriquez, R., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J. Food Prot.* 65, 378–382.
- Timothy B. Gardner and David R. Hill., 2001. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 114–128.

- Traub, R.J., Monis, P.T., Robertson, I., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C.A., 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology* 128, 253–262.
- Travaillé, E., La Carbona, S., Gargala, G., Aubert, D., Guyot, K., Dumètre, A., Villena, I., Houssin, M., 2016. Development of a qRT-PCR method to assess the viability of *Giardia intestinalis* cysts, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* oocysts. *Food Control* 59, 359–365.
- Tsui, C.K.-M., Miller, R., Uyaguari-Diaz, M., Tang, P., Chauve, C., Hsiao, W., Isaac-Renton, J., Prystajec, N., 2018. Beaver Fever: Whole-Genome Characterization of Waterborne Outbreak and Sporadic Isolates To Study the Zoonotic Transmission of Giardiasis. *mSphere* 3, 1–17.
- Tysnes, K.R., Robertson, L.J., 2016. Establishment of Canine-Derived *Giardia duodenalis* Isolates in Culture. *J. Parasitol.* 102, 342–348.
- Mathan, V.I., 1998. Diarrhoeal Diseases. *Br. Med. J.* 54, 407–419.
- Vanni, I., Cacciò, S.M., van Lith, L., Lebbad, M., Svärd, S.G., Pozio, E., Tosini, F., 2012. Detection of *Giardia duodenalis* Assemblages A and B in Human Feces by Simple, Assemblage-Specific PCR Assays. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1776.
- Verweij, J.J., Blange, R.A., Templeton, K., Schinkel, J., Brien, E.A.T., Rooyen, M.A.A. Van, Lieshout, L. Van, Polderman, A.M., 2004. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1220–1223.
- Von Huth, S., Kofoed, P.E., Holmskov, U., 2019. Prevalence and potential risk factors for gastrointestinal parasitic infections in children in urban Bissau, Guinea-Bissau. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 113, 545–554.
- Wang, A., Ruch-Gallie, R., Scorza, V., Lin, P., Lappin, M.R., 2012. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in dog park attending dogs compared to non-dog park attending dogs in one region of Colorado. *Vet. Parasitol.* 184, 335–340.
- Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N.D., Engel, J.C., Franklin, C., McKerrow, J.H., 1997. A primitive enzyme for a primitive cell: The protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* 89, 437–444.
- Watkins, R.R., Eckmann, L., 2014. Treatment of giardiasis: Current status and future directions topical collection on intra-abdominal infections, hepatitis, and gastroenteritis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 16, 396.

- Wegayehu, T., Karim, M.R., Erko, B., Zhang, L., Tilahun, G., 2016a. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from calves in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. *Infect. Genet. Evol.* 43, 281–288.
- Wegayehu, T., Karim, M.R., Li, J., Adamu, H., Erko, B., Zhang, L., Tilahun, G., 2016b. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from children in Oromia Special Zone, central Ethiopia. *BMC Microbiol.* 16, 89.
- Wielinga, C., Ryan, U., Andrew Thompson, R.C., Monis, P., 2011. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. *Int. J. Parasitol.* 41, 495–503.
- Wielinga, C.M., Thompson, R.C.A., 2007. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* 134, 1795–1821.
- World Health Organization (WHO), 2017. Guidelines for drinking-water quality, incorporating the first addendum: Microbiological agents in drinking water, 4th edn. WHO, Geneva.
- Yoder, J.S., Gargano, J.W., Wallace, R.M., Beach, M.J., 2012. Giardiasis Surveillance — United States , 2009 – 2010. *MMWR Surveill. Summ.* 61, 13-23.
- Yong, T., Han, K., Yang, H., Park, S.J., 2002. PCR-RFLP analysis of *Giardia intestinalis* using a *Giardia*-specific gene, GLORF-C4. *Parasite* 9, 65–70.
- Yu, L.Z., Birky, C.W., Adam, R.D., 2002. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryot. Cell* 1, 191–199.
- Zahedi, A., Field, D., Ryan, U., 2017. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland - First report of assemblage E. *Parasitology* 114, 1154–1161.

Abstract:

Giardia intestinalis is one of the most common causes of parasite-induced diarrhea, abdominal pain, flatulence and malabsorption and comprises several genotypes (assemblages A through H). In most areas of Africa, the molecular epidemiology of giardiasis remains unclear. Two studies were carried out, the first carried out between 2012 and 2013 in the Western part of Algiers, Algeria, which involved a total of 2054 individuals outpatient clinics or hospitalized at Beni-Messous University Hospital of Algiers. Stool microscopy examination was performed for ova and parasites. The second study was carried out from 2013 to 2018 across four hospitals in Algeria. A total of 119 fecal samples from 55 children, 37 adults, and 27 individuals of undetermined age, all scored positive for intestinal parasites by microscopy, were underwent molecular analysis by real-time PCR for the search for *Giardia* DNA. Molecular characterization of *Giardia* was performed by assemblage-specific PCR and PCR using primers targeting the triose phosphate isomerase gene (*tpi*). The overall parasite infection rate in the first study was 28%. Out of 567 parasite-positive samples, *Blastocystis* was most frequently identified (57.3%), followed by *Endolimax nana* (41.0%), *Entamoeba histolytica/dispar* (19.6%), *G. intestinalis* (17.1%), *Entamoeba coli* (13.9%), *Chilomastix mesnili* (1.0%), *Iodamoeba bütschlii* (0.7%), *Entamoeba hartmanni* (0.5%) and *Cryptosporidium* spp. (0.2%). Intestinal parasites were generally more common in adult population than in children except for *Giardia*, which was more common in children ($P = 0.0001$); carriage of *Giardia* was independent of gender ($P = 0.94$). Compared with other intestinal parasitic infections, clinical manifestations such as abdominal pain ($P = 0.28$) and diarrhea ($P = 0.82$) were found not to be significantly linked to *Giardia* infection. The second study revealed 67% (80/119) of the samples were *Giardia*-positive by real-time PCR. For 48 moderately-highly real-time PCR-positive samples, *tpi* genotyping assigned 22 samples to Assemblage A and 26 to Assemblage B. The cycle threshold values of the samples stored in potassium dichromate (2.5%) were significantly lower than those stored in ethanol (70%) ($P < 0.001$). Contrary to Assemblage A, Assemblage B exhibited substantial genetic diversity and allelic heterozygosity. Assemblage-specific PCR proved to be specific for discriminating Assemblage A or B but not as sensitive as *tpi* genotyping.

In conclusion, *Giardia intestinalis* is common particularly so in children. However, intestinal symptoms appeared not to be more linked to *Giardia* than to other intestinal parasites. We confirm that real-time PCR is more sensitive for detecting *Giardia* in stool samples by microscopy, similarly, amplification and robust sequencing of the *tpi* gene is achievable by real-time PCR assay on moderately to strongly positive samples. This study is one of the few performed in Africa providing genotyping data on *Giardia* infections in humans. Both assemblages A and B were commonly seen and not associated with specific sociodemographic data.

Key words: *Giardia intestinalis*, Intestinal parasites, Molecular epidemiology, Prevalence, Clinical manifestations, Risk factors, allelic sequence heterozygosity (ASH), real-time PCR.

Résumé :

Giardia intestinalis est l'une des causes les plus fréquentes de diarrhée, de douleurs abdominales, de flatulences et de malabsorption induites par les parasites et comprend plusieurs génotypes (assemblages A à H). Dans la plupart des régions d'Afrique, l'épidémiologie moléculaire de la giardiose reste incertaine. Deux études ont été menées, la première menée entre 2012 et 2013 dans la partie Ouest d'Alger qui a porté sur un total de 2054 individus issus des consultations cliniques à titre externe ou pour certains hospitalisés à l'hôpital universitaire Beni-Messous d'Alger. Une recherche microscopique a été réalisée pour identifier les ovules et les parasites entiers. La seconde étude a été réalisée de 2013 à 2018 dans quatre hôpitaux en Algérie. Un total de 119 échantillons fécaux issus de 55 enfants, 37 adultes et 27 individus d'âge indéterminé, révélés positifs vis à vis des parasites intestinaux par microscopie, ont subi des analyses moléculaires par le test PCR en temps réel pour la recherche de l'ADN de *Giardia*. La caractérisation moléculaire de *Giardia* a été réalisée par PCR spécifiques à l'assemblage et par PCR utilisant des amorces ciblant le gène du triose phosphate isomérase (*tpi*). Le taux global d'infection parasitaire dans la première étude était de 28%. Sur un total de 567 échantillons parasitaires positifs, *Blastocystis* était le plus fréquemment identifié (57.3%), suivi par *Endolimax nana* (41.0%), *Entamoeba histolytica* / *dispar* (19.6%), *G. intestinalis* (17.1%), *Entamoeba coli* (13,9%), *Chilomastix mesnili* (1.0%), *Iodamoeba bütschlii* (0.7%), *Entamoeba hartmanni* (0.5%) et *Cryptosporidium* spp. (0.2%). Les parasites intestinaux étaient généralement plus fréquents chez la population adulte que chez les enfants, à l'exception de *Giardia*, qui était plus fréquent chez les enfants ($P = 0,0001$). Le portage de *Giardia* n'était pas associé au facteur sexe ($P = 0.94$). En comparaison à d'autres infections parasitaires intestinales, les manifestations cliniques telles que les douleurs abdominales ($P = 0.28$) et la diarrhée ($P = 0.82$) n'ont pas été significativement liées à l'infection par *Giardia*. La seconde étude a montré que 67% (80/119) des échantillons étaient positifs vis à vis de *Giardia* par le test PCR en temps réel. Sur un total de 48 échantillons PCR en temps réel moyennement-hautement positifs, le génotypage *tpi* a attribué 22 échantillons à l'Assemblage A et 26 à l'Assemblage B. Les valeurs de seuil de cycle des échantillons stockés dans le bichromate de potassium (2.5%) étaient significativement inférieures à celles stockées dans de l'éthanol (70%) ($P < 0.001$). Contrairement à l'Assemblage A, l'Assemblage B présentait une diversité génétique substantielle et une hétérozygotie allélique. La PCR spécifique à l'assemblage s'est avérée spécifique pour discriminer l'assemblage A ou B, mais pas aussi sensible que le génotypage *tpi*. En conclusion, *Giardia intestinalis* est plus fréquent chez les enfants. Cependant, les symptômes intestinaux ne semblaient pas être plus liés à *Giardia* qu'à d'autres parasites intestinaux. Nous confirmons que la PCR en temps réel est plus sensible pour la détection de *Giardia* dans les selles par microscopie, de même, une amplification et un séquençage robuste du gène *tpi* sont réalisables par le test PCR en temps réel sur des échantillons modérément à fortement positifs. Enfin, cette étude est l'une des rares réalisées en Afrique à fournir des données sur le génotypage de *Giardia* chez l'homme. Les deux assemblages A et B étaient couramment observés et non-associés à des données sociodémographiques spécifiques.

Mots clés : *Giardia intestinalis*, Parasites intestinaux, Epidémiologie moléculaire, Prévalence, Manifestations cliniques, Facteurs de risque, Hétérozygotie de séquence allélique (ASH), PCR en temps réel.

Prevalence and Clinical Manifestations of *Giardia intestinalis* and Other Intestinal Parasites in Children and Adults in Algeria

Salem Belkessa,^{1,2,3} Elhosseyn Ait-Salem,¹ AbdElkarim Laatamna,⁴ Karim Houali,¹ Ute Wolff Sönksen,³ Ahcene Hakem,^{4,5} Zahida Bouchene,⁶ Farida Ghalimi,⁷ and Christen Rune Stensvold^{3*}

¹Department of Biochemistry and Microbiology, Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Tizi Ouzou, Algeria; ²Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences, Mohamed Khider University of Biskra, Biskra, Algeria; ³Department of Bacteria, Parasites and Fungi, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark; ⁴Laboratory of Exploration and Valorisation of Steppe Ecosystems, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Djelfa, Djelfa, Algeria; ⁵Center Research in Agropastoralism, Djelfa, Algeria; ⁶Faculty of Medicine, University of Algiers, Algiers, Algeria; ⁷Higher National Veterinary School of Algiers, Algiers, Algeria

Abstract. *Giardia intestinalis* is one of the most common causes of parasite-induced diarrhea, abdominal pain, flatulence, and malabsorption. Yet, data on the epidemiology of *G. intestinalis* infections in North Africa are limited. The purpose of this study was to carry out a retrospective survey on the level of intestinal parasitism with a particular emphasis on *G. intestinalis* in children and adults in Algiers, Algeria. A total of 2,054 individuals from outpatient clinics or hospitalized at Beni-Messous University Hospital of Algiers undergoing stool microscopy for ova and parasites were included. The overall parasite infection rate was 28%. In the 567 parasite-positive samples, *Blastocystis* was found most frequently (57.3%), followed in frequency by *Endolimax nana* (41.0%), *Entamoeba histolytica/dispar* (19.6%), *G. intestinalis* (17.1%), *Entamoeba coli* (13.9%), *Chilomastix mesnili* (1.0%), *Iodamoeba bütschlii* (0.7%), *Entamoeba hartmanni* (0.5%), and *Cryptosporidium* spp. (0.2%). Intestinal parasites were generally more common in adults than in children, except for *Giardia*, which was more common in children ($P = 0.0001$). *Giardia* infection was independent of gender ($P = 0.94$). Compared with other intestinal parasitic infections, clinical manifestations, such as abdominal pain ($P = 0.28$) and diarrhea ($P = 0.82$), were found not to be significantly linked to *Giardia* infection. In conclusion, *G. intestinalis* is common in individuals referred to the University Hospital of Beni-Messous with digestive symptoms, particularly so in children. However, in our study, intestinal symptoms appeared not to be more linked to *Giardia* than to other intestinal parasites.

