

**Rapport annuel
d'activité**

2019

**Centre de national de
référence – laboratoire
Expert Cryptosporidioses**

**Année d'exercice
2018**

Résumé analytique en français

Le CNR-Laboratoire expert cryptosporidioses (CNR-LE) a été désigné en 2017 dans le but d'identifier et de caractériser les souches adressées par les laboratoires de Biologie médicale correspondants, de contribuer à l'évaluation et à la diffusion de techniques diagnostiques, d'apporter son expertise pour le diagnostic moléculaire, de développer un Réseau de laboratoires déclarants, et d'alerter les autorités sanitaires en cas d'épidémies.

En 2018, le CNR-LE et le laboratoire collaborateur ont réalisé l'évaluation des trousseaux FTD Stool parasites de la société Launch, et Viasure de la société CerTEst Biotec et ont participé à des études d'évaluations de PCR multiplex et de détection rapide antigénique. Des formations spécialisées portant sur la recherche microscopique des coccidies par la méthode de Heine et sur leur caractérisation moléculaire ont été dispensées par le CNR-LE aux collègues du CHU de Dijon et du CH de Valenciennes, ainsi qu'à des collègues universitaires algériens et éthiopiens.

Au cours de l'année 2018, la collection biologique du CNR-LE s'est enrichie de 342 nouveaux prélèvements (226 au CNR-LE et 116 au centre collaborateur) dont 244 prélèvements ont été caractérisés (175 pour le CNR-LE et 69 pour le centre collaborateur). Les activités d'expertises ont concerné 17 prélèvements, les activités de surveillance 246 prélèvements et les investigations d'épidémies 79 prélèvements.

Pour l'année 2018, 5 laboratoires ont rejoint le réseau des laboratoires déclarants leurs cas de cryptosporidioses. En ce qui concerne l'activité de surveillance, 38/53 laboratoires du réseau ont diagnostiqué 323 cas de cryptosporidioses. Parmi ceux-ci, 310 cas ont été déclarés avec envoi de 251 selles au CNR-LE et au laboratoire collaborateur. Parmi les facteurs de risque identifiés, 24% des patients ont pu contracter l'infection lors d'une baignade 17% ont contracté leur infection à l'étranger, 14% étaient en contact avec un patient diarrhéique, 11% étaient en contact avec des animaux de rente potentiellement contaminés, et 8% ont pu se contaminer en ingérant un aliment contaminé.

Cinquante neuf pour cent des patients avec une cryptosporidiose déclarée étaient immunocompétents. Parmi les patients immunocompromis, 58% étaient des transplantés d'organes solides, et 15% étaient infectés par le VIH. La moitié des patients ont été hospitalisés et parmi eux, 62% l'étaient du fait de leur cryptosporidiose. Trois patients atteints de cryptosporidiose sont décédés.

L'exploration de l'épidémie de Nantes a été complétée en 2018 (analyse des souches « environnementales »). Une épidémie en Guyane a été explorée de même que des cas groupés à Strasbourg. Enfin, 2 suspicions d'épidémies ont été écartées.

Le CNR-LE a poursuivi en 2018 son activité de recherche, en particulier sur la circulation des *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement.

Résumé analytique en anglais

The CNR-Laboratoire expert cryptosporidioses (CNR-LE) was designated in 2017 to identify and characterize isolates addressed by corresponding Clinical Biology laboratories, to contribute to the evaluation and dissemination of diagnostic techniques, to provide expertise in molecular diagnosis, to develop a Network of reporting laboratories, and to alert health authorities in the event of outbreaks.

In 2018, the CNR-LE and the partner laboratory have evaluated FTD Stool parasites kit (Launch Diagnostics) and Viasure kits (CerTEst Biotec). They have participated to the evaluation of multiplex PCR and quick antigen detection kits. Specialized courses on the microscopic detection of *Coccidia* using Heine's method and their molecular characterization were provided by the CNR-LE to colleagues from CHU of Dijon and CH of Valenciennes, as well as Algerian and Ethiopian colleagues.

In 2018, the CNR-LE's biological collection was enriched by 342 new samples (226 for the CNR-LE and 116 for the partner laboratory), of which 244 have been characterized (175 for the CNR-LE and 69 for the partner laboratory) and 17 samples were received for expertise, 246 for epidemiological surveillance and 79 for outbreak investigation.

In 2018, 5 laboratories have joined the Network of laboratories notifying cryptosporidiosis cases. Concerning the surveillance activity, 38/53 laboratories of the Network diagnosed 323 cryptosporidiosis cases. Of those, 310 were reported with 251 stool samples sent to CNR-LE and the partner laboratory. As regards risk factors, 17% percent of patients were infected abroad, 14% had contact with a diarrheic patient, 11% had contact with potentially contaminated livestock, 24% could be infected due to recreational waters, and 8% consumed potentially contaminated food.

Fourty nine percent of patients reported with cryptosporidiosis were immunocompetent. Among immunocompromised patients, 58% had a solid organ transplant and 15% had HIV infection. Overall, half of the patients were hospitalized, 62% because of their cryptosporidiosis. Three cryptosporidiosis patients died.

The investigation of the Nantes outbreak was completed in 2018 (analysis of "environmental" isolates). One outbreak was investigated in Guyana as well as clustered cases in Strasbourg and an outbreak has been ruled out on 2 occasions.

The CNR-LE continued its research activity particularly on the environmental circulation of *Cryptosporidium* spp.

1 Organigramme

Sur la demande du comité des CNR, un partage des tâches a été défini avec le laboratoire collaborateur du CHU de Dijon. Ainsi, il a été décidé qu'en ce qui concerne l'expertise et la caractérisation des isolats, les laboratoires correspondants du sud de la Loire adresseraient leurs prélèvements au laboratoire collaborateur de Dijon alors que les laboratoires du Nord de la Loire continueraient à adresser leurs prélèvements au CNR-LE.

CNR-LE Cryptosporidiose

Institut de Biologie Clinique (UF 2416)

CHU C. Nicolle de Rouen

Equipe du CNR-LE :

Personnel Médical :

Pr. L. Favennec Biologiste Responsable, Docteur en Médecine, Docteur en Pharmacie,

Dr. D. Costa, 0.3 ETP Docteur en Pharmacie, responsable Adjoint, CHU de Rouen

Dr. G. Gargala Docteur en médecine, 0.2 ETP, CHU de Rouen

Centre collaborateur de CNR-LE :

Laboratoire de Biologie et de Pathologie du CHU de Dijon

Responsable du centre collaborateur : Pr. F. Dalle

Responsable adjoint du laboratoire collaborateur : Dr. S Valot

Biologistes : Dr L. Basmacyan, Dr M. Sautour

En 2017, le laboratoire CNR-LE a été accrédité COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 sur la ligne de portée PM7 (renommée aujourd'hui MG 11 selon le SH INF 50 en vigueur) comprenant la recherche des cryptosporidies dans les selles par examen microscopique. Le dossier de validation de méthode concernant les activités d'expertise de biologie moléculaire du CNR-LE est désormais terminé. Le COFRAC évaluera les analyses concernées par les lignes de portée PM4 et PM5 du SH INF 50 en vigueur lors de sa prochaine visite.

Le site internet du CNR-LE a été mis en place dès le premier semestre 2018 (<https://cnrcryptosporidioses.chu-rouen.fr/>).

2 – Activités d'expertise

1/ Le CNR-LE a mis au point une technique de qPCR sur culture cellulaire afin d'évaluer l'infectivité des oocystes isolés à partir d'échantillons (fécales ou environnementaux). L'utilisation du séquençage à haut débit pour la caractérisation génétique des oocystes de *Cryptosporidium* est actuellement en développement.

2/ Le CNR-LE participe au groupe de travail de l'European Study Group for Clinical Parasitology animée par le Dr Titia Kortbeek (RIVM, Institut national de Santé publique, Centre de contrôle des maladies infectieuses, Utrecht, Pays Bas) en vue de la rédaction de recommandations consensuelles au niveau européen pour le diagnostic coprologique parasitaire.

3/ Le CNR-LE et le laboratoire collaborateur ont réalisé (ou participé à) l'évaluation de plusieurs techniques de diagnostic microscopique, antigénique ou par génétique moléculaire de la cryptosporidiose (FTD Stool parasite, Viasure...).

4/ En 2018, la collection biologique du CNR a été enrichie de 244 prélèvements caractérisés (175 pour le CNR-LE et 69 pour le centre collaborateur) pour un total de 342 prélèvements reçus (226 au CNR-LE et 116 au centre collaborateur).

2.1 Évolutions des techniques

1/ Le CNR-LE a mis au point une technique de PCR quantitative sur culture cellulaire afin d'évaluer l'infectivité des oocystes. *Cryptosporidium* spp. étant un parasite intracellulaire obligatoire, les parasites vivants se multiplient en culture cellulaire, mais non en l'absence de cellules. Ainsi, l'infectivité peut être mesurée par PCR 48h après mise en culture d'oocystes par la différence entre les valeurs de Ct (cycle threshold) obtenues pour des cultures en présence et des cultures en absence de cellules hôtes (HCT-8), cette différence reflétant la multiplication des parasites en culture cellulaire.

2/ Une évaluation de plusieurs techniques d'extraction d'ADN de *Cryptosporidium* spp. déjà utilisée en routine par plusieurs centres partenaires est actuellement en cours afin d'aboutir à des recommandations sur la technique optimale d'extraction à utiliser.

3/ L'utilisation du séquençage à haut débit pour la caractérisation génétique des oocystes de *Cryptosporidium* est actuellement en développement.

Le CNR-LE participe au groupe de travail de l'European Study Group for Clinical Parasitology animé par le Dr Titia Kortbeek (RIVM, Institut national de santé publique, Centre de contrôle des maladies infectieuses, Utrecht, Pays Bas) en vue de la rédaction de recommandations consensuelles au niveau européen pour le diagnostic coprologique parasitaire.