INTRODUCTION

Infections due to intestinal protozoa take a toll on public health, especially in low- and middle-income countries in tropical and subtropical regions.¹

Giardia intestinalis (syn. *Giardia lamblia* and *Giardia duodenalis*) is a protozoan intestinal parasite, which can infect various mammalian hosts, including humans, wildlife, livestock, and companion animals.² The prevalence of *Giardia* infection varies from approximately 2–5% in the industrialized world³ to 20–30% in low- and middle-income countries,^{4,5} with children typically being more frequently infected than adults.⁶ Owing to the elevated burden of *G. intestinalis*-related illnesses in developing countries, its impact on developmental and socioeconomic improvements, and its close connection with poverty, this parasite has been included in the WHO's Neglected Diseases Initiative since 2004.^{7–9}

Giardia transmission typically occurs following ingestion of infectious cysts via the consumption of contaminated food or water or through a direct fecal–oral route. The clinical manifestations of *G. intestinalis* infection vary and can range from acute to chronic infections, whereas some carriers may remain/become asymptomatic. When present, the clinical signs of infection may include diarrhea, nausea, weight loss, bloating, and abdominal pain.^{10,11} In addition to provoking acute symptoms, *Giardia* has been associated with long-term postinfectious sequelae, including functional gastrointestinal disorders, failure to thrive, chronic fatigue syndrome, arthritis, ocular pathology, and cognitive impairment in children.¹² Many factors contribute to the variation observed in clinical

manifestations, including the virulence of the parasite strain, the number of cysts ingested, the age of the host, and the state of the immune system at the time of infection.¹³ Much of our knowledge on infection risk factors has been derived from outbreak investigations, whereas only few studies have addressed risk factors for endemic or sporadic giardiasis.^{14–17} Insight into the epidemiology of *Giardia* infection is critical to developing effective preventive strategies and activities. However, in the entire area of North Africa, only a limited number of studies have been carried out, and these tend to report only on the prevalence, without focusing on clinical manifestations and epidemiological characteristics of giardiasis in children and adults and investigating factors that influence the distribution of *G. intestinalis* in this area (Table 1). The scope of the current study was to elucidate the epidemiology and clinical significance of *G. intestinalis* infections in the area of Algiers, Algeria, by identifying the prevalence of *Giardia* infection and comparing sociodemographic and clinical data of *Giardia*-infected individuals with those pertaining to individuals infected by other intestinal parasitic protists.

MATERIALS AND METHODS

Study population and sample collection. A community-based cross-sectional descriptive study was performed between September 2012 and October 2013 in the western part of Algiers, Algeria. Consecutive stool samples were collected from 1) outpatients who came and went the same day after providing a sample, and 2) individuals hospitalized for various medical conditions. For parasite-positive patients, epidemiological information was provided either by using a questionnaire or from medical records. No epidemiological information was available for the parasite-negative individuals.

* Address correspondence to Christen Rune Stensvold, Department of Bacteria, Parasites and Fungi, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, Copenhagen 2300, Denmark. E-mail: run@ssi.dk

TABLE 1
Prevalence of *Giardia intestinalis* in humans reported in North African countries

	Giardia prevalence (%)	Population size	Study population	Study period	Age range of study population (years)	Diagnostic method(s) used	Reference
Algeria (Algiers)	4.7	2,054	Inpatients and outpatients	September 2012–October 2013	1 to ≤ 90	Direct microscopy and formol-ether concentration technique	Present study
Algeria (Oran)	3.6	1,042	Patients with digestive disorders	December 2010–November 2011	≤ 80	Direct wet mount and formol-ether concentration technique	Ref. 24
Algeria (Boufarik)	41.67	542	Sporadic cases	March–October 2011	≤ 75	Direct microscopy examination and iodine staining	Ref. 44
Egypt	38	185	Outpatients with a variety of gastrointestinal and non-gastrointestinal symptoms	Not stated	2–58	Microscopic examination after centrifugation associated with iodine staining and immunoassay (ELISA)	Ref. 43
Egypt	8.5	200	Mentally handicapped individuals	December 2012–November 2013	< 10 to ≥ 20	Trichrome staining (without concentration)	Ref. 28
Egypt	3.8	346	Municipality solid-waste workers	January and April 2013	21–59	Formol-ether concentration technique	Ref. 48
Egypt	24.2	330	Individuals with or without symptoms	January 2010–January 2011	All ages	Direct wet smear method, Sheather's sugar flotation, acid ether sedimentation technique, and lugol staining	Ref. 49
Libya	1.3	305	Individuals with diarrhea	October 2011 –July 2012	Not specified	Direct microscopy under normal saline, iodine, and eosin stains, and four concentration methods (formalin-ether, normal saline sedimentation, zinc sulfate, and Sheather's sugar flotation)	Ref. 26
Libya	26.3	505	Children with diarrhea	September 2013–June 2014	2–17	Immunofluorescence assay including DAPI*	Ref. 29
Libya	1.3	239	Children with diarrhea	February 2008–October 2008	≤ 5	Enzyme-immunoassays (EIAs)	Ref. 50
Tunisia (Sfax)	48	3,025	Hospitalized patients in pediatric services	December 1980–November 1990	≤ 10	Direct microscopy under physiological water and lugol, and formol-ether concentration technique and Willis technique with MIF†	Ref. 22
Tunisia	1.48	20,033	Not stated	January 1996–December 2012	Not stated	Direct microscopy, formol-ether concentration technique, and Baermann method	Ref. 51
Morocco (Settat)	11.7	333	Individuals using raw sewage waters in agriculture	Not stated	3–60	Direct microscopy, concentration technique of Baillenger	Ref. 52
Morocco (Beni-Mellal)	34.3	1,343	Children	January–March 1999	≤ 12	Direct microscopy and formol-ether concentration technique	Ref. 53
Morocco (Center of health El Idrissi, Kenitra)	22.7	4,285	Population living in Kenitra and suburbs	1996–2005	< 18 and ≥ 18	Direct microscopy and lugol staining	Ref. 25
Morocco (Tetouan)	19.8	673	Children (urban and rural)	May 2012–June 2013	5–14	Lugol staining, Faust's and Ritchie's concentration methods, and molecular analysis	Ref. 30

* DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole fluorescent stain.

† MIF = merthiolate-iodo-formol stain.

Fresh fecal samples were collected from each patient in a labeled and sterile container. Informed written consent was provided for children involved in the study by parents or guardians. A single stool sample from each study individual was examined by microscopy for the presence of intestinal parasites. All samples testing positive for *Giardia* were stored at 4°C in 2.5% (w/v) potassium dichromate solution for subsequent DNA extraction and molecular analyses (these data are not included in the present article). Individuals aged 15 years or older were considered adults.

Questionnaires. Parasite-positive individuals enrolled in the study completed a structured questionnaire with the purpose to collect data pertaining to epidemiological characteristics such as age, gender, and symptoms possibly related to intestinal parasitic infections such as diarrhea, nausea, vomiting, abdominal pain, anal pruritus, paleness, failure to thrive, and fever. Diarrhea was defined as the voiding of three or more unformed stools within a 24-h period.¹⁸

Sample processing. Stool samples were examined by the naked eye for color, consistency, and the presence of helminths, and subsequently examined by direct microscopy using Ritchie's modified concentration technique.¹⁹ A small amount of stool (commensurate to the size of a pea) was mixed with 7 mL of 10% formalin solution and sieved through double-layered gauze and collected in a beaker. Next, the suspension was transferred into a 15-mL centrifuge tube and topped up with 3 mL of diethyl ether. Afterward, we capped the centrifuge tube and mixed the suspension by shaking before centrifuging for 3 minutes at 1,500 rpm. The top three layers (ether, debris, and formalin) were removed, whereas the sediment was retained. Wet mounts of each fresh concentrate fecal sample were prepared in saline and iodine, and observed by light microscopy for parasite eggs, cysts, and trophozoites using $\times 100$ and $\times 400$ magnification. Also, a permanently stained slide was prepared for each sample using modified Ziehl-Neelsen staining for the detection of *Cryptosporidium* spp.²⁰ and other protozoan oocysts.

Statistical analysis. Data were entered in Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA), and statistical analysis was performed using Statistica 6.0 (Tibco Software Inc., Palo Alto, CA) software adapted to epidemiology. The χ^2 -square test was used to test differences in parasite prevalence according to age-group, gender, and symptoms (diarrhea, nausea, fever, and gastrointestinal complaints). Probability (*P*) values were calculated with an alpha risk = 5% for a CI of 95%. A difference was considered significant when the *P*-value was < 0.05.

RESULTS

A total of 2,054 individuals were tested. Altogether, 567 of the samples (27.6%) from 543 outpatients and 24 inpatients were scored as parasite positive by microscopy for ova and parasites. Of these patients, 297 were males and 270 females: 239 were children (less than 15 years old) and 255 were adults (Table 2). For 121 of the parasite-positive individuals, no exact age could be established, but for 16 of these, the age was < 15 years, and for 32, the age was known to be ≥ 15 years. For the 494 individuals with specific age information, the age range was 1–90 years (median age, 15 years; interquartile range = 6–39).

Parasites frequently observed included *Blastocystis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *G. intestinalis*,

and *Entamoeba coli*, with observed overall prevalence rates of 15.8%, 11.3%, 5.4%, 4.7%, and 3.8%, respectively. *Entamoeba hartmanni*, *Cryptosporidium* spp., *Chilomastix mesnili*, and *Iodamoeba bütschlii* were all detected in very few cases, with overall observed prevalences of less than 1% for each (Table 2).

Of the 97 *Giardia*-infected individuals, almost two-thirds (62/97, 63.9%) were children aged 1–10 years. Among parasite-positive adults, the proportion of *Giardia*-infected individuals was 5.5% compared with 27.5% among parasite-positive children (*P* < 0.0001; Table 2). Among the 239 parasite-positive children, cases of *Giardia* appeared to decrease by age: among toddlers (children aged 1–3 years of age), the proportion was 40.7%; it remained relatively high in children aged 4–6 and 7–10 years (33.8% and 29.5%, respectively), but decreased to the level of adults in children aged 11–15 years (4.7%).

The most common parasite in adults was *Blastocystis* (64.7%), followed in frequency by *E. nana* (48.6%) and species of *Entamoeba* (16.9–18.8%). Also, in parasite-positive children, *Blastocystis* was most common (48.8%), mainly in children aged 11–15 years, followed by *E. nana* (35.4%) and *G. intestinalis* (27.5%). *Blastocystis* and *E. nana* were more commonly detected in adults than in children (*P* = 0.0006 and *P* = 0.0044, respectively; Table 2). For the remaining parasites found, there was no association between age and occurrence. A link between gender and parasitism rate could not be identified for any of the species (Table 2).

In 65/97 (66.9%) of the *Giardia* cases, *Giardia* was the only parasite detected (Table 3); in the remaining 32 cases, one or more other parasites were also detected. Unsurprisingly, *Blastocystis* and *E. nana* were the parasites most often associated with *Giardia* (12 and eight cases, respectively). The level of coinfection was quite similar across all age-groups.

Of 567 parasite-positive individuals, 104 (18.3%) were symptomatic, whereas the remaining 463 (81.7%) were non-symptomatic. The most commonly reported symptoms were abdominal pain and diarrhea, reported in 56/567 (9.9%) and 35/567 (6.2%) in parasite-positive cases, respectively (Table 4). Of note, for 62/65 (95.4%) cases with *Giardia* mono-infections, no diarrhea was reported. Similarly, even for cases where *Giardia* was observed with other parasites, diarrhea was reported only in 6.3% (Table 3); thus, only five samples (three with *Giardia* only and two with *Giardia* + *Blastocystis* and *Giardia* + *E. nana*, respectively) could be linked to diarrheal episodes (Tables 3 and 4). In fact, when comparing the 35 reports on diarrhea, 30 of these cases were positive for parasites other than *Giardia*, namely, *Blastocystis* (48.6%; 17/35), *E. nana* and *E. histolytica/dispar* (31.4%; 11/35% and 28.6%; and 10/35, respectively), *C. mesnili*, and *Cryptosporidium* spp. (2.9%; 1/35 of each).

The total number of *Giardia*-positive cases reporting symptoms was 21. When reviewing all reports on gastrointestinal symptoms, none of these were more common in individuals testing positive for *Giardia* than in individuals testing positive for other parasites (Table 4).