Concernant le laboratoire collaborateur, dans l'objectif de disposer d'une technique de diagnostic permettant l'identification des différentes espèces rencontrées en France sans avoir recours aux méthodes de séquençage des acides nucléiques, une optimisation des outils de manière à pouvoir identifier les différentes espèces de *Cryptosporidium* spp. en une seule étape en utilisant le polymorphisme de la région hypervariable de l'ARNr 18S. L'amplification d'un fragment de 260 pb et l'utilisation de sondes d'hybridation permet ainsi la détection de

Cryptosporidium spp. La réalisation d'une courbe de fusion permet l'identification des différentes espèces de *Cryptosporidium* sp. (dont *C. hominis/cuniculus*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. ubiquitum*, *C. felis* et *C. canis*, lesquelles sont les espèces classiquement isolées.

La limite de cette technique est son impossibilité de distinguer *C. hominis* de *C. cuniculus*, ces deux espèces présentant une courbe de fusion identique par la méthode que nous utilisons. Dans ce contexte, nous avons développé une technique d'amplification du gène codant la GP60, glycoprotéine de surface de *Cryptosporidium cuniculus*, laquelle permet une identification rapide des variants A et B de *Cryptosporidium cuniculus*, sans croisement avec les autres espèces dont *C. hominis*. Dans cette technique adaptée de Hadfield SJ et al., les produits de PCR sont marqués au SYBRGreen et une courbe de fusion réalisée en haute résolution permet de confirmer l'espèce et le variant grâce à un Tm spécifique. Ainsi, chaque fois que nous identifions *C. hominis/C. cuniculus* par la technique précédente, la PCR *Cryptosporidium* ciblant le gène GP60 est utilisée pour la différenciation de ces deux espèces. Enfin, dans un but d'harmonisation des approches de génotypage de *Cryptosporidium parvum* et de *C. hominis* avec le CNR-LE (CHU Rouen), nous avons optimisé nos techniques de génotypage basées sur l'analyse de séquences de microsatellites situés dans le gène codant la GP60, de façon à être en conformité avec les techniques utilisées par le CNR-LE du CHU de Rouen (Pr L Favennec).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

1/ CNR-LE

2.2.1 Le kit FTD Stool parasites® de la société Launch a été évalué. Il s'agit d'un kit pcr triplex permettant la recherche d'ADN d'*Entamoeba histolytica*, de *Giardia lamblia* et de *Cryptosporidium* spp.. Au total, 27 extraits d'ADN ont été testés : une gamme de concentration en *C. parvum* ($10^5/10^4/10^3/10^2/10/1$ oocystes/mL), 4 *C. hominis*, 1 *C. felis*, 1 *C. canis*, 1 *C. xiaoi*, 1 *C. ubiquitum*, 5 *Giardia lamblia*, 3 *E. histolytica/dispar* et 5 mélanges. Les résultats sont très satisfaisants : à l'exception de l'ADN de *C. xiaoi* (espèce infectant le mouton et la chèvre) qui n'a pas été détecté, tous les autres résultats sont conformes aux attentes. La détection de la gamme de concentration est optimale : détection d'ADN au point le plus faiblement concentré (1 oocyste/mL) et absence de détection au témoin négatif. En conclusion, il s'agit d'un kit qui répond de façon satisfaisante aux attentes du diagnostic moléculaire de la cryptosporidiose.

2.2.2. En juin 2018, un contrôle inter-laboratoires constitué de 3 échantillons de selles infectées par *Cryptosporidium* spp. (1 fortement positive (160 oocystes par champ microscopique(X40), 1 faiblement positive (1 oocyste/50 champs microscopiques (x40), 1 négative) et de 2 extraits d'ADN de *Cryptosporidium* spp. ont été adressés à 44 laboratoires volontaires du Réseau. La technique de Ziehl modifiée a été utilisée seule ou en association par 32 laboratoires. Pour la selle fortement concentrée, 100% des réponses étaient conformes; pour la selle négative, 1 laboratoire a rendu un résultat positif, et pour la selle faiblement concentrée, seulement 13/32 laboratoires ont rendus un résultat positif (soit de l'ordre de 60% d'erreurs). Les techniques de recherche d'antigène ont donné des résultats pleinement satisfaisants pour la selle fortement concentrée et la selle négative mais aucun des tests antigéniques réalisés ne s'est avéré positif sur la selle faiblement concentrée, ce qui révèle les limitations de ces techniques. A l'exception d'1 résultat obtenu à partir d'1 extrait d'ADN, tous les résultats obtenus en PCR étaient pleinement en accord avec le résultat attendu. On note d'ailleurs une très grande diversité entre laboratoires des pratiques de mise en évidence de l'ADN parasitaire, que ce soit en terme d'extraction ou de détection. Il en ressort donc la nécessité d'établir des recommandations vis à vis des procédures d'extraction ou de détection à utiliser dans le diagnostic moléculaire de la cryptosporidiose.

2/ CNR-LE Laboratoire collaborateur

2/1. Le laboratoire collaborateur du CNR-LE a participé à l'évaluation de tests rapides de diagnostic de cryptosporidiose par détection d'antigènes de *Cryptosporidium* spp. dans les échantillons fécaux. La contribution du laboratoire collaborateur visait à confirmer/infirmier par

techniques moléculaires les discordances observées lors de l'évaluation de ces tests rapides (Goudal et al., 2019).

2/2. Il a participé à l'évaluation de kits multiplex de PCR pour diagnostic de parasitoses digestives incluant *Cryptosporidium* sp. dans les échantillons fécaux. La contribution du laboratoire collaborateur visait à confirmer/infirmier par techniques moléculaires les discordances observées lors de l'évaluation de ces différents kits. Morio et al., 2018.

Evaluation des Kits VIASURE™ simplex et multiplex pour la détection de *Cryptosporidium* sp., *Giardia intestinalis* et *Entamoeba histolytica* dans des échantillons de selles. L'objectif de ce travail était de comparer les performances de différentes trousse commerciales de PCR simplex et multiplex pour la détection de *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* et *Cryptosporidium* sp.. Au total, 164 échantillons de selles, issus des collections (i) du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Dijon, (ii) du réseau Crypto-Anofel et (iii) du CNR-LE Cryptosporidioses, ont été inclus dans l'étude : (i) 90 échantillons négatifs à l'examen microscopique (i.e. 30 échantillons négatifs pour l'ensemble des parasites et 60 échantillons positifs pour un parasite (parmi un panel de 12 parasites protozoaires ou helminthes) autre que *G. intestinalis*, *E. histolytica/dispar* et *Cryptosporidium* sp., ainsi que (ii) 74 échantillons positifs à l'examen direct microscopique (i.e. 29 échantillons positifs à *G. intestinalis*, 8 échantillons positifs à *E. histolytica*, 14 échantillons positifs à *E. dispar*, 8 échantillons positifs à *C. hominis*, 7 échantillons positifs à *C. parvum*, 3 échantillons positifs à *C. felis*, 2 échantillons positifs à *C. canis*, 2 échantillons positifs à *C. ubiquitum* et 2 échantillons positifs à *C. meleagridis*). L'ensemble des échantillons a été extrait selon le protocole d'extraction BIOMERIEUX NucliSENS®easyFranceLyon, France) adapté à l'extraction des parasites dans les échantillons fécaux, avant d'être testé par 10 PCR différentes: (1) PCR simplex *Giardia* sp. CHU de Dijon, (2) PCR simplex *Giardia* sp. CERTEST VIASURE™ (San Mateo de Gállego Zaragoza, Spain), (3) PCR simplex *Cryptosporidium* sp. CHU de Dijon, (4) PCR simplex *Cryptosporidium* sp. CERTEST VIASURE™, (5) PCR simplex *Entamoeba* sp. CHU de Dijon, (6) PCR simplex *Entamoeba histolytica* CERTEST VIASURE™, (7) PCR simplex *Entamoeba dispar* CERTEST VIASURE™, (8) PCR multiplex *Giardia/Entamoeba/Cryptosporidium* CERTEST VIASURE™, (9) PCR multiplex *Giardia/Entamoeba/Cryptosporidium* DIAGENODE Gastroenteritis/Parasite France™ (Liège, Belgique), (10) PCR multiplex *Giardia/Entamoeba/Cryptosporidium* FAST-TRACK Diagnostics FTD Stool ParaFrancech-sur-Alzette, Luxembourg). Les kits de PCR avaient une meilleure sensibilité de détection en comparaison aux méthodes microscopiques. Parmi les 10 PCR testées, les PCR simplex (i.e. 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7) ont présenté une efficacité similaire mais avaient une meilleure sensibilité que les PCR multiplex (i.e. 8, 9 et 10). Un manuscrit portant sur ces travaux est en cours de soumission.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

2.3.1. Une formation à la détection microscopique de *Cryptosporidium* spp. selon la technique de Heine a été dispensée par le CNR-LE aux collègues du CHU de Dijon (Biologiste + Technicienne de laboratoire) et du CHG de Valenciennes (Biologiste). Cette technique plus sensible que la méthode de coloration décrite par Henricksen a été ensuite mise en place dans les centres formés.

2.3.2. Une formation à l'extraction d'ADN et à l'analyse des échantillons en qPCR et en génotypage a été dispensée par le CNR-LE à des collègues algériens (Dr Semmani, Hôpital Universitaire d'Alger et Dr Benallah (Ecole Vétérinaire d'Alger) et éthiopiens (Dr Wortea, Addis abbeba University). Ceci a abouti à la rédaction de plusieurs articles scientifiques en cours de soumission.

2.4 Collections de matériel biologique

Au cours de l'année 2018, la collection biologique du CNR-LE a été enrichie de 244 prélèvements caractérisés (175 pour le CNR-LE et 69 pour le laboratoire collaborateur) pour un total de 342 prélèvements reçus pour analyse (226 au CNR-LE et 116 au laboratoire collaborateur).