DISCUSSION

The overall prevalence of intestinal parasitism in the present study (27.6%) is in agreement with data reported previously from North African countries,^{21–23} where rates of intestinal

TABLE 2
Distribution of intestinal parasites among parasite-positive individuals (N = 567) according to age and gender in the current study

	Age range (years),* n (%)						Gender					
	(1-3) (n = 54)	(4-6) (n = 65)	(7-10) (n = 61)	(11-15) (n = 43)	Individuals aged < 15 years (n = 239)	Individuals aged ≥ 15 years (n = 256)	Total of individuals with neither exact nor approximated age (n = 73)	Total/overall prevalence (%) (n = 567)	Level of statistical significance for prevalence differences between children and adults† (P-value)	Prevalence in females (n = 270), n (%)	Prevalence in males (n = 297), n (%)	Level of statistical significance for prevalence differences between genders† (P-value)
<i>Giardia</i> <i>intestinalis</i>	22 (40.7)	22 (33.8)	18 (29.5)	2 (4.7)	66 (27.5)	14 (5.5)	17 (23.3)	97 (17.1)	P < 0.0001*	47 (17.4)	50 (16.8)	P = 0.94
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	1 (1.5)	0	0	1 (0.4)	0	0	1 (0.2)	P = 0.97	0	1 (0.3)	P = 0.33
<i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i> / <i>dispar</i>	12 (22.2)	13 (20.0)	12 (19.7)	11 (25.6)	50 (20.8)	48 (18.8)	13 (17.8)	111 (19.6)	P = 0.63	56 (20.7)	55 (18.5)	P = 0.57
<i>Entamoeba coli</i>	5 (9.2)	7 (10.7)	9 (14.8)	3 (7.0)	27 (11.3)	43 (16.9)	9 (12.3)	79 (13.9)	P = 0.1	35 (13.0)	44 (14.8)	P = 0.60
<i>Entamoeba hartmanni</i>	0	1 (1.5)	0	1 (2.3)	2 (0.8)	1 (0.4)	0	3 (0.5)	P = 0.95	1 (0.4)	2 (0.7)	P = 0.61
<i>Iodamoeba bütschlii</i>	1 (1.9)	0	0	1 (2.3)	1 (0.4)	2 (0.8)	1 (1.4)	4 (0.7)	P = 0.60	1 (0.4)	3 (1.0)	P = 0.68
<i>Endolimax nana</i>	13 (24.0)	25 (38.4)	16 (26.2)	27 (62.8)	85 (35.4)	124 (48.6)	23 (31.5)	233 (41.0)	P = 0.0044*	104 (38.5)	129 (43.4)	P = 0.27
<i>Chilomastix mesnili</i>	0	0	1 (1.6)	1 (2.3)	3 (1.3)	2 (0.8)	1 (1.4)	6 (1.0)	P = 0.94	2 (0.7)	4 (1.3)	P = 0.76
<i>Blastocystis hominis</i>	24 (44.4)	27 (41.5)	32 (52.5)	24 (55.8)	117 (48.8)	165 (64.7)	43 (59.0)	325 (57.3)	P = 0.0006*	158 (58.5)	167 (56.2)	P = 0.64

*It should be noted that there were 121 individuals whose age was not specifically reported; however, 32 of these were adults and therefore included in the group of individuals aged ≥ 15 years, and 16 were children who were included in the group of individuals aged < 15 years. Individuals younger than 15 years were considered as children.

† P > 0.05 = Not statistically significant; P < 0.05 = statistically significant.

TABLE 3
Repartition of coinfection cases involving *G. intestinalis* and other protozoan species by age range and presence of diarrhea

Infection by <i>G. intestinalis</i>	Age range (years)						Presence/absence of diarrhea	
	(1–3)	(4–6)	(7–10)	(11–15)	> 15	Undetermined age	Presence of diarrhea	Absence of diarrhea
<i>G. intestinalis</i>	15	15	14	1	9	11	3	62
<i>G. intestinalis</i> + <i>B. hominis</i>	3	1	2	–	1	5	1	11
<i>G. intestinalis</i> + <i>E. nana</i>	2	3	1	1	1	0	1	7
<i>G. intestinalis</i> + <i>B. hominis</i> + <i>E. nana</i>	1	1	–	–	–	–	–	2
<i>G. intestinalis</i> + <i>B. hominis</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar	–	1	–	–	1	–	–	2
<i>G. intestinalis</i> + <i>E. nana</i> + <i>E. coli</i>	–	–	–	–	1	1	–	2
<i>G. intestinalis</i> + <i>E. nana</i> + <i>I. bütschlii</i>	–	–	–	–	1	–	–	1
<i>G. intestinalis</i> + <i>E. nana</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar	1	–	–	–	–	–	–	1
<i>G. intestinalis</i> + <i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar	–	1	–	–	–	–	–	1
<i>G. intestinalis</i> + <i>E. coli</i> + <i>B. hominis</i>	–	–	1	–	–	–	–	1
<i>G. intestinalis</i> + <i>E. coli</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar + <i>B. hominis</i>	–	–	–	–	–	1	–	1
<i>G. intestinalis</i> + <i>B. hominis</i> + <i>E. nana</i> + <i>E. histolytica</i> /dispar + <i>I. bütschlii</i>	–	–	–	–	–	1	–	1
Total	22	22	18	2	14	19	5	92

Blastocystis hominis = *B. hominis*; *Entamoeba coli* = *E. coli*; *Entamoeba histolytica*/dispar = *E. histolytica*/dispar; *Giardia intestinalis* = *G. intestinalis*; *Iodamoeba bütschlii* = *I. bütschlii*.

parasitism reportedly range from 26.6% to 30.6%. Nevertheless, other studies have reported somewhat lower prevalence rates, ranging from 6.7% to 19.7%.^{24–27} Only one study indicated a higher rate of parasitism (42.6–44.6%).²⁸ In our study, the prevalence of *Giardia* was significantly higher in children than in adults. Conversely, the prevalence of other parasites, especially *Blastocystis* and *Endolimax*, was higher in adults than in children. Some studies have identified a similar pattern, where age appeared to influence the rate of *Giardia* infection, with children being significantly more infected than adults.^{29–33} Two studies were recently performed in Libya, the first comprising 305 individuals of unspecified age with diarrhea, where the prevalence of *Giardia* was found to be 1.3%,²⁶ whereas the second included 505 children aged 2–17 years with diarrhea, where the prevalence was reported to be 26.3%.²⁹

As of today, quite a few studies have identified that some parasites appear to be markedly more common in adults than in children. In the present study, *E. nana* and *Blastocystis* were more often found in adults than in children. A recent study involving Nigerian individuals also found an increasing prevalence of *Blastocystis* by age,³⁴ and similar trends have been observed by other research teams for *Blastocystis* and species belonging to *Archamoeba*.^{35–39} There might be a general

tendency of flagellates such as *Giardia* and *Dientamoeba* to be more common in children than in adults, whereas *Blastocystis* and genera belonging to the *Archamoebae* become more common with increasing age.^{24,40–42} Because all these parasites are common and transmitted fecal orally, and because both adults and children may not be differentially exposed, differences in infection may reflect differences in factors related to immunity and gut microbiota.

In our study, direct microscopy of fecal concentrates was used for detection and differentiation of intestinal protists, whereas a few previous studies^{28,29,43,44} used a combination of or different examination and diagnostic tests, including microscopy of fecal concentrates, immunoassays, an immunofluorescence assay including 4',6-diamidine-2-phenylindole-dihydrochloride, trichrome staining, and iodine staining, all of which may differ in terms of sensitivity with a consequence for the reported *Giardia* prevalence. This can be exemplified by a study carried out recently in Egypt,⁴³ where the prevalence of *Giardia* was 38% based on immunoassay results compared with 18% based on results from microscopy of fecal concentrates.

The extent of coinfection between *Giardia* and other intestinal parasitic protists was investigated in the present study. *Giardia* in association with *Blastocystis* was found in 12

TABLE 4

Clinical symptoms observed for patients positive for *Giardia* and for parasites other than *Giardia*, respectively, for whom clinical information was available

Clinical signs and symptoms	Total no. of patients	Positive for <i>Giardia</i> (n = 97), n (%)		Positive for parasites other than <i>Giardia</i> (n = 470), n (%)		χ^2	P-value
Abdominal pain	56	13	(13.4)	43	(9.1)	1.19	0.28
Diarrhea	35	5	(5.2)	30	(6.4)	0.05	0.82
Constipation	17	2	(2.1)	15	(3.2)	0.07	0.79
Anorexia	4	2	(2.1)	2	(0.4)	1.18	0.28
Vomiting and nausea	11	3	(3.1)	8	(1.7)	0.25	0.62
Fever	18	5	(5.2)	13	(2.8)	0.82	0.37
Anal pruritus	22	5	(5.2)	17	(3.6)	0.18	0.67
Paleness	5	2	(2.1)	3	(0.6)	0.59	0.44
Failure to thrive	8	3	(3.1)	5	(1.1)	1.14	0.28

P > 0.05 = not statistically significant.

cases (2.1%), which is consistent with the study carried out in Oran, Algeria.²⁴ In another recent study performed in urban Bissau, Guinea-Bissau, comprising 1,274 children in cohort I (healthcare-seeking children, $n = 566$) and cohort II (background population; i.e., non-healthcare-seeking children, $n = 708$), 2–15 years of age, the authors found *Giardia* and *E. histolytica/dispar* together in 10 cases (1.8%) and 20 cases (2.8%), respectively, and *Giardia* and *E. nana* together in seven cases (1.2%) and nine cases (1.3%), respectively, which is concordant with our results (1.4%).³¹

In a study based in sub-Saharan Africa and South Asia,⁴⁵ *Giardia* was not significantly associated with moderate-to-severe diarrhea; a similar observation was made in another report of endemic pediatric giardiasis concluding that there was an ostensibly paradoxical association with protection against acute diarrhea from other specific enteropathogens, yet an enhanced risk of persistent diarrhea in *Giardia* carriers.⁴⁶ In the present study, none of the reported symptoms were more common in those with *Giardia* than among those who were positive for other parasites (Table 4). Apart from diarrhea, *Giardia* has been linked with other gastrointestinal symptoms, such as abdominal distension, vomiting, fever, and weight loss mainly in children.⁴⁷ Unfortunately, for all the symptomatic individuals, no information was available on whether infections were light, moderate, or heavy. This information would have been relevant to possibly establish links on relative infection intensity as assessed by, for example, real-time PCR where cycle threshold values for *Giardia*-positive patients could be collated and analyzed in the context of symptoms.

Our study has a few limitations. First, it was performed over a period of only 12 months, and, consequently, the number of identified *Giardia*-infected individuals was relatively small. Second, it was hospital based, and no healthy control population was examined to obtain data on the background prevalence of *Giardia* and other parasites in the area, which means that we were not able to identify whether individuals seeking medical care are more prone to testing positive for *Giardia* and other intestinal parasites than those not seeking medical care (background population) in the study area. Third, no clinical or epidemiological data were available for the parasite-negative patients. Therefore, we were not able to investigate whether colonization by parasites could be protective of intestinal symptoms. In addition to these limitations, because of time constraints, it was not possible to investigate more than one stool sample per participant, although the diagnostic sensitivity of microscopy would increase with an increased number of samples examined per person.³¹ It is plausible that our study design would underestimate the factual prevalence; however, it must be noted that this limitation has been seen in a previously published study in Algeria,²⁴ which renders the context of our prevalence comparable.

CONCLUSION

This study gives an important indication of the extent of *Giardia* infections in both children and adults in the Algiers area. Of particular note, we found that *Giardia* was most common in smaller children and that *Giardia* infection overall was not particularly linked to intestinal symptoms. However, we were not able to identify to which extent symptoms might be associated with infection intensity. Finally, we confirmed clear differences in the distribution of *Giardia*, *Blastocystis*,

and archamoebids across age-groups. Studies identifying the distribution of these parasites in the context of the bacterial gut microbiome are warranted to learn whether differences in parasite distribution are reflected in differences in the gut microbiome.

Received March 13, 2020. Accepted for publication September 6, 2020.

Published online January 18, 2021.

Acknowledgments: We would like to thank the staff of the Unit of Parasitology–Mycology at the University Hospital of Beni-Messous for providing us with all materials needed for achieving this study and making time to answer our questions. We also acknowledge Jakob Skov, Technical University of Denmark, for his critical review of earlier versions of this manuscript.

Authors' addresses: Salem Belkessa, Department of Biochemistry and Microbiology, Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Tizi Ouzou, Algeria, Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences, Mohamed Khider University of Biskra, Biskra, Algeria, and Department of Bacteria, Parasites & Fungi, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark, E-mail: salembelkessa@yahoo.com. Elhosseyn Ait-Salem and Karim Houali, Department of Biochemistry and Microbiology, Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Tizi Ouzou, Algeria, E-mails: aitsalem.e@gmail.com and houalitizi@yahoo.fr. AbdElkarim Laatamna, Laboratory of Exploration and Valorisation of Steppe Ecosystems, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Djelfa, Djelfa, Algeria, E-mail: laatamnaabdelkarim@yahoo.com. Ute Wolff Sönksen and Christen Rune Stensvold, Department of Bacteria, Parasites and Fungi, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark, E-mails: uws@ssi.dk and run@ssi.dk. Ahcene Hakem, Laboratory of Exploration and Valorisation of Steppe Ecosystems, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Djelfa, Djelfa, Algeria, and Center Research in Agropastoralism, Djelfa, Algeria, E-mail: ahcenhakem@gmail.com. Zahida Bouchene, Faculty of Medicine, University of Algiers, Algiers, Algeria, E-mail: bouchene_z@hotmail.com. Farida Ghalmi, Higher National Veterinary School of Algiers, Algiers, Algeria, E-mail: fghalmi@yahoo.fr.

REFERENCES

1. Thomas K, Fomefret Y, Emmanuel E, Therese N, Roger M, Albert SE, 2015. Prevalence and risk factors of intestinal helminth and protozoa infections in an urban setting of Cameroon: the case of Douala. *Am J Epidemiol Infect Dis* 3: 36–44.
2. Yaoyu F, Xiao L, 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 24: 110–140.
3. Yoder JS, Gargano JW, Wallace RM, Beach MJ, 2012. Giardiasis surveillance — United States, 2009–2010. *MMWR Surveill Summ* 61: 13–23.
4. Erismann S et al., 2016. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among schoolchildren in the plateau central and centre-ouest regions of Burkina Faso. *Parasit Vectors* 9: 554.
5. Raffei A, Baghlaninezhad R, Köster PC, Bailo B, de Mingo MH, Carmena D, Panabad E, Beirumvand M, 2020. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Southwestern Iran. A community survey. *PLoS One* 15: e0228317.
6. Barry MA, Weatherhead JE, Hotez PJ, Woc-Colburn L, 2013. Childhood parasitic infections endemic to the United States. *Pediatr Clin North Am* 60: 471–485.
7. Savioli L, Smith H, Thompson A, 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “neglected diseases initiative”. *Trends Parasitol* 22: 203–208.
8. Cernikova L, Faso C, Hehl AB, 2018. Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* 14: e1007250.
9. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG, 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol* 8: 413–422.

10. Cotton JA, Beatty JK, Buret AG, 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol* 41: 925–933.
11. Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG, 2006. *Giardia* immunity—an update. *Trends Parasitol* 22: 26–31.
12. Halliez MCM, Buret AG, 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol* 19: 8974–8985.
13. Faubert G, 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 13: 35–54.
14. Eisenberg JNS, Brookhart MA, Rice G, Brown M, Colford JM, 2002. Disease transmission models for public health decision making: analysis of epidemic and endemic conditions caused by waterborne pathogens. *Environ Health Perspect* 110: 783–790.
15. Stuart JM, Orr HJ, Warburton FG, Jeyakanth S, Pugh C, Morris I, Sarangi J, Nichols G, 2003. Risk factors for sporadic giardiasis: a case-control study in Southwestern England. *Emerg Infect Dis* 9: 229–233.
16. Adam RD, 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14: 447–475.
17. Thompson RCA, 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 30: 1259–1267.
18. Mathan VI, 1998. Diarrhoeal diseases. *Br Med Bull* 54: 407–419.
19. Allen AVH, Ridley DS, 1970. Further observations on the formal-ether concentration technique for faecal parasites. *J Clin Pathol* 23: 545–546.
20. Henriksen SA, Pohlenz JFL, 1981. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl Neelsen technique. *Acta Vet Scand* 22: 594–596.
21. Bachta E, Zenaidi N, Belkaid M, Tabet Derraz O, Boudhane L, 1990. Bilan des parasitoses intestinales rencontrées dans l'Algérie (années 1984–1988). *Bull Soc Pathol Exot* 83: 510–516.
22. Ayadi A, Mahfoudh A, Mahjoubi F, 1991. Parasitoses intestinales chez l'enfant: bilan de 2 ans dans le centre hospitalo-universitaire de Sfax. *Med Afr Noire* 38: 557–560.
23. Faye O, N'dir O, Gaye O, Dieng Y, Dieng T, Bah IB, Diallo S, 1998. Les parasitoses intestinales dans le bassin du fleuve Sénégal. Résultats d'enquêtes effectuées en milieu rural. *Med Afr Noire* 45: 491–495.
24. Benouis A, Bekkouche Z, Benmansour Z, 2013. Etude épidémiologique des parasitoses intestinales humaines au niveau du C.H.U. d'Oran (Algérie). *IJIAS* 2: 613–620.
25. El Guamri Y et al., 2009. Enquête épidémiologique rétrospective sur les parasitoses intestinales au Centre Hospitalier Provincial El Idrissi (Kénitra, Maroc): bilan de 10 ans (1996–2005). *Ann Biol Clin* 67: 191–202.
26. Mergani MH, Mohammed MA, Khan N, Bano M, Khan A, 2014. Detection of intestinal protozoa by using different methods. *Dent Med Res* 2: 28–32.
27. Nicolas M, Perez JM, Carne B, 2006. Diagnostic des parasitoses intestinales au CHU de la Guadeloupe: évolution de 1991 à 2003. *Bull Soc Pathol Exot* 99: 254–247.
28. Shehata AI, Hassanein F, 2015. Intestinal parasitic infections among mentally handicapped individuals in Alexandria, Egypt. *Ann Parasitol* 61: 275–281.
29. Saaed FMA, Ongerth JE, 2019. *Giardia* and *Cryptosporidium* in children with diarrhea, Kufra, Libya, a North African migration route city. *Int J Hyg Environ Health* 222: 840–846.
30. El Fatni C, Olmo F, El Fatni H, Romero D, Rosales MJ, 2014. First genotyping of *Giardia duodenalis* and prevalence of enteroparasites in children from Tetouan (Morocco). *Parasite* 21: 48.
31. Von Huth S, Kofoed PE, Holmskov U, 2019. Prevalence and potential risk factors for gastrointestinal parasitic infections in children in urban Bissau, Guinea-Bissau. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 113: 545–554.
32. Mostafi J, Belghyti D, El Kostali M, Fatimi N, Oulkheir S, Taboz Y, Arouya K, 2011. Prévalence des parasitoses intestinales chez les enfants adressés pour coprologie parasitaire à l'hôpital Moulay Abdellah de Salé (Maroc). *World J Biol Res* 4: 1–5.
33. Adou-bryn D, Kouassi M, Brou J, Ouhon J, Assoumou A, 2001. Prévalence globale des parasitoses à transmission orale chez les enfants à Tourmodi (Cote d'Ivoire). *Med Afr Noire* 48: 394–398.
34. Poulsen CS, Efunshile AM, Nelson JA, Stensvold CR, 2016. Epidemiological aspects of *Blastocystis* colonization in children in Ilero, Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 95: 175–179.
35. Poulsen CS, Stensvold CR, 2016. Systematic review on *Endolimax nana*: a less well studied intestinal ameba. *Trop Parasitol* 6: 8–29.
36. El Safadi D et al., 2014. Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis* 14: 164.
37. Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilić-Stojanović M, Heilig GHJ, De Vos WM, O'Toole PW, Cotter PD, 2014. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 90: 326–330.
38. Salehi R, Haghighi A, Stensvold CR, Kheirandish F, Azargashb E, Raeghi S, Kohansal C, Bahrami F, 2017. Prevalence and subtype identification of *Blastocystis* isolated from humans in Ahvaz, Southwestern Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 10: 235–241.
39. Scanlan PD, Hill CJ, Ross RP, Ryan CA, Stanton C, Cotter PD, 2018. The intestinal protist *Blastocystis* is not a common member of the healthy infant gut microbiota in a westernized country (Ireland). *Parasitology* 145: 1274–1278.
40. Jokelainen P, Hebbelstrup Jensen B, Andreassen BUPA, Röser D, Krogfelt KA, Nielsen HV, Stensvold CR, 2017. *Dientamoeba fragilis*, a commensal in children in Danish Day Care Centers. *J Clin Microbiol* 55: 1707–1713.
41. Shaker D, Anvari D, Hosseini SA, Fakhar M, Mardani A, Ziaei Hezarjaribi H, Gholami S, Gholami S, 2019. Frequency and genetic diversity of *Blastocystis* subtypes among patients attending to health centers in Mazandaran, northern Iran. *J Parasit Dis* 43: 537–543.
42. Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, Stensvold CR, Shouche YS, 2015. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol* 31: 296–299.
43. Elswaifi SF, Palmieri JR, El-Tantawy N, El-Hussiny M, Besheer T, Abohashem E, 2016. Comparison of microscopic and immunoassay examination in the diagnosis of intestinal protozoa of humans in Mansoura, Egypt. *J Parasit Dis* 40: 580–585.
44. Hamaidi-Chergui F, Hamaidi MS, Benkhetar M, Mahieddine AO, 2013. Intestinal infections in boufarik hospital (Blida) Algeria. *Rev Ind Microbiol Sanit Environ* 7: 73–87.
45. Kotloff KL et al., 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382: 209–222.
46. Muhsen K, Levine MM, 2012. A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin Infect Dis* 55 (Suppl 4): S271–S293.
47. Breurec S et al., 2016. Etiology and epidemiology of diarrhea in hospitalized children from low income country: a matched case-control study in Central African Republic. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004283.
48. Eassa SM, El-Wahab EWA, Lotfi SE, El Masry SA, Shatat HZ, Kotkat AM, 2016. Risk factors associated with parasitic infection among municipality solid-waste workers in an Egyptian community. *J Parasitol* 102: 214–221.
49. Mohammad KAEA, Mohammad AAEA, 2015. A survey of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in rural and urban community in North Delta, Egypt. *Zagazig Univ Med J* 17: 194–201.
50. Rahouma A et al., 2011. Enteric pathogens associated with childhood diarrhea in Tripoli-Libya. *Am J Trop Med Hyg* 84: 886–891.
51. Siala E, Toumi I, Béttaiieb J, Boulehmi N, Zallega N, Aoun K, Bouratbine A, 2015. Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis in the region of Tunis from 1996 to 2012. *Tunis Med* 93: 687–691.
52. El Kettani S, Azzouzi EM, Maata A, 2006. Prévalence de *Giardia intestinalis* chez une population rurale utilisant les eaux usées à des fins agricoles à Settlat, Maroc. *Med Maladies Infect* 36: 322–328.
53. Habbari K, Tifnouti A, Bitton G, Mandil A, 2000. Intestinal parasitosis and environmental pollution: 1343 pediatric cases in Beni-Mellal, Morocco. *Tunis Med* 78: 109–114.



Article

Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* in Children and Adults Sampled in Algeria

Salem Belkessa ^{1,2,3} , Daniel Thomas-Lopez ^{3,4} , Karim Houali ¹ , Farida Ghalmi ⁵ and Christen Rune Stensvold ^{3,*}

- ¹ Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Tizi Ouzou 15000, Algeria; salembelkessa@yahoo.com (S.B.); houalitizi@yahoo.fr (K.H.)
- ² Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Exact Sciences and Natural and Life Sciences, Mohamed Khider University of Biskra, Biskra 07000, Algeria
- ³ Laboratory of Parasitology, Department of Bacteria, Parasites & Fungi, Infectious Disease Preparedness, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300 Copenhagen S, Denmark; datl@ssi.dk
- ⁴ European Public Health Microbiology Training Programme (EUPHEM), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 16973 Solna, Sweden
- ⁵ Higher National Veterinary School of Algiers, El Alia, Algiers 16000, Algeria; fghalmi@yahoo.fr
- * Correspondence: run@ssi.dk; Tel.: +45-3268-8224

Abstract: The molecular epidemiology of giardiasis in Africa remains unclear. A study was carried out across four hospitals in Algeria. A total of 119 fecal samples from 55 children, 37 adults, and 27 individuals of undetermined age, all scored positive for intestinal parasites by microscopy, and were screened by real-time PCR for *Giardia*. Molecular characterization of *Giardia* was performed by assemblage-specific PCR and PCR targeting the triose phosphate isomerase gene (*tpi*). Of the 119 samples, 80 (67%) were *Giardia*-positive by real-time PCR. For 48 moderately-highly real-time PCR-positive samples, *tpi* genotyping assigned 22 samples to Assemblage A and 26 to Assemblage B. Contrary to Assemblage A, Assemblage B exhibited substantial genetic diversity and allelic heterozygosity. Assemblage-specific PCR proved to be specific for discriminating Assemblage A or B but not as sensitive as *tpi* genotyping. We confirmed that real-time PCR is more sensitive than microscopy for detecting *Giardia* in stool samples and that robust amplification and sequencing of the *tpi* gene is feasible when moderate-to-strongly real-time PCR-positive samples are used. This study is one of the few performed in Africa providing genotyping data on *Giardia* infections in humans. Both assemblages A and B were commonly seen and not associated with specific sociodemographic data.

Keywords: allelic sequence heterozygosity (ASH); diarrhea; *Giardia duodenalis*; molecular epidemiology; parasite; real-time PCR



Citation: Belkessa, S.; Thomas-Lopez, D.; Houali, K.; Ghalmi, F.; Stensvold, C.R. Molecular Characterization of *Giardia duodenalis* in Children and Adults Sampled in Algeria. *Microorganisms* **2021**, *9*, 54. <https://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9010054>

Received: 10 December 2020

Accepted: 24 December 2020

Published: 28 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Enteric parasites are significant contributors to global diarrheal disease and other intestinal symptoms [1] and, among these, *Giardia duodenalis* (syn. *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*) is a flagellated zoonotic parasite commonly found in the intestinal tract of humans and animals, resulting in large numbers of gastrointestinal infections [2]. Worldwide, up to 280 million people are estimated to be infected with *G. duodenalis* [2–5]. The reported prevalence of *Giardia* infections in humans ranges between 0.4% and 7.5% in developed countries, and between 8% and 30% in developing countries [2]. Symptoms vary in intensity, which may be attributable to both host and parasite factors [6]; infection is considered asymptomatic in approximately 50% of the cases, while severe diarrhea combined with vomiting, bloating, nausea, and/or fatigue can be seen in symptomatic patients, and impaired growth may be seen in children [5].