Les souches sont actuellement conservées dans une solution aqueuse de K₂CrO₇ à 2.5% à +5°C/- 3°C et par congélation de selles fraîches dans l'azote liquide, conditions optimales pour leur conservation. Une déclaration de collection est actuellement en cours et les souches recueillies via le Réseau du CNR-LE sont conservées par le Centre de ressource biologique certifié du CHU de Rouen. Concernant le centre collaborateur, les souches sont conservées par le Centre de ressource biologique certifié du CHU de Dijon.

Dans le cadre de la surveillance, les séquences de *gp60* sont établies pour tous les prélèvements reconnus positifs pour *gp60* (244 séquences en 2018). Ces séquences sont en attente d'attribution de numéro d'accès sur GenBank.

2.5. Activités d'expertise

2.5.1. Activité du CNR-LE

Bilan quantitatif des activités d'expertise, de surveillance et d'explorations d'épidémies en 2018.

Activité d'expertise

Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hôpital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
3	Saint Valery en Caux	France	Spéciation et génotypage
1	CHU Bordeaux	France	Spéciation et génotypage
1	APHP	France	Spéciation et génotypage
3	Saint Valery en Caux	France	Suivi excrétion parasitaire en spéciation

Activité de surveillance

Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hôpital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
259	CHU ; LABM	France	Spéciation et génotypage

Exploration d'épidémies

Nombre de prélèvements reçus au CNR-LE	Provenance (LABM, Hôpital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
6 (épidémie de Nantes)	ddpp 44	France	Spéciation et génotypage
4 (épidémie armée Française au Liban)	Begin	France	Spéciation et génotypage
13 (filtre eaux épidémie Guyane)	Guyane	France	Spéciation et génotypage
6 (épidémie (Ile d'Yeu))	ddpp 44	France	Spéciation et génotypage

2.5.2. Activités du laboratoire collaborateur

En 2018, la collection biologique du laboratoire collaborateur du CNR-LE s'est enrichie de 69 nouveaux isolats pour 116 prélèvements traités (9 reçus pour expertise, 57 dans le cadre de la surveillance épidémiologique, 19 dans le cadre d'épidémies et 30 dans le cadre d'investigation d'épidémies de GEI par consommation de fruits de mer). 28 échantillons qui ont été déclarés n'ont pas encore été transmis à ce jour par les laboratoires déclarant mais seront réalisés courant 2019.

Les analyses de ces données à des fins de surveillance seront détaillées dans les chapitres 3.1 et 3.2.

Le délai moyen de restitution des résultats (CNR-LE et laboratoire collaborateur) aux laboratoires du réseau de surveillance est d'une semaine (spéciation) à deux semaines (génotypage).

2.6 Activités de séquençage

2.6.1. Le CNR-LE a quotidiennement accès à la plateforme de séquençage de l'IRIB, UFR Santé Université de Rouen Normandie (Séquenceur Sanger 3500 XL Genetic analyzer Applied Biosystem, Hitachi; Séquenceur à haut débit Illumina). Il a accès en interne à une expertise « bio-informatique » et à des outils d'analyse de séquences (Bionumerics), ce qui lui permet de réaliser "en première ligne" les analyses bio-informatiques (analyse phylogénétique, cgMLST, génotypage *gp60*) sur l'ensemble des isolats reçus. Les séquences brutes sont déposées en temps réel à l'ENA sans metadata associés.

Le Laboratoire collaborateur du CNR-LE a accès quotidiennement à la plateforme de séquençage du pôle de biologie du CHU de Dijon (Séquenceur Sanger Genetic analyzer 3130 XL, Applied Biosystem ; Séquenceur à haut débit MiSeq et NextSeq, Illumina). Il a accès en interne à une expertise bio-informatique qui lui permet de réaliser "en première ligne" les analyses bio-informatiques (analyse phylogénétique, cgMLST, génotypage *gp60*) sur l'ensemble des isolats reçus

2.6.2. Activité du CNR-LE

2.6.2.1 La poursuite des investigations sur l'épidémie de Nantes, a comporté en 2018 6 séquençages du microsatellite *gp60* puis du microsatellite *msc 6-7* réalisées sur des prélèvements positifs provenant d'animaux présents dans l'élevage bovin produisant le fromage blanc suspect d'être à l'origine de l'épidémie. Cela a permis d'étayer l'hypothèse d'une contamination par ce fromage (Cf. annexe 3).

2.6.2.2 Concernant la suspicion d'épidémie de gastroentérites survenue au sein de l'armée Française en mission au Liban : sur les 4 échantillons reçus, tous ce sont révélés positifs en *Cryptosporidium* sp. mais 3 génotypes *gp60* ont pu être identifiés et étaient tous différents (IlaA13G2R1, IdA13, IlaA16G1R1).

2.6.2.3 Les analyses réalisées dans le cadre des investigations de l'épidémie de cryptosporidiose humaine survenue en Guyane, les analyses sur les échantillons d'eaux ont révélé la présence d'ADN de *Cryptosporidium* spp. par qPCR ($Ct > 33.98$) dans 4 des 13 échantillons reçus.

2.6.2.4 A la suite d'une suspicion d'épidémie de diarrhée sur l'île d'Yeu en août 2019, la recherche de *Cryptosporidium* spp. sur les 6 prélèvements reçus se sont avérés négatifs. En revanche, il se sont révélés positifs pour la recherche d'*Enterocytozoon bienewisi*, génotype C (génotypage réalisé par P. Poirier, CHU de Clermont Ferrand). La recherche de microsporidies sur des échantillons d'eaux prélevés au niveau du château d'eau de l'île d'Yeu se sont révélés négatifs.

2.6.3 Activité du Laboratoire collaborateur

Lors de l'épidémie de Cayenne, 16 séquençages du microsatellite *gp60* ont été réalisés sur des prélèvements positifs à partir d'échantillons de selles d'origine humaine (16 échantillons positifs/19 échantillons cliniques reçus).

3. Activités de surveillance

En 2018, concernant l'activité de surveillance, 38 laboratoires du réseau ont pu obtenir des renseignements épidémiologiques et donc déclarer 310 des 323 cas de cryptosporidioses diagnostiqués. Au total (CNR-LE + Centre collaborateur), 251 selles et 15 ADN ont été reçues (175 selles et 15 ADN à Rouen et 76 selles à Dijon). Dans 44 cas, les échantillons n'ont pu être adressés au CNR-LE ou au laboratoire collaborateur. Sept échantillons d'ADN ont été reçus en quantité insuffisante pour permettre le génotypage de la souche. Sur les 251 selles, 15 résultats restent négatifs en génotypage. 5 *C. felis*, 1 *C. meleagridis*, 1 *C. canis*, 1 *C. erinacei*, 1 *C. ubiquitum*, 102 *C. hominis* et 133 *C. parvum* ont été identifiés.

L'origine possible des contaminations a été rapportée chez 17% des patients qui ont contracté leur infection à l'étranger, 14% qui étaient en contact avec un patient diarrhéique, 11% qui étaient en contact avec des animaux de rente potentiellement contaminés, 24% qui ont pu contracté l'infection lors d'une baignade et 8% du fait d'un aliment potentiellement contaminé (ingestion de coquillage cru pour 13 patients, de lait cru non pasteurisés pour 13 autres patients).

Une immunodépression a été signalée chez 41% des patients : la moitié d'entre eux (58%) étaient porteur d'une greffe d'organe solide et 15% infectés par le VIH. Au total, 47 % des patients ont été hospitalisés dont 39% à cause de leur cryptosporidiose et 3 patients sont décédés.

3.1. Description du réseau de partenaires

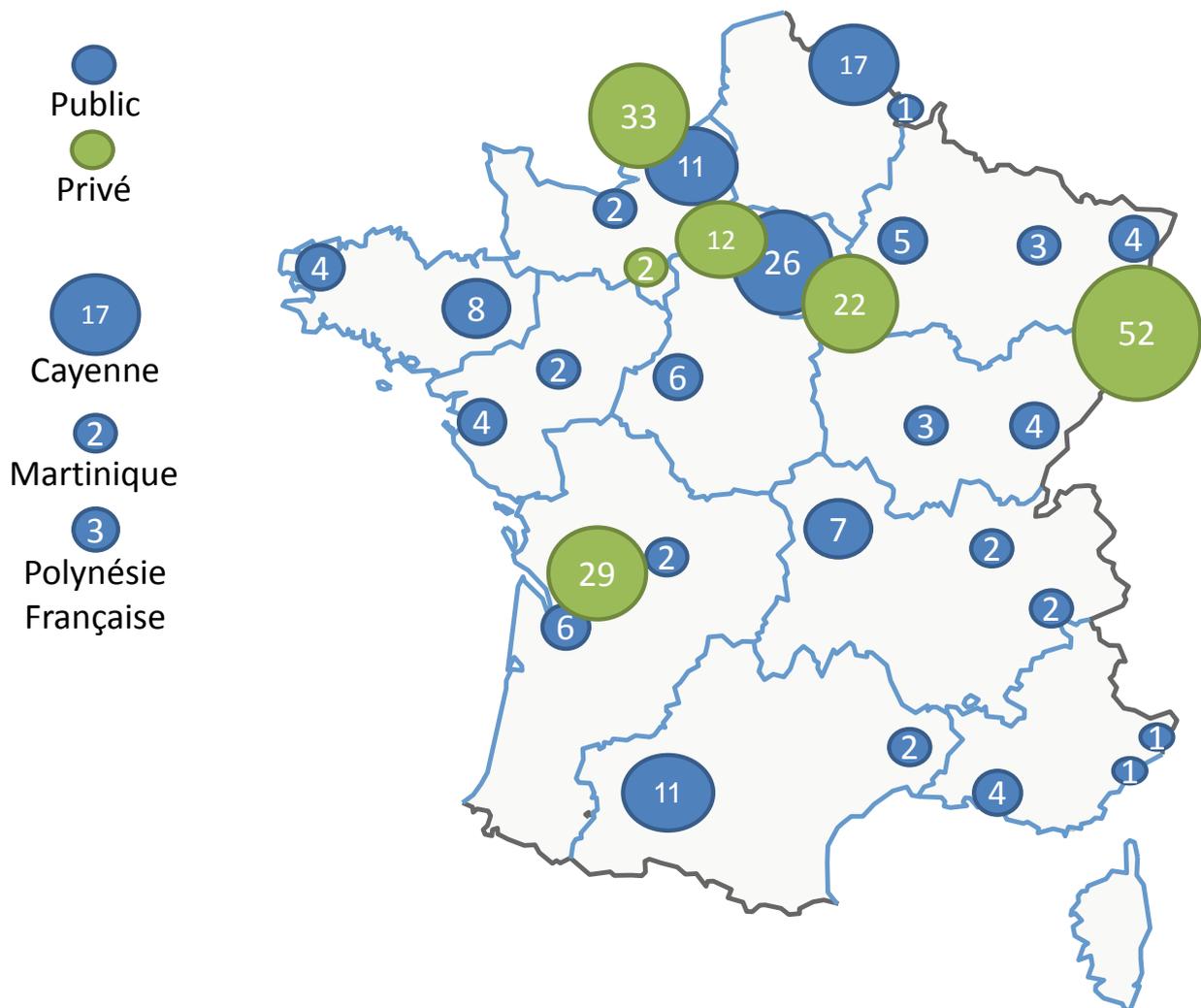
Le CNR-LE a atteint un des objectifs qu'il s'était donné en 2017 à savoir l'extension de son Réseau de collaborateur. En effet, le Réseau de partenaires était constitué en 2018 de 53 laboratoires versus 48 en 2017, avec l'arrivée de 5 laboratoires d'un CHU, de 2 CHG, D'un HIA et d'un laboratoire privé. Le Réseau était constitué en 2018 de 6 laboratoires de CHG, 6 LABM privés, des laboratoires de l'HIA Bégin et de l'HIA Ste Anne et de 39 laboratoires de CHU. Parmi ces correspondants, 39 laboratoires ont pu nous fournir leurs données concernant les recherches de *Cryptosporidium* (3 laboratoires privés, 3 CHG et 33 CHU). Ces 39 laboratoires ont effectué 50753 examens parasitologiques des selles (concernant 35431 patients) dont 27379 à la recherche de *Cryptosporidium* concernant 22353 patients (Tableau 1). *Cryptosporidium* spp. a été détecté dans 323 échantillons de selles provenant de 261 patients. De plus, 59 cas de cryptosporidioses ont été détectés dans 7 laboratoires n'ayant pas répondu à l'enquête.

En 2017, 200 cas de cryptosporidioses avaient été diagnostiqués parmi 19353 patients explorés. Au niveau des CHU, la prévalence des patients infectés en 2017 et en 2018 n'a pas évolué significativement (147/11447 (1.28%) patients explorés étaient infectés en 2017 versus 146/10896 (1,34%) en 2018). En ce qui concerne les laboratoires privés, la prévalence de la cryptosporidiose a augmenté (proportions de patients infectés/patients explorés de 0.67% et 1.0% en 2017 et 2018 respectivement) mais non significativement. En effet, si l'on s'intéresse aux prévalences de la cryptosporidiose retrouvée pour les 2 LABM qui participaient au réseau en 2017 et en 2018 (0.67% et 0.91% respectivement), cette augmentation n'apparaît pas significative ($p > 0.05$). La prévalence plus élevée retrouvée dans les centres hospitaliers peut s'expliquer par la présence de patients immunodéprimés plus susceptible à l'infection en milieu hospitalier. Ces chiffres situent *Cryptosporidium* spp. en 2^{ème} place des infections parasitaires digestives en France après *Giardia intestinalis* (prévalences de 1.78 et 1.21% respectivement en laboratoires privés et publics).

Concernant les données de surveillance, les données présentées ont été extraites le 7 mars 2019. Par ailleurs, 310 déclarations de cas sur le site du CNR-LE avec données épidémiologiques provenant de 38 laboratoires (6 privés et 32 publics) ont été effectuées par les correspondants. Pour les échantillons pour lesquels une déclaration a été faite sur le site, le CNR-LE a reçu 175 selles et le laboratoire associé 76.

Tableau 1 : Bilan des analyses et cas de cryptosporidioses diagnostiquées par les membres du Réseau

Laboratoires hospitaliers	Examen des selles		Recherche de cryptosporidioses			
	Total	Nombre de patients	Total recherches	Nombre de patients	Nombre de cas	Nombre de patients (cas déclarés)
ANTIBES	341	289	341	289	3	3 (1)
AMIENS	528	280	0	0	0	0 (0)
ANGERS	670	566	141	111	3	3 (2)
BESANCON	412	284	221	150	4	4 (4)
BORDEAUX	1566	1006	569	325	11	7 (6)
BREST	651	330	492	268	8	4 (4)
CAEN	418	303	142	110	2	2 (2)
CLERMONT-FER	987	654	510	406	11	7 (7)
DIJON	777	518	777	518	3	3 (3)
FORTDEFrance	778	434	179	140	3	2 (2)
GRENOBLE	1211	626	106	75	5	2 (2)
LE HAVRE	240	178	9	8	0	0 (0)
LILLE	2000	1439	490	388	26	18 (17)
LIMOGES	556	404	168	111	3	2 (2)
LYON	3026	1469	461	262	8	3 (2)
MARSEILLE	1422	935	427	302	5	5 (4)
MONTPELLIER	752		314	314	0	0 (0)
NANCY	761	488	161	82	4	3 (3)
NICE	858	680	474	383	2	1 (1)
NIMES	297	238	62	56	2	2 (2)
NOUMEA	109	100	91	78	4	3 (3)
PARIS BICHAT	1876	1059	381	272	7	4 (4)
PARIS COCHIN	601	427	143	123	3	1 (0)
PARIS NECKER	765	498	750	485	5	4 (4)
PARIS POMPIDOU	618	399	411	280	0	0 (0)
PARIS St LOUIS	1962	1189	1470	1204	17	11 (11)
PARIS StANT/TEN	1695	1251	469	347	6	6 (6)
POINTE A PITRE	208	155	108	85	0	0 (0)
POITIERS	636	448	261	175	0	0 (0)
REIMS	2650	1800	540	430	5	5 (5)
RENNES	1493	835	488	341	15	8 (8)
ROUEN	1400	938	2036	1478	13	11 (11)
St ETIENNE	610	430	35	25	0	0 (0)
STRASBOURG	1454	1204	424	404	5	5 (4)
TOULOUSE	1601	1038	836	612	16	11 (11)
TOURS	969	684	377	259	7	6 (6)
TOTAL (CHU+CHG)	36898	23576	14864	10896	206	146
LABM						
LABM St VALERY	2692	1780	4210	3298	35	33 (33)
Exalab Laboratoire	6188	5100	3330	3184	29	29 (29)
Laboratoire bio67	4975	4975	4975	4975	53	53 (52)
TOTAL LABM	1385	11855	12515	11457	117	115
TOTAL	50753	35431	27379	22353	323	261



Carte 1 : Provenance géographique des échantillons reçus (selles et ADN) par le CNR-LE et le centre collaborateur en 2018.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1. La distribution (hors épidémies) des cas de cryptosporidiose en 2018 en fonction de l'âge est semblable à celle obtenue précédemment par le Réseau Crypto Anofel, puis par le CNR-LE. Le rapport des sexes est de 1 comme les années précédentes, le sexe n'est donc pas un facteur de risque de cryptosporidiose.

3.2.2. Il est à noter que la majorité des cas sont survenus chez les enfants de moins de 5 ans et en particulier chez les moins de 2 ans et demi (39/55) (Figure 1a). Chez les adultes, la population la plus touchée concerne essentiellement les 20-35 ans. Dans cette tranche d'âge, le contact avec des jeunes enfants potentiellement contaminés pourrait être la principale explication de cette prévalence

3.2.3. Comme les années précédentes, la période estivale apparaît comme la principale à risque de cryptosporidiose : 178 cas ont été déclarés de juillet à septembre, soit une répartition de 58% des cas annuels sur 3 mois seulement, vraisemblablement en rapport avec une exposition plus importante aux eaux de boisson, de baignade et aux crudités en été (Figure 1b).

3.2.4. Il faut signaler qu'un biais potentiel de recrutement existe car certains centres recherchent systématiquement la cryptosporidiose sur les selles reçues pour investigation sans tenir compte de leur consistance ni de l'âge ou du statut immunitaire des patients, alors que d'autres centres partenaires recherchent la cryptosporidiose de manière plus ciblée.