Owing to its extensive genetic variation [7,8], *G. duodenalis* is considered a species complex, involving eight genetically distinct groups or genotypes (assemblages A–H)

with varying zoonotic potential and host specificity [9]. Assemblage B in particular exhibits allelic sequence heterozygosity (ASH) across multiple loci [10]. Assemblages can be identified by polymerase chain reaction (PCR), either in combination with restriction fragment length polymorphism (RFLP) or sequencing of the PCR amplicons [11–13]. Because of differences in the sensitivity of the PCR assays and occasional discrepant genotyping results among genetic loci, it has been recommended to determine *G. duodenalis* assemblage by multilocus analysis, which provides higher resolution [14] and involves sequencing of the small subunit (SSU) of the nuclear ribosomal RNA (18S rRNA gene), β -giardin (*bg*), glutamate dehydrogenase (*gdh*), and/or triose phosphate isomerase (*tpi*) genes [2,4,15,16]. The *tpi* gene has generally proved to be a robust marker and may be used alone to provide baseline information where no a priori knowledge is available [17]. Another method was developed in 2012 to detect and differentiate assemblages A and B in human fecal samples [18]. The method involves a single-step PCR using assemblage-specific primers and relies on the differences in PCR product sizes for assemblages A and B visualized by gel electrophoresis. This method has proven robust for detecting mixed infections and in terms of applicability in laboratories with basic molecular equipment [18]. In Europe and America, the epidemiology of *Giardia* human infections is relatively well documented, even at the assemblage level. However, in Africa, very little data is available [19], and the extent of ASH in *G. duodenalis* in humans in Africa has been elucidated only to a very limited extent [20]. Particularly in Algeria, there is—to our knowledge—only one *Giardia* genotyping study on human isolates; however, no DNA sequencing data were available in that study [21]. Therefore, in order to provide some baseline data on the molecular epidemiology of *Giardia* infections in children and adults in Algeria, we carried out a study to characterize *G. duodenalis* from two separate geographical areas, using real-time PCR, assemblage-specific PCR, *tpi*-sequencing-based genotyping, and analysis of ASH within *Giardia* assemblages.

2. Materials and Methods

2.1. Stool Sample Collection and Participants' Demographic Characteristics

The study was carried out from 2013 to 2018 across two hospitals in the Algiers metropolitan area (Centre Hospitalo-Universitaire Issad Hassani, Beni Messous, and Centre Hospitalo-Universitaire Nafissa Hamoud [ex-Hôpital Parnet], Hussein Dey) and two hospitals in the region of Biskra (Tolga Hospital and Doctor Saadane Hospital).

A total of 119 fecal samples collected from 119 individuals suspected of parasitosis and/or suffering from gastrointestinal symptoms (i.e., diarrhea, vomiting, and/or abdominal cramps) and scored as parasite-positive by direct wet mount microscopy with formalin-ether concentration technique for ova and parasites, were included in our study. Forty-eight individuals were females, 66 were males, and for five individuals, information on sex was not available. Fifty-five patients were younger than 15 years and 37 were older (age range, 2–74 years [median, 8 years; interquartile range (IQR), 4.25–24]); for 27 patients, the age was unknown. Study individuals below the age of 15 were classified as children according to similar studies [22–24].

All samples were screened by real-time PCR for *Giardia* (see below). Some of the samples ($n = 22$) used in the present study were also used in our recent study describing the prevalence of *Giardia* and various parasites in Algerian children and adults [25] (manuscript accepted for publication).

2.2. Genomic DNA Extraction and Purification

All stool samples had been stored in either potassium dichromate (2.5%) or ethanol (70%) upon collection (of note, to ensure better preservation, approximately one-third of stool samples were supplemented by two-thirds of preserving agent in dry tubes). To remove the preserving agent, samples were washed in PBS once prior to DNA extraction. Total DNA was extracted from stool samples using the NucliSENS® easyMAG® system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) following the manufacturer's instructions with

some modifications [26,27]. Briefly, approximately 200 mg of each sample were placed in a 2 mL microtube, mixed with 400 µL Lysis Buffer, and vortexed using Mylab (Vortex-Mixer SLV-6, Seoulin Bioscience Co., Ltd., Seoul, Korea) for 2 min to ensure thorough fragmentation and homogenization. The samples were subsequently centrifuged for 5 min at 16,000 rpm. From each sample, 100 µL of supernatant were lysed in the NucliSENS® easyMAG® apparatus. Subsequently, 60 µL of magnetic silica were added to each sample and thoroughly mixed. The extracted DNA samples were afterward stored at −20 °C until use.

2.3. Real-Time PCR

All study samples ($N = 119$) were screened for *Giardia* by in-house real-time PCR, in place at Statens Serum Institut, which amplifies a 62-bp region of the small-subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene of *Giardia*, using primers and probes previously published [28] (Table 1).

Table 1. List of oligonucleotides used for real-time PCR, assemblage-specific PCR, and *tpi* gene-based genotyping with indications of the sizes of the amplicons.

Assay	Oligonucleotides (Primer/Probe)	Assemblage	Primer and Probe Sequences (5'-3')	PCR Product Size (bp)	Reference
Real-time PCR	Giardia-80F Giardia-127R	NA	For GACGGCTCAGGACAACGGTT Rev TTGCCAGCGGTGTCCG	62	[28]
	Probe Giardia-105T	NA	FAM-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ-1		
Assemblage-specific PCR	4E1-HP	A	For AAAGAGATAGTTCGCGATGTC Rev ATTAACAAACAGGGAGACGTATG	165	[18]
		B	For GAAGTCATCTCTGGGGCAAG Rev GAAGTCTAGATAAACGTGTCCG	272	
<i>tpi</i> gene analysis	Giardia AL3543	All assemblages	For AAATATGCCTGCTCGTCG Rev CAAACCTTITCCGCAAACC	605	[17]
	Giardia AL3546		For CCCTTCATCGGIGGTAACCT Rev GTGGCCACCACICCCGTGCC	530	
	Giardia AL3544				
	Giardia AL3545				

NA, not applicable; For, Forward; Rev, Reverse.

The 25-µL real-time PCR assay mixture consisted of 0.2 µL IMMOLASE™ DNA Polymerase (Bioline), 5 µL 10× ImmoBuffer, 1.25 µL (1 µM) of the primers Giardia-80F and Giardia-127R, 0.125 µL (0.075 µM) of the probe (Giardia 105T), and 5 µL of DNA eluate. The real-time PCR was carried out using an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Thermocycler (Thermo Fisher Scientific) with the following cycling conditions: initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 60 s. PCR products were analyzed using Sequence Detection Software v.2.3 (Thermo Fisher Scientific). A sample was considered positive if an exponential curve was observed with a Ct-value ≤ 42. Negative (water) and positive controls (DNA for *G. duodenalis*) were included in each run as well as inhibition controls.

2.4. Molecular Typing

Assemblage-specific PCR (4E1-HP method [18]) was performed on a 96-well LifeECO Thermocycler (Bioer Technology) using the Platinum® Taq DNA Polymerase Master Mix (Invitrogen). The final concentration of each primer used in PCR reactions was 0.4 pM, and the sequences of each primer pair are displayed in Table 1. All reactions followed the same thermocycler programming: an activation-denaturation step at 94 °C for 5 min followed by 40 cycles, each consisting of 94 °C for 30 s, an annealing step of 30 s at 56 °C, and an extension step of 72 °C for 30 s. A final extension step was performed at 72 °C for 7 min. PCR products were analyzed by electrophoresis (90 V, 60 min) on TBE 1× 1.5% agarose gels stained with EZ-Vision® DNA dye (Amresco Inc., Solon, OH, USA) and photographed

with BioDoc-it™ imaging system (2UV Transilluminator). A 1 kb DNA molecular weight marker GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) was used. Assemblages were identified based on the size of the PCR products relative to the positive control DNAs (Assemblage A and Assemblage B) kindly provided by the European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy. The sample was considered positive for *G. duodenalis* Assemblage A or Assemblage B if we observed a 165-bp or a 272-bp PCR product, respectively [18]; a sample was considered positive for both assemblages (mixed infection) if both PCR products were present. If a PCR product of a different size was observed, this finding was reported as well (Table S1).

Most *Giardia*-positive samples with a Ct value < 32 DNA were available for typing, and these were genotyped to assemblage level using a nested PCR assay for amplification of a 530-bp fragment of the *tpi* gene [17]; this Ct value threshold was chosen based on the previous experience that samples with higher Ct values were unlikely to yield *tpi* sequences of sufficient quality. We therefore considered samples with Ct values < 32 as moderate-to-strongly *Giardia*-positive samples.

The PCR assays were carried out in total volumes of 25 µL, consisting of 12.5 µL of ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich Co. LLC, CA, USA) (PCR Buffer, MgCl₂, dNTP, DNA Polymerase Taq polymerase), 1 µL (0.4 µM) of each of external primers AL3543 and AL3546, 8.5 µL of Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), and 2 µL of DNA for the primary amplification. PCR was performed with an initial hot start of 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 45 s, 50 °C for 45 s, and 72 °C for 60 s, followed by a final extension of 72 °C for 10 min using a 96-well LifeECO Thermocycler. The same conditions were applied to the second PCR reaction where 2 µL of PCR product from the primary reaction and 1 µL (0.4 µM) of the internal primers AL3544 and AL3545 were used for the reaction [17]. PCR-positive samples were purified with QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, and sequenced bi-directionally by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

2.5. Sequence Analysis

DNA sequences specific to the *tpi* gene were edited and trimmed using Staden Package 2.0.0b11-2016 software and aligned using online tools (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>). Analysis of ASH in the *tpi* sequences involved the identification of 'double peaks'; i.e., overlapping nucleotides. *tpi* sequences were translated into amino acid (aa) sequences using an online translation tool (<http://web.expasy.org/translate>) and aligned to identify differences in aa sequences reflecting any double peaks. Reference sequences from the major *G. duodenalis* assemblages and subtypes used for comparison were chosen based on previous studies [10,22,29–31] and retrieved from GenBank (accession numbers: AF069556, AF069557, MF169203, DQ650648, MK509037, MH644770, JX266842, AY228628, AF069560, AY228641, DQ246216, KF891311, and AF069558). DNA sequences reflecting the *tpi* gene obtained in this study were submitted to GenBank under the accession numbers: MW251133-MW251180.

2.6. Statistical Analysis

Real-time PCR cycle threshold (Ct) values were determined using the software StepOne, version 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Differences in the prevalence of *Giardia* between groups were tested by calculating and comparing Wilson's confidence intervals (CI) for proportions, supplemented by the N-1 Chi-squared test (https://www.medcalc.org/calc/comparison_of_proportions.php, access date: 10/07/2020).

Differences in Ct values between groups of samples were evaluated using the unpaired *t*-test implemented in Microsoft Excel 2016. The sensitivity and specificity of both microscopy and real-time PCR, using each other as the gold standard, were calculated using an online diagnostic test evaluation calculator (<https://www.medcalc.org/calc/>

[diagnostic_test.php](#)). The inter-test agreement between microscopy and real-time PCR was quantified using Cohen's Kappa index (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>). Differences between the sensitivity and specificity of microscopy and real-time PCR were tested using McNemar test on paired proportions (<https://www.scistat.com/statisticaltests/mcnemar.php>). Probability (p) values < 0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Confirmation of Microscopy Results by *Giardia*-Specific Real-Time PCR

For this study, we used DNAs from parasite-positive stool samples collected in Algerian hospitals. Of the 119 samples, 80 (67%) were real-time PCR-positive for *Giardia* (median Ct value, 26.56; IQR, 23.11–32.22), of which 66 had been scored as *Giardia*-positive by microscopy (median Ct value for microscopy-positive samples, 26.04; IQR, 22.78–31.86). Fourteen samples that were positive by real-time PCR had been scored negative for *Giardia* by microscopy (median Ct value, 28.59; IQR, 24.92–34.95). Ct values of samples positive by both real-time PCR and microscopy were lower than the Ct values of samples positive by real-time PCR but negative by microscopy, but not significantly so ($p = 0.13$; Figure 1A). The remaining 39 (33%) samples were real-time PCR-negative for *Giardia*; among these, seven had been scored positive for *Giardia* by microscopy, and the remaining 32 were negative by both real-time PCR and microscopy.