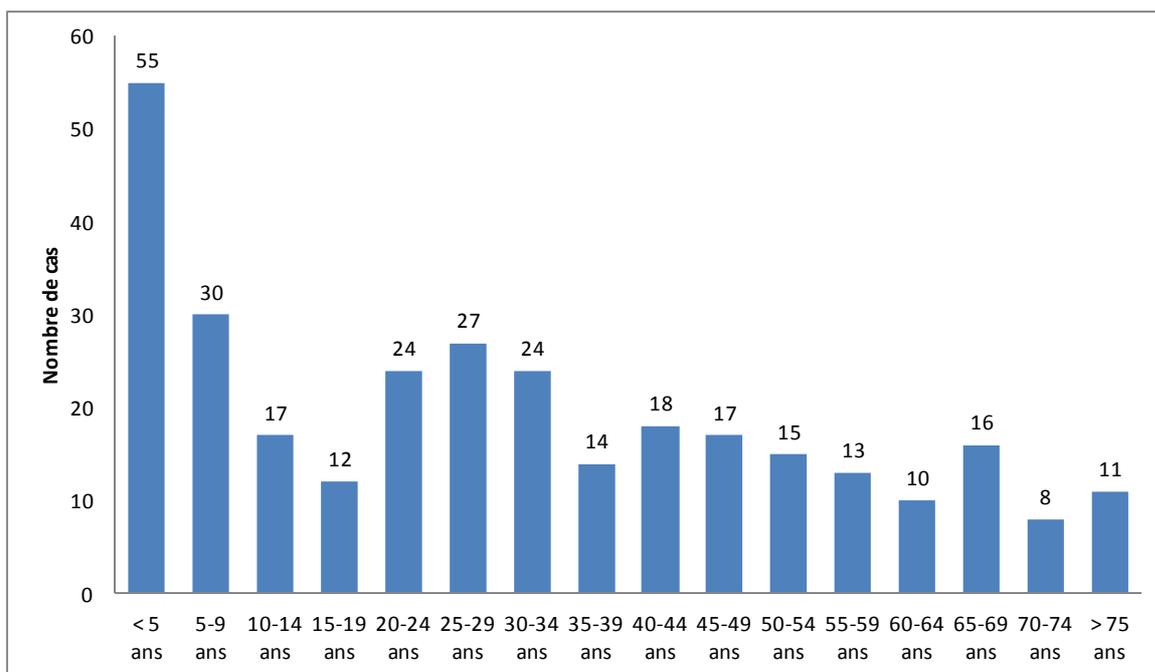


Figure 1a : Distribution en fonction de l'âge des cas de cryptosporidioses déclarés en France en 2018

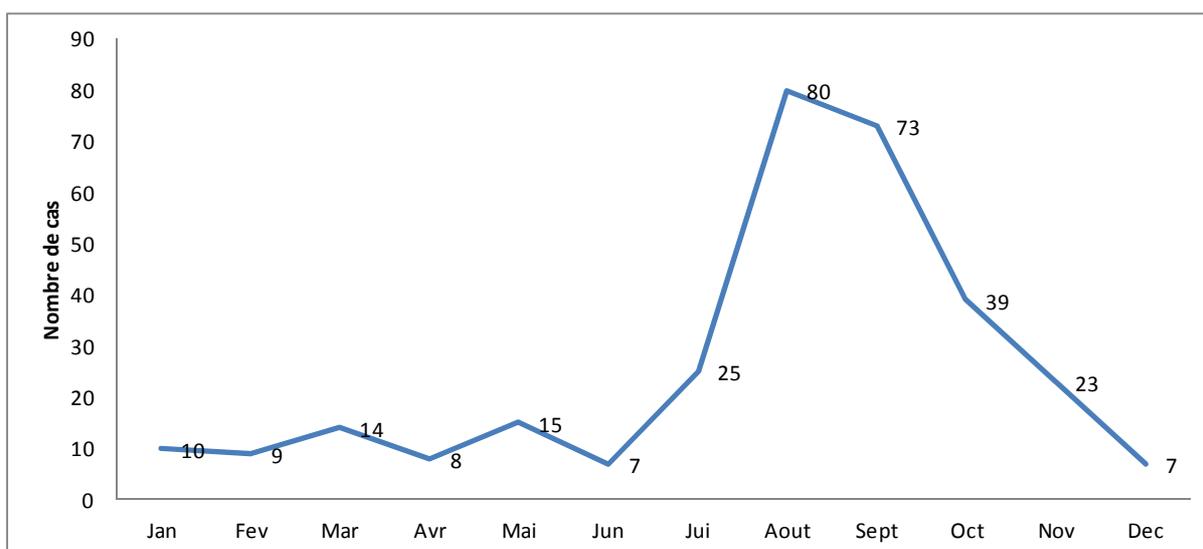


Figure 1b : Distribution mensuelle des cas de cryptosporidioses en France en 2018

3.2.5. En 2018, 36% des patients avec une cryptosporidiose déclarée au CNR-LE étaient immunodéprimés (Figure 2). Cette proportion est légèrement plus faible qu'en 2016 et 2017, en liaison avec la participation récente au Réseau de nouveaux laboratoires privés (les proportions de cas déclarés avec immunodépression étant respectivement de 48% et 22% pour les laboratoires publics et privés).

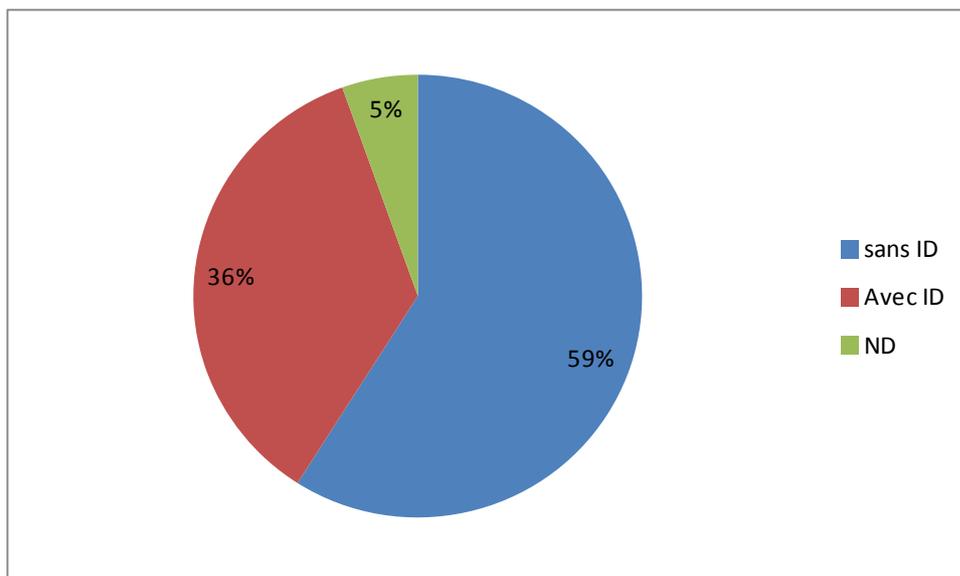


Figure 2: Statut immunitaire des patients atteints de cryptosporidioses en 2018 (ID: immunodéprimés / ND : non déclaré).

3.2.6 La distribution des causes d'immunodépression est proche de celle des années précédentes : majorité de receveurs d'organes solides (58%), puis patients infectés par le VIH (15%) (Figure 3).

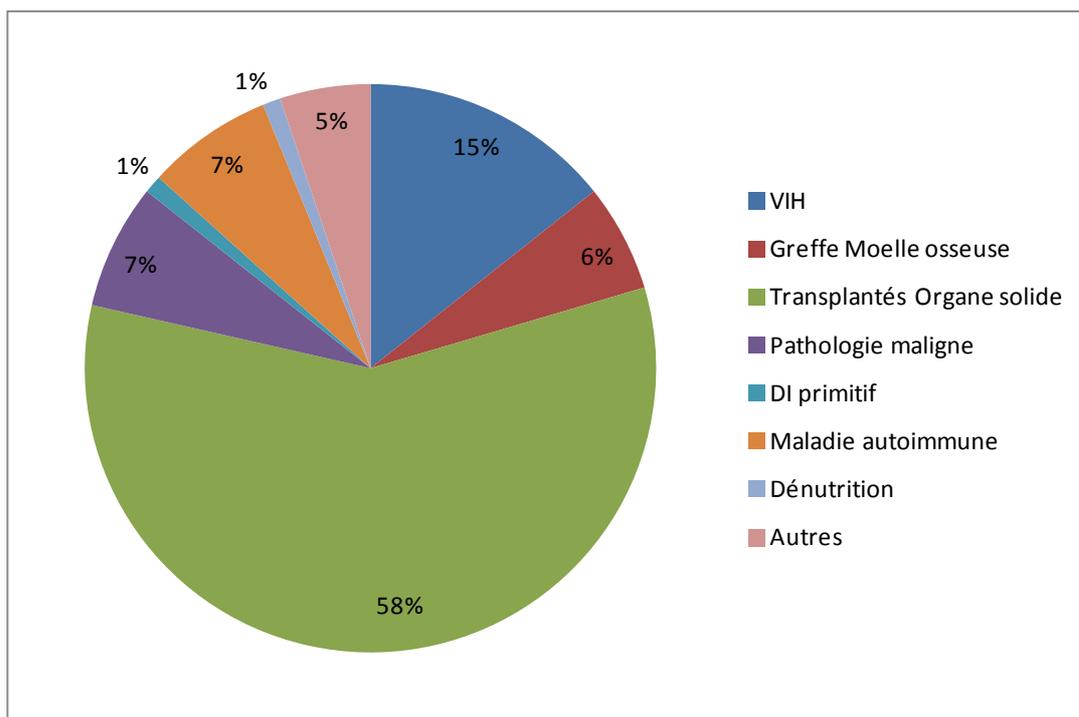


Figure 3: Causes de l'immunodépression des patients immunodéprimés atteints de cryptosporidioses en 2018

3.2.7 Comme les années précédentes, la moitié des patients atteints de cryptosporidioses était hospitalisée et parmi eux, 62% l'ont été du fait de leur cryptosporidioses. (Figures 4 et 5)

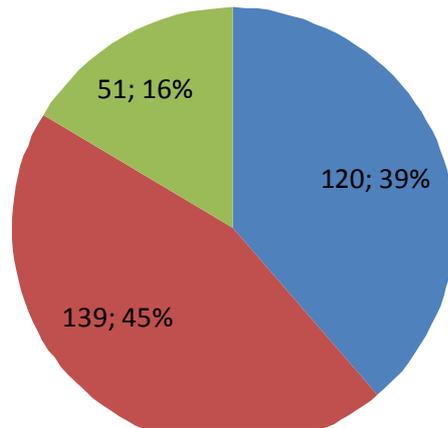


Figure 4 : Proportion de patients hospitalisés atteints de cryptosporidioses
 oui ; patients ayant été hospitalisés
 non : patients n'ayant pas été hospitalisés
 NSP : absence de donnée concernant l'hospitalisation