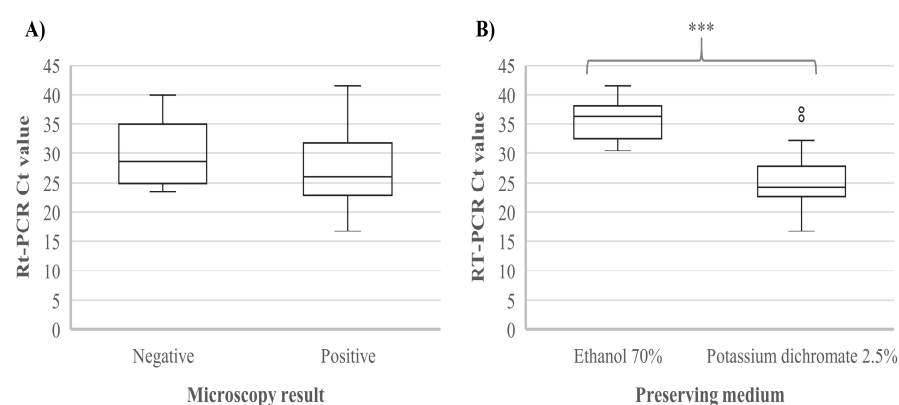


Figure 1. Real-time PCR cycle threshold values according to (A) microscopy results (negative vs. positive for *Giardia duodenalis*) and (B) preserving medium (ethanol 70% vs. potassium dichromate 2.5%). *** indicates $p < 0.001$.

As assessed by real-time PCR, *Giardia* was significantly more common in children, with 45/55 (81.8% [CI, 69.7–89.8%]) positive children compared with 11/37 (29.7% [CI, 17.5–45.8%]) positive adults ($p < 0.001$).

The Ct values of the samples that had been stored in potassium dichromate (2.5%) were significantly lower than the Ct values of the samples that had been stored in ethanol (70%) ($p < 0.001$) (Figure 1B). As most individuals of known age were children, we performed the same analysis excluding the adults and individuals of unknown age to eliminate any potential effect of age, and similar results were obtained ($p < 0.001$) (data not shown). The sensitivity of real-time PCR and microscopy using each other as the gold standard was 90.4% and 82.5%, while the specificity was 69.6% and 82%, respectively. Cohen's Kappa value for real-time PCR and microscopy was 0.61, indicating substantial agreement.

3.2. Assemblage-Specific Analysis

Out of the 80 *Giardia*-positive samples by real-time PCR, 4 (5%) and 21 (26%) samples were scored as Assemblage A and Assemblage B, respectively, using assemblage-specific PCR. The remaining 55 (69%) *Giardia*-positive samples failed to produce a clear result by gel analysis; among these, 8 (10%) samples yielded extra/multiple PCR products,

including the *Giardia* Assemblage B-specific product; the other 47 (59%) samples exhibited no visible PCR products. The median Ct value for assemblage-specific PCR-positive samples was significantly lower (23.91; IQR, 22.75–26.00) than the median Ct value for assemblage-specific PCR-negative samples (30.98; IQR, 24.24–36.68) ($p < 0.001$).

In order to validate the results obtained with assemblage-specific PCR assay and obtain sequence information about the samples with no PCR products visible by gel analysis, we performed *tpi* genotyping. For the 48 (61%) samples that had Ct values lower than 32 (median Ct value, 24.07; IQR, 22.61–26.63) and for which DNA was available for typing, the *tpi* gene was successfully amplified by nested PCR and sequenced (of note, three samples analyzed with the assemblage-specific assay were not submitted to *tpi* genotyping due to lack of DNA availability). Out of the 48 *tpi* sequences, sequence analysis resulted in 22 (46%) Assemblage A sequences belonging to samples from 10 children, 6 adults, and 6 individuals of unknown age. The remaining 26 (54%) sequences were belonged to Assemblage B and corresponded to samples from 15 children, one adult, and 10 of unknown age (Table 2; Table S1). The samples belonging to Assemblage A were all 100% identical to the A2 subtype reference sequence AF069557 available in GenBank. Meanwhile, the samples pertaining to Assemblage B could not be assigned to the sub-assemblage level by alignment, and therefore they are referred to as Assemblage B only.

Table 2. Summary of *Giardia* assemblages detected by *tpi* gene analysis according to the basic demographic characteristics of the study population.

Study Population (N = 119)	<i>Giardia</i> -Positive (Real-Time PCR)	Assemblage A Positive/Typed Samples ¹	Assemblage B Positive/Typed Samples ¹
Children (N = 55)	45/55 (82%)	10/25 (40%)	15/25 (60%)
Boys (n = 30)	24/30 (80%)	5/14 (36%)	9/14 (64%)
Girls (n = 25)	21/25 (84%)	5/11 (45%)	6/11 (55%)
Adults (N = 37)	11/37 (30%)	6/7 (86%)	1/7 (14%)
Males (n = 23)	5/23 (22%)	3/3 (100%)	0/3 (00%)
Females (n = 14)	6/14 (43%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)
Undetermined age (N = 27)	24/27 (89%)	6/16 (37%)	10/16 (63%)
Males (n = 13)	12/13 (92%)	4/8 (50%)	4/8 (50%)
Females (n = 9)	9/9 (100%)	1/6 (17%)	5/6 (83%)
Unknown (n = 5)	3/5 (60%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
TOTAL	80/119 (67%)	22/48 (46%)	26/48 (54%)

¹ Results of the positive samples referred to assemblage A and B were based on *tpi* gene analysis.

3.3. Allelic Sequence Heterozygosity (ASH)

For the 22 *Giardia* Assemblage A samples, all 22 sequences were identical, and sequence analysis of the *tpi* gene revealed unambiguous sequence data with no evidence of ASH.

For the 26 Assemblage B samples, however, sequencing of *tpi* PCR products produced no less than 21 distinct sequence variants (Table S2). Seven sequences had no visible double peak at any nucleotide position. Of these sequences, four (ALG-007, ALG-0017, ALG-0019, and ALG-0040) were 100% identical to the BIV reference sequence Ad-19 (GenBank accession no. AF069560) (Table S2). The 19 remaining Assemblage B sequences had overlapping nucleotides (double peaks) in at least one position. Among these sequences, ALG-0022, ALG-0025, and ALG-0031 sequences were 100% identical, with double peaks at the following positions: 77, 162, 165, and 168.

The translation of nucleotide sequences into aa sequences revealed both silent and non-synonymous mutations among the *Giardia* Assemblage B sequences. All observed substitution patterns were transition mutations (T↔C or A↔G), except for one transversion mutation (A↔T) observed in the sample ALG-0044. The nucleotide substitutions of seven sequences (ALG-0026, ALG-0030, ALG-0035, ALG-0038, ALG-0041, ALG-0048,

and ALG-0051) corresponded to silent mutations and so did not cause any change in the aa sequence, while the nucleotides substitutions observed in 12 sequences (ALG-003, ALG-008, ALG-0020, ALG-0022, ALG-0023, ALG-0025, ALG-0031, ALG-0032, ALG-0037, ALG-0043, ALG-0044, and ALG-0047) were non-synonymous mutations (Table S3).

4. Discussion

In this study, we have provided some baseline information on the *Giardia* assemblages circulating in the human population in Algeria using sequence-based genotyping, and we provide some of the first genotyping data to emerge in this field from the entire Africa. Moreover, our study provides information on the prevalence of *Giardia* among individuals positive for intestinal parasites in selected areas in Algeria and information on upstream factors potentially influencing the process leading to successful genotyping.

Based on real-time PCR, the overall rate of *Giardia duodenalis* was 67%, with children being more commonly infected than adults (82% vs. 30%), confirming the trend identified in our previous study [25]. Real-time PCR was more sensitive for detecting *Giardia* than microscopy, which is in agreement with previous findings [32–35]. However, we identified seven samples negative by real-time PCR that were microscopy-positive for *Giardia*. This result might be explained in part by a misinterpretation during diagnosis or by the presence of ‘empty’ cysts, which would be observable by microscopy but would lack genetic material that could be amplified by real-time PCR as previously observed by colleagues [36].

The difference in the Ct values observed when using potassium dichromate (2.5%) or ethanol (70%) for sample storage might indicate that the former is more optimal for the preservation of samples collected for detection and molecular characterization of *Giardia*. This finding should be interpreted with caution, however, since clinical or epidemiological information that could otherwise explain this difference (e.g., association between visitation of samples to preserving agent and clinical severity of infection) was not available for this analysis. Meanwhile, we noticed that DNA extracted from samples collected and stored in potassium dichromate back in 2013 was of sufficient quality for DNA extraction and DNA analysis in 2019 when our laboratory work was carried out, exemplifying the applicability of potassium dichromate for this purpose.

The assemblage-specific PCR assay has proved reliable and sensitive in cases of strongly unbalanced samples with variable proportions of assemblages A and B DNA as well as when extremely diluted samples are used [18]. However, in our study only strongly real-time PCR positive samples gave interpretable results. Meanwhile, assemblage-typing using *tpi* gene as the genetic marker revealed consistent amplification when PCR-positive samples with Ct values ≤ 32 were used. A total of 40% (19/48) samples negative by assemblage-specific PCR were positive by *tpi* typing (Table S1). Noticeably, while most samples identified as Assemblage B-positive by *tpi* sequencing were correctly identified as Assemblage B by assemblage-specific PCR, only four of the 22 samples identified as Assemblage A by *tpi* sequencing were scored as Assemblage A-positive by assemblage-specific PCR; most of the remaining samples were negative. This indicates that the assemblage-specific PCR was specific and that the sensitivity was similar to that of the *tpi* assay for Assemblage B but remarkably less sensitive with regard to Assemblage A.

Overall, Assemblage B was primarily identified in children; however, the majority of *tpi* sequences obtained from individuals of unknown age were also attributed to Assemblage B; hence, we could not with certainty link Assemblage B to young age (Table 2; Table S1).

Extensive genetic variation was observed within *Giardia* Assemblage B sequences, with 21 examples of ASH identified among a total of 19 *Giardia* Assemblage B samples, whereas no genetic variation was noticed within *Giardia* Assemblage A sequences. It has previously been established that the *tpi* gene is highly conserved within Assemblage A [10]. Meanwhile, *tpi* sequencing revealed large genetic variation within *Giardia* Assemblage B samples. The observation of sequence heterogeneity in 19/26 sequences as evidenced by the presence of one or more double peaks in both sequence strands indicates that ASH

in Assemblage B is extensive in this population. Although this degree of heterozygosity may be due to mixed infections with parasites of multiple Assemblage B sub-assemblages, it may more likely be due to ASH of nuclei within single cysts as suggested in multiple studies [10,14,20,37,38]. Several studies of diverse hosts have reported that ASH can occur at specific positions, and its configuration may differ from one study to another, which may be due to substantial intragenic variability within Assemblages B sequences. The substitution patterns at positions 91, 162, 165, 168, and 280 have been reported from human samples in Sweden [10], Peru, India, and USA [17,39]. The substitution patterns at positions 216, 297, and 429 have been reported from water samples in USA [39]; additionally, the first (position 216) has been also reported from muskrat in USA [17,39], the second (position 297) from human in Peru [39], and the last (position 429) has been reported from rabbit and human in China and Australia, respectively [39]. The substitution pattern at position 77 has been observed in human samples in central Ethiopia [40] as well as in dog samples in USA [17]. The substitution pattern at position 333 has been reported from dog samples in Germany [39]. In the present study, we took into account only sequencing chromatograms with unambiguous peaks. Double peaks of approximately the same intensity were observed on both forward and reverse DNA strands. Thus, the possibility that low-quality sequencing might be the reason of the high number of allele variants could be ruled out, also because the sequences of the Assemblage A samples presented no background noise. In our study, we observed ASH in 73% of Assemblage B samples.

Our study has certain limitations to consider. First, the study was carried out in only two geographical areas, and we only investigated individuals who had been in contact with the health care system, so the data might not reflect the epidemiological situation in the entire country and in the background population. Additionally, if clinical information had been available to us, we could have investigated whether symptoms or intensity of infection as measured by real-time PCR differed between individuals with Assemblage A and those with Assemblage B infection. Similarly, age was not known for several individuals. If the patients of unknown age were all adults, then the difference in *Giardia* prevalence would not be nearly as large as the one accounted for here. Furthermore, we used only two typing methods (assemblage-specific PCR and *tpi* genotyping) for the assignment of *Giardia* samples at the assemblage level, which is not always reliable knowing that methods using different genetic markers can give different results, and more consistent results are obtained when combining the information from multiple markers [37]. Based on the data at hand, the sub-assemblage calling was not possible due to the genetic diversity and the high substitutions rate of Assemblage B samples [41], and lack of information in the GenBank database. Several previous studies have also reported the difficulty in assigning sub-assemblages in Assemblage B samples [14,42–44].