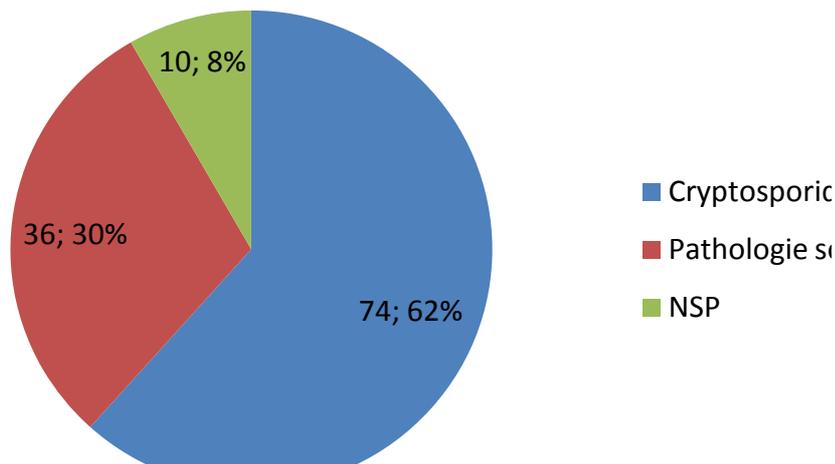


Figure 5 : Motif d'hospitalisation des patients atteints de cryptosporidioses
 NSP : motif d'hospitalisation inconnu

3.2.8. En 2018, 3 patients atteints de cryptosporidiose sont décédés.

3.2.9. Pour *Cryptosporidium parvum*, espèce majoritaire comme les années précédentes, le génotype IlaA15G2R1 apparaît comme largement prédominant (40% des isolats de *C. parvum* identifiés). Ces résultats relancent l'interrogation sur la contamination anthro-po-zoonotique de l'Homme dans les régions d'élevage. Pour *Cryptosporidium hominis*, le génotype dominant demeure le génotype IbA10G2 (50% des isolats génotypés de *C. hominis*) mais un second génotype est apparu en proportion importante en 2018, le génotype : IaA22R2 (23% des isolats génotypés de *C. hominis*) tous en provenance du Nord-Est de la France et ayant abouti à un alerte épidémique sans avoir pu identifier la source de l'infection (Figures 6 et 7).

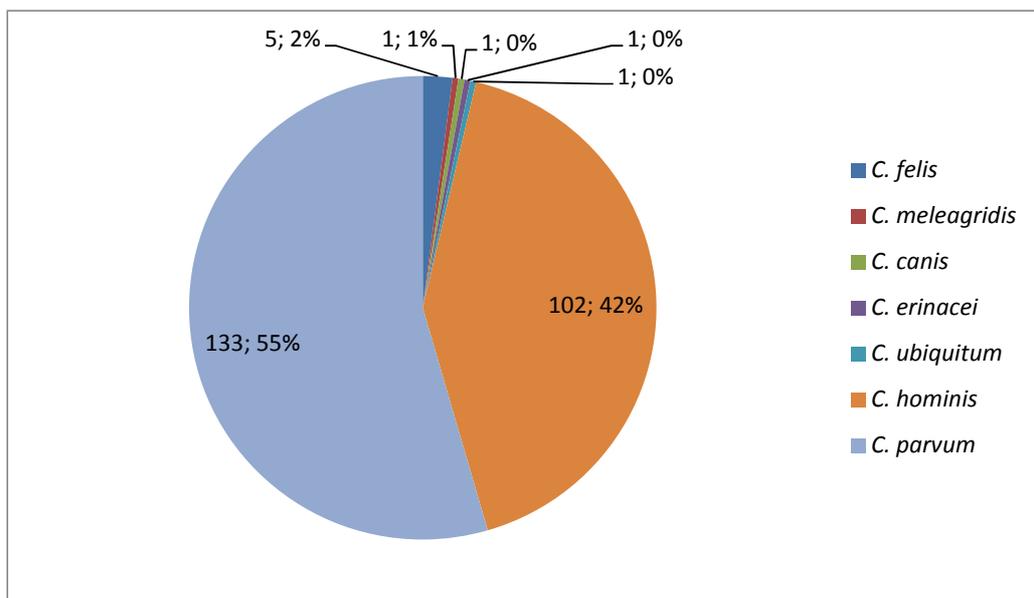


Figure 6 : Distribution des espèces de *Cryptosporidium* des isolats adressés en 2018 au CNR-LE et au laboratoire collaborateur.

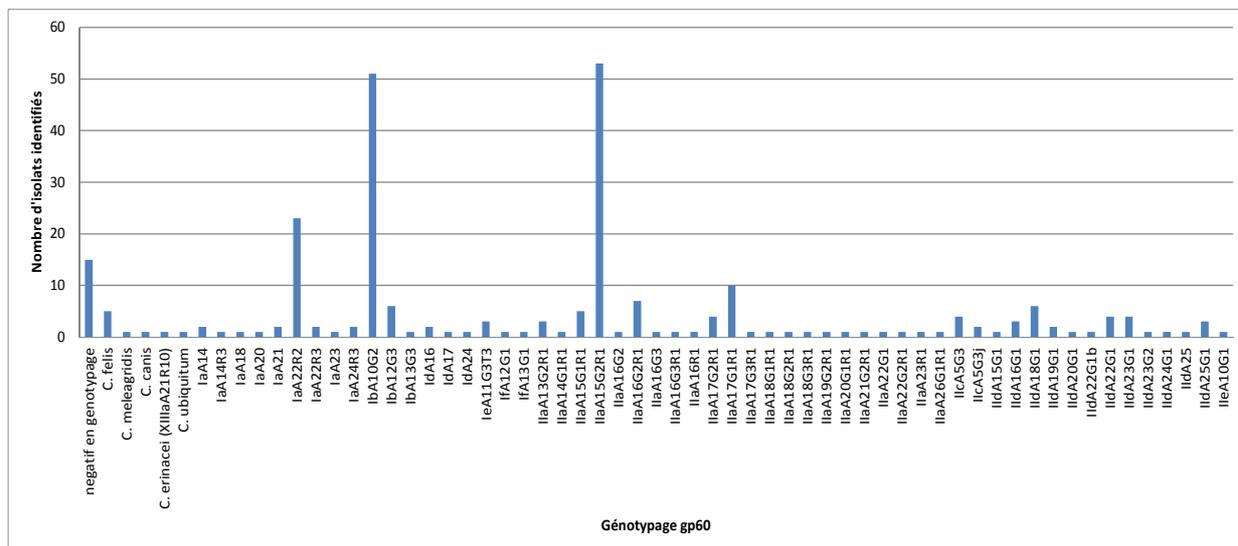


Figure 7 : Distribution des sous génotypes de *gp60* des isolats de *Cryptosporidium* spp. adressés au CNR-LE et au laboratoire collaborateur en 2018.

3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Non applicable

3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

La collaboration étroite initiée en 2017 entre le CNR-LE et le LNR « Parasites transmis par les aliments » s'est concrétisée en 2018 par l'échange d'isolats lors de l'investigation de l'épidémie de Nantes. La collaboration avec le laboratoire de référence européen de Swansea a été poursuivie avec accueil du Pr Chalmers au CNR-LE et du Dr Razakandrainibe du CNR-LE au centre de Swansea grâce au soutien du programme COST EURO Food Borne Parasite. Ces échanges ont donné lieu à la rédaction de publications en cours de soumission. Désormais les échanges de souches à titre de contrôles inter-laboratoires sont bien établis et permettent une évaluation annuelle des techniques.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Aucune enquête n'a été réalisée cette année.

4 Alerte

4.1. En Mars 2018, des médecins du centre de santé primaire de Maripasoula ont alerté l'ARS de Cayenne à propos de la survenue de 3 cas de cryptosporidioses diagnostiquées chez des jeunes enfants. Le 24 avril 2018, le service de santé des armées a détecté une augmentation de l'incidence des diarrhées chez les militaires stationnés à Maripasoula. Finalement entre le 1^{er} janvier et le 31 mai 2018, 9 cas chez des enfants (âge moyen 15 mois) dont 3 hospitalisés pour déshydratation et 1 cas chez un patient (60 ans) porteur d'une greffe rénale ont été confirmés par le CHU de Cayenne. Du fait de la durée de l'épidémie, tous les isolats ont été caractérisés comme étant *C. hominis* I1A10G2. Parmi les 41 militaires atteints de diarrhées, 6 cas ont été confirmés et génotypés. Lors de l'investigation de l'épidémie, le facteur de risque principal retrouvé étant la consommation d'eau du réseau, celle-ci a été prélevée et analysée mais après l'épidémie. Concernant les isolats retrouvés dans les 13 échantillons d'eau prélevés après l'épidémie, la recherche conventionnelle réalisée à Nancy était négative. Quatre prélèvements ont été retrouvés par le CNR-LE positifs à *Cryptosporidium* par PCR mais le génotype retrouvé a été différent (*C. parvum* I1A19G2).

4.2. En mai 2018, le laboratoire de Biologie médicale de St Valéry en Caux a alerté LE CNR-LE pour la survenue de 2 cas de cyclospores parmi un groupe de touristes ayant tous une diarrhée du retour après un séjour à Cuba dans le cadre d'un voyage d'entreprise. Le CNR-LE a donc prévenu le Dr Jourdan da Silva de la DMI de SPF qui a sollicité la DGS pour informer les employés souhaitant consulter en cas de Gastroentérite aigue au retour de Cuba. Un document a été rédigé par le CNR-LE à la demande de la DGS.

4.3. En juin 2018, le service de Santé des armées a contacté le CNR-LE pour la suspicion d'une épidémie de gastroentérite à *Cryptosporidium* chez des militaires stationnés au Liban. Le génotypage des souches (Cf supra) a permis d'écarter cette hypothèse.

4.4. En août 2018, les médecins généralistes d'un cabinet de l'île d'Yeu ont alertés l'ARS Pays de Loire de la survenue d'un grand nombre de cas de diarrhée sur l'île. Les analyses bactériologiques et virologiques des selles des 6 patients diarrhéiques s'étant révélées négatives, ces 6 échantillons ont été adressés le 31 août 2018 par le laboratoire Chevillon (Challans) au CNR-LE. La recherche de *Cryptosporidium* a été négative, mais la présence d'une microsporidie, *Enterocytozoon bienewisi* a été diagnostiquée par le CNR-LE. La caractérisation génotypique de cet isolat a été réalisée par le laboratoire du CHU de Clermont Ferrand (Pr Poirier) ; il s'agit d'un génotype C. Une analyse d'eau prélevée par la direction Santé Publique et Environnementale de l'ARS au niveau du château d'eau de l'île a été réalisée par le CNR-LE mais elle s'est révélée négative. Toutefois, aucune technique n'est actuellement validée pour la recherche de ces parasites dans l'eau et ce résultat négatif n'est donc pas concluant.

4.5. Fin août 2018, le Dr Rieder (laboratoire Bio 67) a prévenu le CNR-LE du diagnostic d'un nombre important de cas de cryptosporidioses durant ce mois. Du fait du nombre plus élevé de cas diagnostiqués en août par les autres LABM du Réseau et la présence de plusieurs génotypes retrouvés dans les échantillons envoyés par les autres LABM, l'hypothèse d'une augmentation de l'incidence liée à un nombre élevé de baignade du fait de la chaleur a été émise et le Dr Bruyand de la DRI de SPF a été prévenu. Les échantillons diagnostiqués en août par le labo Bio 67 sont parvenus au CNR-LE début septembre et la présence de nombreux cas associés à un génotype très inhabituel, (*C. hominis* I1A22R2) a été signalé au Dr Bruyant. Devant l'ancienneté des cas, il a été décidé de demander au laboratoire d'envoyer ces échantillons en temps réel. De nouveaux cas ayant été diagnostiqués fin septembre, une enquête de la CIRE de Strasbourg a été réalisée. Malheureusement aucun point commun entre les cas en terme de lieu de baignade, de consommation d'eau, de lieu de vacances ou de crèches, écoles n'a pu être retrouvé. Au total, 21 patients du laboratoire Bio 67 à Strasbourg

entre le 15 Aout et le 29 octobre 2018 ont été infectés par ce génotype sans qu'une origine puisse être retrouvée. Une source alimentaire inconnue est probable.

5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1. Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) ;

Au niveau national, les Biologistes du CNR-LE ont été cooptés par leurs collègues hospitalo-universitaires (Association Anofel) pour contribuer à la rédaction de l'ouvrage de recommandations diagnostiques : Parasitologie et Mycologie médicales, Guide des analyses et pratiques diagnostiques, Ouvrage collectif Association Anofel Masson éditeur, paru en 2018 pour les chapitres suivants :

- Examen parasitologique des selles : examen direct, concentration des parasites, examen parasitologique standard des selles (D. Leméteil)
- Coccidioses intestinales (G. Gargala)

5.1.2. Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :

Les données de surveillance et de production du CNR-LE ont été communiquées aux membres du Réseau des laboratoires participants au cours d'une réunion annuelle qui a eu lieu le 22 novembre 2018 à la Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (Paris Descartes). Cette réunion a permis des échanges directs. L'ensemble des communications effectuées lors de la réunion de 2018 a été envoyé par mail à tous les membres du réseau.

Concernant le contrôle inter-laboratoires une réponse spécifique de même qu'une évaluation globale ont été envoyées en temps réel à l'ensemble des membres du réseau ayant participé.

Le présent rapport annuel sera communiqué aux membres du réseau. Un envoi par courriel de la réponse de l'évaluation du CNR par le Comité des CNR-LE sera effectué dès réception.

Destinée aux professionnels biologistes et parasitologues, une communication orale présentant les résultats obtenus par le CNR-LE pendant l'année précédente est réalisée lors du congrès annuel de la Société Française de Parasitologie. Au niveau international, des communications sont effectuées dans les réunions scientifiques de référence sur les travaux du CNR qui font par ailleurs l'objet de publications sous forme d'articles originaux.

La mise en place du site internet du CNR-LE permet de présenter en ligne le rapport annuel ainsi que les publications scientifiques issues des travaux du CNR. De même, le site Internet du CNR-LE contient un espace réservé aux professionnels de santé pour la diffusion des conseils et informations sur le diagnostic et la prise en charge de la cryptosporidiose chez les patients immunocompétents et immunosupprimés.

5.1.3 Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités si ces données sont disponibles)

Grâce à la communication aux professionnels de Santé du numéro de téléphone du CNR-LE, les biologistes médecins et pharmaciens (LF, GG, DC) du CNR-LE sont régulièrement sollicités pour apporter un appui aux professionnels concernés par la cryptosporidiose (médecins en

charge des patients dont en particulier infectiologues, réanimateurs, gastroentérologues, pédiatres ; hygiénistes ; pharmaciens)

Concernant le laboratoire collaborateur des avis sont demandés concernant les étapes pré et post analytiques.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Lors de l'épidémie de cryptosporidiose de Guyane, la CIRE de Guyane s'est rapprochée du CNR-LE afin d'obtenir des conseils en vue de la gestion de cette épidémie.

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

Des conseils d'hygiène à destination du grand public sont disponibles sur le nouveau site internet du CNR-LE

6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1 Activités de recherche en cours

6.1.1 Etude des voies de contamination des bovins par *C. parvum*

Dans le cadre du programme de recherche « healthy calf » réalisé par le CNR-LE en collaboration avec l'INRA de Tours et l'INRA de Jouy en Josas, l'étude des génotypes des *Cryptosporidium* spp. isolés chez les veaux et chez leur mère a montré que bien que la mère soit très souvent infectée par *C. parvum*, contrairement à l'hypothèse communément admise, elle n'était pas responsable de la contamination de leurs veaux, ceux-ci étant porteurs d'un génotype différent de celui de leur mère.

6.1.2. Etude de la pathogénicité de *Cryptosporidium* spp.

Etude des mécanismes du syndrome de l'intestin irritable post-infectieux déclenché par *Cryptosporidium* spp.

Les travaux antérieurs de notre équipe ont montré que l'infection expérimentale par *C. parvum* chez le rat s'accompagne à long terme de la survenue d'une hypersensibilité viscérale mimant le syndrome de l'intestin irritable post-infectieux observé chez l'Homme. Les objectifs de cette étude réalisée dans le cadre d'un programme de recherche (2017-2019) financé par la région Normandie, sont de documenter le rôle des translocations bactériennes dans un modèle de cellules entérocytaires infectées par *C. parvum*, de caractériser dans ce modèle les mécanismes liés à *C. parvum* qui favorisent ces translocations, dont la dégradation des protéines occludines et claudines 4, et de déterminer si cette dégradation dépend du génotype des cryptosporidies. En 2018, les travaux ont confirmés la translocation bactérienne et ses conséquences.

6.1.3. Etude comparative multicentrique de méthodes d'extraction d'ADN de *Cryptosporidium parvum* à partir d'échantillons de selles.

Compte tenu du nombre croissant de techniques moléculaires commercialisées de détection de l'ADN de *Cryptosporidium parvum* dans les échantillons de selles, l'efficacité de la technique d'amplification mais aussi de l'extraction de l'ADN restent des paramètres non ou mal précisés par les fabricants. Les caractéristiques physico-chimiques de la paroi de l'oocyste rendent, en effet, difficile l'extraction des acides nucléiques par les méthodes conventionnelles. Le pré-traitement mécanique par des billes est connu comme étant une étape améliorant les performances de l'extraction. Dans le cadre du réseau des laboratoires collaborateurs du CNR-LE, Le laboratoire collaborateur du CNR-LE (CHU Dijon) a initié une étude comparative multicentrique de six kits manuels et méthodes automatisées d'extraction associés à un pré-traitement mécanique. Plus précisément, cette étude porte sur la comparaison de six kits manuels et méthodes automatisées d'extraction d'ADN de *Cryptosporidium parvum* (ELITE InGenius ®, QIAamp Fast DNA Stool Mini kit, QIAamp Power Fecal DNA kit ®, MagnaPure 96 ®, Quick DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep et

eMAG) associés à différents pré-traitements mécaniques, avec la participation de cinq CHU (Clermont-Ferrand, Rouen, Lille, Rennes et Dijon), membres du réseau des laboratoires collaborateurs du CNR-LE des Cryptosporidioses. Ces travaux sont en cours de réalisation.

6.1.5. Organisation du congrès international de référence sur la cryptosporidiose : 7th international *Giardia* and *Cryptosporidium* conference (<https://en.rouentourisme.com/7thigcc/>) (Chairman : L. Favennec)

Le CNR-LE a été sélectionné pour organiser en juin 2019 le congrès international de référence sur la cryptosporidiose qui a lieu tous les 2 ans alternativement sur le continent Américain, en Europe et en Asie. Il aura lieu à Rouen du 23 au 26 juin 2019. Cent quatre vingt quinze communications ont été sélectionnées et seront présentées. Elles traitent de tous les aspects de cette parasitose, en particulier de son épidémiologie.

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

*Les noms des membres du CNR-LE, du laboratoire collaborateur et des laboratoires participant au réseau sont soulignés. Le nom des membres du laboratoire collaborateur de Dijon est suivi de « * ». Le nom des membres des laboratoires participant au réseau est suivi de « ** »*

Publications nationales

Chapitre d'ouvrage

Leméteil D.

« Examen direct, concentration des parasites , examen parasitologique standard des selles » « coccidioses intestinales » in ANOFEL : "Parasitologie et Mycologie Médicales - Guides des Analyses et Méthodes", publié par Elsevier Masson, Issy-Les-Moulineaux, janvier 2018

Gargala G.