Conclusively, in this study population, most of the parasite-positive children had *Giardia*. We moreover observed that real-time PCR appears to be more sensitive than microscopy for detecting *Giardia* in stool specimens, and robust amplification and sequencing of the *tpi* gene is feasible when samples that are moderate-to-strongly positive real-time PCR are used. We were able to identify that potassium dichromate appears to be a better preserving agent for long-term storage of stool samples collected for *Giardia* detection and differentiation than ethanol. Finally, we observed that most Assemblage B sequences exhibited overlapping nucleotide peaks at specific positions in the chromatograms compared with Assemblage A sequences, suggesting substantial ASH and a clear difference in genetic diversity between assemblages A and B. Complementing to our study, further studies are needed with clear data on age, sex, geographic area, and clinical records including a survey of the background population to identify whether this population is more or less infected than those in touch with the healthcare system and to determine the assemblages in this background population (i.e., in those *Giardia*-infected individuals who do not seek medical treatment/advice), which will inform the future management of *Giardia* infections in Algeria.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/54/s1>, Table S1: Summary of the results obtained using real-time PCR, assemblage-specific PCR, and *tpi* gene analysis of *Giardia*-positive samples collected from two separate geographical areas in Algeria, previously tested positive for intestinal parasites by microscopy of fecal concentrates and preserved in either potassium dichromate 2.5% or ethanol 70% prior to analysis; Table S2: Comparative analysis of the extent of allelic sequence heterozygosity in the *tpi* gene of *Giardia duodenalis* Assemblage B identified in the study; Table S3: Comparative sequence analysis of expressed amino acid substitutions in the *tpi* gene of *Giardia duodenalis* Assemblage B samples identified in the study. Only samples with double peaks resulting in the existence of non-synonymous substitutions were included.

Author Contributions: Conceptualization, S.B., K.H., F.G., and C.R.S.; Methodology, S.B., D.T.-L., K.H., and C.R.S.; Software, S.B. and C.R.S.; Validation, S.B., D.T.-L., and C.R.S.; Formal analysis, S.B. and C.R.S.; Investigation, S.B., K.H., and C.R.S.; Resources, S.B., K.H., F.G., and C.R.S.; Data curation, S.B., F.G., and C.R.S.; Writing—original draft preparation, S.B., D.T.-L., and C.R.S.; Writing—review and editing, S.B., D.T.-L., K.H., F.G., and C.R.S.; Visualization, S.B.; Supervision, S.B., F.G., and C.R.S.; Project administration, S.B., K.H., and F.G.; Funding acquisition, S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: S.B. was financially supported through a grant from the Ministry of Higher Education and Scientific Research (Algeria) as part of le Programme National Exceptionnel (PNE) for the year 2018–2019. D.T.-L. was financially supported by a EUPHEM fellowship from the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). C.R.S. is part of the PARADISE Consortium, supported by funding from the European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation program under grant agreement 773830: One Health European Joint Program.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are deeply grateful to Nassima Chikhaoui and Malika Bouamama, Unit of Parasitology-Mycology, CHU Nafissa Hamoud (ex-Hôpital Parnet), Hussein Dey, Nawel Aiache and Yamina Bentounes, Unit of Parasitology-Mycology, CHU Isaad Hassani, Beni Messous, and Imen Boussaada, Laboratory of Parasitology, Doctor Saadane Hospital for their contribution in collecting samples. We would like to thank the technical staff at the Laboratory of Parasitology and Laboratory of real-time PCR, Statens Serum Institut. Specifically, we wish to thank Derakhsandeh Seid Moradi, Lis Wassmann, and Julija Bakerjian for their assistance with the laboratory work. We would like also to thank Simone M Cacciò and Marco Lalle from the European Union Reference Laboratory for Parasites (EURLP) in Rome for providing us with *Giardia* positive controls (Assemblage A, Assemblage B, and Assemblage E). Some of these results were presented at the 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) conference. 18 April 2020–21 April 2020. Paris, France (abstract no. 4733).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Ryan, U.; Paparini, A.; Oskam, C. New Technologies for Detection of Enteric Parasites. *Trends Parasitol.* **2017**, *33*, 532–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Feng, Y.; Xiao, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 110–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yoder, J.S.; Gargano, J.W.; Wallace, R.M.; Beach, M.J. Giardiasis Surveillance—United States, 2009–2010. *MMWR Surveill. Summ.* **2012**, *61*, 13–23. [[PubMed](#)]
4. Ryan, U.; Cacciò, S.M. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* **2013**, *43*, 943–956. [[CrossRef](#)]
5. Einarsson, E.; Ma’ayeh, S.; Svärd, S.G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *34*, 47–52. [[CrossRef](#)]
6. Colli, C.M.; Bezagio, R.C.; Nishi, L.; Bignotto, T.S.; Ferreira, É.C.; Falavigna-Guilherme, A.L.; Gomes, M.L. Identical assemblage of *Giardia duodenalis* in humans, animals and vegetables in an urban area in Southern Brazil indicates a relationship among them. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0118065. [[CrossRef](#)]

7. Andrews, R.H.; Adams, M.; Boreham, P.F.L.; Melonis, B.P. *Giardia intestinalis*: Electrophoretic Evidence for a Species Complex. *Int. J. Parasitol.* **1989**, *19*, 183–190. [\[CrossRef\]](#)
8. Monis, P.T.; Caccio, S.M.; Thompson, R.C.A. Variation in *Giardia*: Towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* **2009**, *25*, 93–100. [\[CrossRef\]](#)
9. Helmy, Y.A.; Spierling, N.G.; Schmidt, S.; Rosenfeld, U.M.; Reil, D.; Imholt, C.; Jacob, J.; Ulrich, R.G.; Aebischer, T.; Klotz, C. Occurrence and distribution of *Giardia* species in wild rodents in Germany. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 213. [\[CrossRef\]](#)
10. Ankarklev, J.; Svärd, S.G.; Lebbad, M. Allelic sequence heterozygosity in single *Giardia* parasites. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 65. [\[CrossRef\]](#)
11. Thompson, R.C.A.; Ash, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *40*, 315–323. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Wegayehu, T.; Karim, M.R.; Erko, B.; Zhang, L.; Tilahun, G. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from calves in Oromia Special Zone, Central Ethiopia. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *43*, 281–288. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Zahedi, A.; Field, D.; Ryan, U. Molecular typing of *Giardia duodenalis* in humans in Queensland—First report of assemblage E. *Parasitology* **2017**, *114*, 1154–1161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Cacciò, S.M.; Beck, R.; Lalle, M.; Marinculic, A.; Pozio, E. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int. J. Parasitol.* **2008**, *38*, 1523–1531. [\[CrossRef\]](#)
15. Cacciò, S.M.; Thompson, R.C.A.; McLauchlin, J.; Smith, H.V. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* **2005**, *21*, 430–437. [\[CrossRef\]](#)
16. Koehler, A.V.; Jex, A.R.; Haydon, S.R.; Stevens, M.A.; Gasser, R.B. *Giardia*/giardiasis—A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 280–289. [\[CrossRef\]](#)
17. Sulaiman, I.M.; Fayer, R.; Bern, C.; Gilman, R.H.; Trout, J.M.; Schantz, P.M.; Das, P.; Lal, A.A.; Xiao, L. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 1444–1452. [\[CrossRef\]](#)
18. Vanni, I.; Cacciò, S.M.; van Lith, L.; Lebbad, M.; Svärd, S.G.; Pozio, E.; Tosini, F. Detection of *Giardia duodenalis* Assemblages A and B in Human Feces by Simple, Assemblage-Specific PCR Assays. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1776. [\[CrossRef\]](#)
19. Squire, S.A.; Ryan, U. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: Current and future challenges. *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 195. [\[CrossRef\]](#)
20. Lalle, M.; Bruschi, F.; Castagna, B.; Campa, M.; Pozio, E.; Cacciò, S.M. High genetic polymorphism among *Giardia duodenalis* isolates from Sahrawi children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 834–838. [\[CrossRef\]](#)
21. Rebih, N.; Boutaiba, S.; Aboulchamat, G.; Souttou, K.; Hakem, A.; Al Nahhas, S. Molecular and epidemiological characterization of *Giardia intestinalis* assemblages detected in Djelfa, Algeria. *J. Parasit. Dis.* **2020**, *44*, 281–288. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Pipiková, J.; Papajová, I.; Majláthová, V.; Šoltys, J.; Bystrianska, J.; Schusterová, I.; Vargová, V. First report on *Giardia duodenalis* assemblage F in Slovakian children living in poor environmental conditions. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2018**, *53*, 148–156. [\[CrossRef\]](#)
23. Júlio, C.; Vilarés, A.; Oleastro, M.; Ferreira, I.; Gomes, S.; Monteiro, L.; Nunes, B.; Tenreiro, R.; Ngelo, H. Prevalence and risk factors for *Giardia duodenalis* infection among children: A case study in Portugal. *Parasites Vectors* **2012**, *5*, 22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Rudohradská, P.; Halánová, M.; Ravaszová, P.; Goldová, M.; Valenčáková, A.; Halán, M.; Papajová, I.; Pohorencová, A.; Valko, J.; Čisláková, L.; et al. Prevalence of intestinal parasites in children from minority group with low hygienic standards in Slovakia. *Helminthologia* **2012**, *49*, 63–66. [\[CrossRef\]](#)
25. Belkessa, S.; Ait-Salem, E.; Laatamna, A.; Houali, K.; Sönksen, U.W.; Hakem, A.; Bouchene, Z.; Ghalmi, F.; Stensvold, C.R. Prevalence and Clinical Manifestations of *Giardia intestinalis* and Other Intestinal Parasites in Children and Adults in Algeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
26. Andersen, L.O.B.; Röser, D.; Nejsun, P.; Nielsen, H.V.; Stensvold, C.R. Is Supplementary Bead Beating for DNA Extraction from Nematode Eggs by Use of the NucliSENS easyMag Protocol Necessary? *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 1345–1347. [\[CrossRef\]](#)
27. Budding, A.E.; Grasman, M.E.; Lin, F.; Bogaards, J.A.; Soeltan-Kaersenhout, D.J.; Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E.; Van Bodegraven, A.A.; Savelkoul, P.H.M. IS-pro: High-throughput molecular fingerprinting of the intestinal microbiota. *FASEB J.* **2010**, *24*, 4556–4564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Verweij, J.J.; Blange, R.A.; Templeton, K.; Schinkel, J.; Brienens, E.A.T.; Van Rooyen, M.A.A.; Van Lieshout, L.; Polderman, A.M. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Fecal Samples by Using Multiplex Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 1220–1223. [\[CrossRef\]](#)
29. Akinkuotu, O.A.; Takeet, M.I.; Otesile, E.B.; Olufemi, F.; Greenwood, S.J.; McClure, J.T. Prevalence and mulilocus genotypes of *Giardia duodenalis* infecting pigs in Ogun state, Nigeria. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *70*, 53–60. [\[CrossRef\]](#)
30. Akinkuotu, O.A.; Takeet, M.I.; Otesile, E.B.; Olufemi, F.; Greenwood, S.J.; McClure, J.T. Multi-locus genotyping and phylogenetic analyses of *Giardia intestinalis* isolates from indigenous goats in Ogun State, Nigeria. *Acta Trop.* **2019**, *195*, 15–22. [\[CrossRef\]](#)
31. Xiao, L.; Feng, Y. Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food Waterborne Parasitol.* **2017**, *8*, 14–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Beyhan, Y.E.; Taş Cengiz, Z. Comparison of microscopy, ELISA, and real-time PCR for detection of *Giardia intestinalis* in human stool specimens. *Turkish J. Med. Sci.* **2017**, *47*, 1295–1299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Stensvold, C.R.; Nielsen, H.V. Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 540–541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

34. Coppenraet, L.E.S.B.; Wallinga, J.A.; Ruijs, G.J.H.M.; Bruins, M.J.; Verweij, J.J. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 869–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Schuurman, T.; Lankamp, P.; van Belkum, A.; Kooistra-Smid, M.; van Zwet, A. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin. Microbiol. Infect.* **2007**, *13*, 1186–1191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lebbad, M.; Petersson, I.; Karlsson, L.; Botero-Kleiven, S.; Andersson, J.O.; Svenungsson, B.; Svärd, S.G. Multilocus genotyping of human *Giardia* isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1262. [[CrossRef](#)]
37. Sprong, H.; Cacciò, S.M.; Van Der Giessen, J.W.B. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, e558. [[CrossRef](#)]
38. Aguiar, J.M.; Silva, S.O.; dos Santos, V.A.; Taniwaki, S.A.; de Oliveira, T.M.F.S.; Ferreira, H.L.; Keid, L.B.; Gregori, F.; Soares, R.M. Evidence of heterozygosity and recombinant alleles in single cysts of *Giardia duodenalis*. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* **2016**, *25*, 187–195. [[CrossRef](#)]
39. Wielinga, C.M.; Thompson, R.C.A. Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology* **2007**, *134*, 1795–1821. [[CrossRef](#)]
40. Wegayehu, T.; Karim, M.R.; Li, J.; Adamu, H.; Erko, B.; Zhang, L.; Tilahun, G. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from children in Oromia Special Zone, central Ethiopia. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 89. [[CrossRef](#)]
41. Wielinga, C.; Ryan, U.; Andrew Thompson, R.C.; Monis, P. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41*, 495–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lebbad, M.; Ankarklev, J.; Tellez, A.; Leiva, B.; Andersson, J.O.; Svärd, S. Dominance of *Giardia* assemblage B in León, Nicaragua. *Acta Trop.* **2008**, *106*, 44–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gasparinho, C.; Ferreira, F.S.; Mayer, A.C.; Mirante, M.C.; Nery, S.V.; Santos-Reis, A.; Portugal-Calisto, D.; Brito, M. Molecular characterization of *Giardia lamblia* in children less than 5 years of age with diarrhoea attending the Bengo General Hospital, Angola. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *111*, 497–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ferreira, F.S.; Centeno-Lima, S.; Gomes, J.; Rosa, F.; Rosado, V.; Parreira, R.; Cravo, L.; Atouguia, J.; Távora Tavira, L. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children from the Cufada Lagoon Natural Park, Guinea-Bissau. *Parasitol. Res.* **2012**, *111*, 2173–2177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Table S1. Summary of the results obtained using real-time PCR, assemblage-specific PCR, and *tpi* gene analysis of *Giardia*-positive samples collected from two separate geographical areas in Algeria, previously tested positive for intestinal parasites by microscopy of fecal concentrates and preserved in either potassium dichromate 2.5% or ethanol 70% prior to analysis.

Sample ID	Date of sampling	Location	Preserving medium	Sex	Age group	Microscopy for <i>Giardia duodenalis</i>	Real-time PCR results (Ct value)	Assemblage-specific PCR result	<i>tpi</i> result
ALG-001	25/03/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	16.75	Assemblage B + other band(s)	Assemblage A
ALG-002	05/03/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Adult	Positive	19.27	Negative	Assemblage A
ALG-003	03/09/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Undetermined	Positive	19.87	Assemblage B	Assemblage B
ALG-004	01/02/2016	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Undetermined	Positive	20.16	Assemblage A	Assemblage A
ALG-005	14/11/2018	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	20.93	Negative	Assemblage A
ALG-006	19/01/2017	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Undetermined	Undetermined	Positive	20.96	Negative	Assemblage A
ALG-007	10/09/2017	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Undetermined	Positive	21.1	Negative	Assemblage B
ALG-008	27/08/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Undetermined	Positive	21.11	Assemblage B	Assemblage B
ALG-009	19/12/2016	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Undetermined	Positive	21.11	Negative	Assemblage A
ALG-0010	11/03/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Adult	Positive	21.55	Negative	Assemblage A
ALG-0011	02/04/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	22.16	Assemblage B	Not performed
ALG-0012	18/09/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	22.17	Assemblage B	Not performed
ALG-0013	28/01/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Undetermined	Positive	22.49	Negative	Assemblage A
ALG-0014	08/10/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Adult	Positive	22.54	Assemblage B	Not performed
ALG-0015	06/11/2017	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Undetermined	Positive	22.56	Negative	Assemblage A
ALG-0016	02/04/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	22.78	Assemblage B + other band(s)	Assemblage A
ALG-0017	31/05/2018	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	22.79	Assemblage B + other band(s)	Assemblage B
ALG-0018	19/09/2017	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	22.79	Negative	Assemblage A
ALG-0019	07/01/2016	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Undetermined	Positive	22.97	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0020	03/10/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Undetermined	Positive	23.07	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0021	25/02/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	23.25	Assemblage B + other band(s)	Assemblage A
ALG-0022	26/03/2018	Tolga Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Negative	23.42	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0023	05/03/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	23.56	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0024	27/03/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	23.6	Negative	Not performed
ALG-0025	24/03/2018	Tolga Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Negative	23.61	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0026	23/04/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	23.71	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0027	03/12/2017	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	23.8	Negative	Assemblage A
ALG-0028	26/02/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Adult	Positive	23.91	Assemblage A	Assemblage A
ALG-0029	13/02/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	24.24	Negative	Assemblage A
ALG-0030	25/01/2016	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Undetermined	Positive	24.26	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0031	24/03/2018	Tolga Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Negative	24.32	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0032	27/04/2018	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	24.81	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0033	27/03/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	25.02	Negative	Assemblage A
ALG-0034	25/03/2018	Tolga Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Negative	25.12	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0035	31/03/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Undetermined	Undetermined	Positive	25.5	Assemblage B + other band(s)	Assemblage B
ALG-0036	21/08/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Undetermined	Positive	25.5	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0037	24/03/2018	Tolga Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Negative	25.59	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0038	10/04/2018	Tolga Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	25.84	Negative	Assemblage B
ALG-0039	01/10/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	26.24	Negative	Assemblage A
ALG-0040	22/05/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	26.42	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0041	27/03/2018	Tolga Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Adult	Negative	26.7	Negative	Assemblage B

ALG-0042	27/03/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Adult	Positive	26.73	Assemblage A	Assemblage A
ALG-0043	21/08/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Negative	26.75	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0044	03/09/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	26.76	Assemblage B + other band(s)	Assemblage B
ALG-0045	02/09/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Adult	Positive	27.4	Assemblage B + other band(s)	Assemblage A
ALG-0046	27/03/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Adult	Positive	27.92	Assemblage A	Assemblage A
ALG-0047	05/04/2016	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Undetermined	Positive	28	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0048	27/03/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	28.36	Assemblage B	Assemblage B
ALG-0049	16/09/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	28.41	Negative	Assemblage A
ALG-0050	06/10/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	29.5	Negative	Assemblage B
ALG-0051	01/08/2016	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Undetermined	Positive	29.76	Negative	Assemblage B
ALG-0052	14/04/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	30.03	Negative	Not performed
ALG-0053	28/12/2016	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Male	Undetermined	Negative	30.44	Negative	Assemblage A
ALG-0054	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Undetermined	Positive	30.49	Negative	Not performed
ALG-0055	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Positive	30.86	Negative	Not performed
ALG-0056	14/02/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Adult	Positive	30.98	Negative	Not performed
ALG-0057	10/04/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	31.1	Negative	Not performed
ALG-0058	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Undetermined	Positive	31.76	Negative	Not performed
ALG-0059	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Female	Undetermined	Positive	32.18	Negative	Not performed
ALG-0060	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Undetermined	Positive	32.21	Negative	Not performed
ALG-0061	22/09/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	32.23	Other bands	Not performed
ALG-0062	08/04/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Male	Child	Positive	32.27	Negative	Not performed
ALG-0063	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Female	Undetermined	Negative	33.54	Negative	Not performed
ALG-0064	03/10/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Female	Adult	Negative	33.84	Negative	Not performed
ALG-0065	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Undetermined	Positive	34.15	Negative	Not performed
ALG-0066	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Female	Undetermined	Negative	34.22	Negative	Not performed
ALG-0067	15/05/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Positive	35.88	Negative	Not performed
ALG-0068	26/02/2018	Tolga Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Adult	Positive	35.93	Negative	Not performed
ALG-0069	23/07/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Positive	36.68	Negative	Not performed
ALG-0070	Undetermined	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Undetermined	Undetermined	Positive	36.71	Negative	Not performed
ALG-0071	08/10/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Positive	36.89	Negative	Not performed
ALG-0072	10/10/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Negative	37.15	Negative	Not performed
ALG-0073	27/05/2013	CHU Issad Hassani, Beni Messous - Algiers	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Positive	37.43	Negative	Not performed
ALG-0074	21/10/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Positive	37.47	Negative	Not performed
ALG-0075	04/04/2018	Doctor Saadane Hospital - Biskra	Potassium dichromate 2.5%	Female	Child	Negative	38	Negative	Not performed
ALG-0076	03/07/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Positive	38.39	Negative	Not performed
ALG-0077	24/07/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Female	Child	Positive	39.1	Negative	Not performed
ALG-0078	02/05/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Positive	39.93	Negative	Not performed
ALG-0079	10/10/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Male	Child	Negative	39.97	Negative	Not performed
ALG-0080	26/06/2018	CHU Nafissa Hamoud, Hussein Dey - Algiers	Ethanol 70%	Female	Child	Positive	41.51	Negative	Not performed

Table S2. Comparative analysis of the extent of allelic sequence heterozygosity in the *tpi* gene of *Giardia duodenalis* Assemblage B identified in the study.

Assemblage/Subtype	Material	Nucleotide position from the beginning of the gene																				
		77	91*	105	111	121	132	141	162	165*	168*	205	216	261	271	280	297	312	333	407	429	448
BIII/ 2924 (AY228628)		C	C	G	G	G	C	C	G	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
BIV/Ad-19 (AF069560)		C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-003	Stool sample	C	C	G	G	G	C	Y	R	C	Y	C	C	G	Y	R	R	C	Y	A	G	G
ALG-007	Stool sample	C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-008	Stool sample	C	C	G	G	G	C	Y	R	Y	Y	C	C	G	Y	R	R	C	Y	A	G	G
ALG-0017	Stool sample	C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-0019	Stool sample	C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-0020	Stool sample	C	Y	G	R	R	C	C	G	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0022	Stool sample	Y	C	G	G	G	C	C	R	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0023	Stool sample	C	Y	R	G	G	C	C	R	C	C	C	C	G	C	A	A	Y	T	A	G	R
ALG-0025	Stool sample	Y	C	G	G	G	C	C	R	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0026	Stool sample	C	T	G	G	G	C	C	G	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0030	Stool sample	C	C	G	G	G	C	C	R	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0031	Stool sample	Y	C	G	G	G	C	C	R	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0032	Stool sample	C	Y	G	G	G	C	C	R	C	C	Y	C	G	C	A	R	C	Y	A	G	G
ALG-0034	Stool sample	T	C	G	G	G	C	C	A	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0035	Stool sample	C	C	G	G	G	C	C	R	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0036	Stool sample	C	T	G	G	G	C	C	A	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0037	Stool sample	Y	C	G	G	G	C	C	R	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0038	Stool sample	C	C	G	G	G	C	C	G	C	C	C	Y	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0040	Stool sample	C	T	G	G	G	C	C	G	T	T	C	C	G	C	A	A	C	T	A	A	G
ALG-0041	Stool sample	C	C	G	G	G	Y	C	G	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0043	Stool sample	C	C	G	G	G	C	C	R	C	C	C	C	G	Y	R	R	C	Y	A	G	G
ALG-0044	Stool sample	C	C	G	G	G	C	C	R	Y	C	C	C	G	C	A	A	C	T	W	G	G
ALG-0047	Stool sample	C	C	G	G	G	C	C	R	C	C	C	C	R	C	A	A	Y	T	A	G	G
ALG-0048	Stool sample	C	C	G	G	G	C	C	G	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0050	Stool sample	C	C	G	G	G	C	C	G	C	C	C	C	G	C	A	A	C	T	A	G	G
ALG-0051	Stool sample	C	T	G	G	G	C	C	G	Y	Y	C	C	G	C	A	A	C	T	A	R	G

Keys: Asterisks (*) represent a substitution patterns suggested as markers for distinct *Giardia* assemblages B subtypes [10,39].

Table S3. Comparative sequence analysis of expressed amino acid substitutions in the *tpi* gene of *Giardia duodenalis* Assemblage B samples identified in the study. Only samples with double peaks resulting in the existence of non-synonymous substitutions were included.

Amino acid position from the beginning of the <i>tpi</i> gene								
Amino acid sequences	26	31	41	87	91	94	136	150
<i>tpi</i> reference sequence (GenBank Accession no. KP687784)	A	Y	V	M	H	I	K	A
ALG-003	A	H	V	M	(H ↔ Y)	(I ↔ V)	K	A
ALG-008	A	H	V	M	(H ↔ Y)	(I ↔ V)	K	A
ALG-0020	A	(H ↔ Y)	(I ↔ V)	M	H	I	K	A
ALG-0022	(A ↔ V)	H	V	M	H	I	K	A
ALG-0023	A	(H ↔ Y)	V	M	H	I	K	(T ↔ A)
ALG-0025	(A ↔ V)	H	V	M	H	I	K	A
ALG-0031	(A ↔ V)	H	V	M	H	I	K	A
ALG-0032	A	(H ↔ Y)	V	M	H	I	K	A
ALG-0037	(A ↔ V)	H	V	M	H	I	K	A
ALG-0043	A	H	V	M	(H ↔ Y)	(I ↔ V)	K	A
ALG-0044	A	H	V	M	H	I	(K ↔ M)	A
ALG-0047	A	H	V	(I ↔ M)	H	I	K	A

Alignment analysis of the translated nucleotides sequences into amino acid with the complete *tpi* gene reference sequence (GenBank accession no: KP687784.1) indicated that the samples ALG-003, ALG-008, and ALG-0043 had two expressed substitutions of amino acid at positions 91 (H ↔ Y) and 94 (I ↔ V) resulting in replacement of amino acid Histidine to Tyrosine, and Isoleucine to Valine, respectively. Sample ALG-0020 had two expressed substitutions at positions 31 of amino acid (H ↔ Y) and 41 (I ↔ V) inducing replacement of amino acid Histidine to Tyrosine and Isoleucine to Valine, respectively. Samples ALG-0022, ALG-0025, ALG-0031, and ALG-0037 indicated one expressed substitution at position 26 (A ↔ V) triggering a change of amino acid Alanine to Valine. Sample ALG-0023 exhibited two expressed substitutions at positions 31 (H ↔ Y) and 150 (T ↔ A) causing a change of amino acid Histidine to Tyrosine and Threonine to Alanine. Samples ALG-0032, ALG-0044, and ALG-0047 had one expressed substitution at positions 31 (H ↔ Y), 136 (K ↔ M), and 87 (I ↔ M) leading change of amino acid Histidine to Tyrosine, Lysine to Methionine, and Isoleucine to Methionine, respectively. All the replacements of amino acids are reversible.