Les coccidioses in ANOFEL : "Parasitologie et Mycologie Médicales - Guides des Analyses et Méthodes", publié par Elsevier Masson, Issy-Les-Moulineaux, janvier 2018

Publications internationales

Mosnier E, Martin N, Razakandrainibe R, Dalle F*, Roux G, Buteux A, Favennec L, Brousse P, Guarmit B, Blanchet D**, Epelboin L, Girouin C, Martin E, Djossou F, Nacher M, Demar M**. Cryptosporidiosis Outbreak in Immunocompetent Children from a Remote Area of French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2018 Apr 23..

Razakandrainibe R., Diawara EHI, Costa D., Le Goff L, Leméteil D, Ballet JJ, Gargala G, Favennec L. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Mar 29;12(3):e0006355.

Rousseau A, La Carbona S, Dumètre A, Robertson LJ, Gargala G, Escotte-Binet S, Favennec L, Villena I**, Gérard C, Aubert D**. Assessing viability and infectivity of foodborne and waterborne stages (cysts/oocysts) of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium spp.*, and *Toxoplasma gondii*: a review of methods. Parasite. 2018;25:14.

Bai J, Liu X, Le Goff L., Gargala G, Francois A., Ballet JJ., Ducrotte P., Favennec L., Towledahon g L. Octreotide modulates the expression of somatostatin receptor subtypes in inflamed rat jejunum induced by *Cryptosporidium parvum*. PLoS One. 2018 Mar 9;13(3):e0194058.

Autier B, Belaz S, Razakandrainibe R, Gangneux JP**, Robert-Gangneux F**. Comparison of three commercial multiplex PCR assays for the diagnosis of intestinal protozoa. Parasite. 2018;25:48.

Morio F, Valot S, Laude A, Desoubieux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, Machouart M, Le Govic Y, Dalle F, Botterel F, Bourgeois N, Cateau E, Leterrier M, Jeddi F, Gaboyard M, Le Pape P. Evaluation

of a new multiplex PCR assay (ParaGENIE G-Amoeba Real-Time PCR kit) targeting *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar/Entamoeba moshkovskii* from stool specimens: evidence for the limited performances of microscopy-based approach for amoeba species identification. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Nov;24(11):1205-1209. doi: 10.1016/j.cmi.2018.02.007. Epub 2018 Feb 15.

Goudal A, Laude A, Valot S*, Desoubeaux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, Machouart M, Le Govic Y, Dalle F, Botterel F, Bourgeois N, Cateau E, Leterrier M, Lavergne RA, Beser J, Le Pape P, Morio F. Rapid diagnostic tests relying on antigen detection from stool as an efficient point of care testing strategy for giardiasis and cryptosporidiosis? Evaluation of a new immunochromatographic duplex assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019 Jan;93(1):33-36.

Costa D, Razakandrainibe R, Sautour M*, Valot S*, Basmaciyan L*, Gargala G; French national network on surveillance of human Cryptosporidiosis, Favennec L, Dalle F*. Human cryptosporidiosis in immunodeficient patients in France (2015-2017). *Exp Parasitol.* 2018 Sep;192:108-112.

Publications des laboratoires participant au réseau

Pouletty M, De Pontual L, Lopez M, Morin L, Poilane I, Pham LL, Carbonnelle E, Titomanlio L, Faye A, Bonacorsi S.** Multiplex PCR reveals a high prevalence of multiple pathogens in traveller's diarrhoea in children. *Arch Dis Child.* 2019 Feb;104(2):141-146.

Menu E, Mary C, Toga I, Raoult D, Ranque S**, Bittar F. Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC Res Notes.* 2018 Mar 27;11(1):206.

Essid R, Menotti J.**, Hanen C, Aoun K, Bouratbine A. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from human populations in an urban area of Northern Tunisia. *Infect Genet Evol.* 2018 Mar;58:237-242.

Communications nationales

Costa D, Razakandrainibe R C. Tong, S. Watier, L. Holterbach, A. Merens, C. Petit, V. Pommier de Santi, G. Gargala, L. Favennec. Epidémie de Cryptosporidioses à Caylus (2015-2017). Congrès National de la SFP-SFMM 2018, Nice.

L Basmaciyan*, A Francois, A Vincent, S Valot*, M Sautour*, F Morio**, L Favennec et F Dalle*. Evaluation des Kits VIASURE® simplex et multiplex pour la détection de *Cryptosporidium* sp., *Giardia intestinalis* et *Entamoeba histolytica* dans des échantillons de selles. AG Anofel, Paris 2018.

L Basmaciyan*, A Francois, A Vincent, S Valot*, M Sautour*, F Morio**, L Favennec et F Dalle*. Evaluation des Kits VIASURE® simplex et multiplex pour la détection de *Cryptosporidium* sp., *Giardia intestinalis* et *Entamoeba histolytica* dans des échantillons de selles. SFP-SFMM Mai 2018, Nice.

Microsporidiose 2018

Communications internationales

Autier B., Razakandrainibe R., Gangneux JP, Robert Gangneux F**.

Comparison of three PCR multiplex assays for the detection of intestinal protozoa 28th ECCMID, Madrid, 2018

Joste V., Maréchal C., Aboubacar A.**, Favennec L., Argy N.**, Houze S.**

Evaluation of the performance of film-array gastrointestinal panel kit and amplidiag stool parasites kit for gastrointestinal protozoan diagnosis 28th ECCMID, Madrid, 2018

Multiplex Detection of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis* from Fecal Samples using ParaGENIE DNA Extraction and PCR Detection Kits. M Gaboyard, P Poirier**, O Robert, G Lagardere, S Godichaud, Y Le Govic**, A Laude, S Valot**, G Desoubeaux**, N Argy**, C Nourrisson**, C Pomares**, M C Machouart**, F Dalle**, F Botterel**, N Bourgeois**, E Perraud** M Leterrier, RA Lavergne, J Beser, P Le Pape**, F Morio**. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Madrid, 2018.

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Une collaboration étroite entreprise en 2017 a été poursuivie entre le CNR LE et le LNR « Parasites transmis par les aliments » de Maison-Alfort (Dr Vallée, Dr Polack) en particulier avec la venue de plusieurs membres du LNR au laboratoire (M. Mammeri, K. Tuo, M. Thomas). La coopération entre ces 2 structures se renforce actuellement, avec en particulier préparation conjointe d'une réunion scientifique, à la *7th international Giardia and Cryptosporidium conference* qui se tiendra à Rouen en juin 2019.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Les perspectives du programme d'activité du CNR pour 2019-2020 sont conformes à la proposition de programme de travail quinquennal (2017-2021) envisagée dans le dossier de candidature.

8.1 Afin d'améliorer la surveillance de la cryptosporidiose humaine, le Réseau de laboratoires sera étendu aux laboratoires des centres hospitaliers généraux ainsi que sur volontariat aux laboratoires privés de biologie médicale. Les travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousseaux seront poursuivis en particulier avec le centre collaborateur de Dijon. Le transfert des techniques vers d'autres laboratoires sera poursuivi.

8.2 Projets de formation envisagés

Dans le cadre de l'expertise nationale reconnue du CNR-LE dans le domaine des examens parasitologiques des selles, L. Favennec et D. Leméteil vont organiser une formation spécifique dans ce domaine en collaboration avec le Medical Training Center de Rouen. Il s'agira de proposer une formation d'excellence à l'examen microscopique des parasites des selles ouverte sur l'intégralité du territoire nationale aux biologistes et aux techniciens de laboratoire.

8.3 Travaux de recherche appliquée envisagés par le CNR-LE et en lien avec ses missions

1/ Dans le cadre d'un programme de recherche (2018-2020) soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (programme STRIP), nous caractériserons la réponse des oocystes de *Cryptosporidium* spp. à des stress physiques (UV, température) ou chimiques (oxydant) utilisés habituellement dans l'industrie alimentaire pour « désinfecter » les aliments. Seront en particulier étudiés les modifications structurales et biochimiques de la paroi des oocystes, et la capacité des oocystes à demeurer infectieux. Ce programme débuté en 2018 est réalisé en collaboration avec le laboratoire de Parasitologie de l'Université de Reims, l'UMR MD3 "Infections parasitaires, transmission, physiopathologie et thérapeutique" (Université d'Aix-Marseille) l'Unité Inserm U1067/CNRS UMR7333 "Laboratoire adhésion et Inflammation" (Université d'Aix-Marseille), l'unité Inserm U 1016, de l'Institut Cochin ('Comparative cell biology of Apicomplexan parasites', Université Paris Descartes), l'UMR 7178, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, "BioOrganic Mass Spectrometry lab" (CNRS/ Université de Strasbourg).

2/ Dans le cadre du programme de recherche « Healthy calf » soutenu par l'association « Apis gene », nous étudions la relation entre génotype et susceptibilité à la cryptosporidiose bovine en intégrant (i) la génétique des animaux, (ii) le profil de la réponse innée et (iii) la prévalence et la sévérité des infections. Outre l'acquisition de connaissances (variabilité de la réponse innée, prévalence des agents pathogènes, transmission mère-petit), ce programme permettra de proposer une méthode simple de phénotypage de la compétence immunitaire innée des veaux, qui sera utilisée pour identifier les animaux les plus susceptibles de développer des maladies diarrhéiques. Ce programme débuté en 2018 est réalisé en collaboration avec l'Unité INRA UMR-Infectiologie et Santé Publique de Nouzilly, l'Unité INRA "Virologie et Immunologie Moléculaires" (UR0892) de Jouy-en-Josas, l'Unité expérimentale INRA Domaine Expérimental du Pin, l'unité mixte INRA ENVT IMR1225 IHAP, et l'UMR INRA 1313 GABI de Jouy-en-Josas.