

**Rapport annuel d'activité**

**2021**

**Centre national de référence  
Laboratoire Expert  
Cryptosporidioses**

**Années d'exercice  
2020/2019**

# Résumé analytique (en français et en anglais)

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 2019 et 2020, le CNR LE et le laboratoire collaborateur ont réalisé l'évaluation des performances de nombreuses techniques d'extraction et d'amplification d'ADN de *Cryptosporidium* species. En outre, le CNR-LE et le laboratoire collaborateur ont finalisé l'évaluation des trousseaux FTD<sup>®</sup> Stool parasites de la société Launch, et Viasure de la société Certest Biotec. 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 à des collègues universitaires algériens.

Les évaluations des techniques réalisées aboutissent à la recommandation d'extraction de l'ADN de *Cryptosporidium* en technique manuelle (ZymoResearch Quick DNA Fecal/soil microbe microprep kit ou kit Qiagen Powerfecal DNA mini kit pro) et automatisée (Easymag nuclisens, Biomérieux), ainsi qu'à la préconisation d'amplification en PCR commerciale par le kit FTD<sup>®</sup> Stool parasites (Launch Diagnostic) et en PCR maison par la technique décrite dans la publication de Valeix *et al.* 2020.

En 2020, le contexte pandémique n'a pas impacté les activités de recherche et d'évaluation des techniques du CNR-LE et du laboratoire collaborateur. Cependant, chez les laboratoires correspondant du réseau, du fait de l'attention portée au diagnostic du Covid, le suivi du diagnostic de la cryptosporidiose est passé au second plan avec un retard dans les déclarations au réseau et dans la transmission des prélèvements.

La collection biologique du CNR-LE s'est enrichie respectivement de 750 et 637 nouveaux prélèvements en 2019 et 2020 (respectivement 76 et 27 reçus pour expertise, 214 et 33 pour explorations d'épidémies et 460 et 577 pour activité de surveillance).

En 2019 et 2020, concernant l'activité de surveillance, 40 et 39 laboratoires du réseau ont diagnostiqué des cas de cryptosporidiose. Parmi ceux-ci, 350 et 373 cas ont été déclarés respectivement en 2019 et en 2020.

Concernant les données épidémiologiques, il est intéressant d'observer une modification de la distribution annuelle des cas et des espèces majoritairement impliquées dans le contexte pandémique. En effet, le pic de cryptosporidiose estival annuel a été plus précoce en 2020 que les années précédentes et a débuté dès la fin du 1<sup>er</sup> confinement (entre mi-juin et mi-août) ; d'autre part la proportion de cas due à l'espèce *C. hominis* a chuté passant d'environ 25% les années précédentes à seulement 5% en 2020.

On notera également la survenue de la plus grande épidémie de cryptosporidiose jamais rapportée en France en fin d'année 2019. La contamination du réseau d'eau potable de la ville de Grasse a entraîné plusieurs centaines de cas de cryptosporidiose documentés mais le nombre de cas total est très largement supérieur et reste en cours d'estimation. Des mesures spécifiques d'alimentation hydrique de la population concernée ont dûes être prises pendant plusieurs mois en attendant la mise en place d'un système efficace de gestion du risque parasitaire de la ressource en eau potable. Les conséquences économiques furent majeures pour les autorités.

# Résumé analytique en anglais

The CNR-Laboratoire expert Cryptosporidioses (CNR-LE) was designated in 2017 to identify and characterize isolates addressed by corresponding medical 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 2019/2020, the CNR-LE and the collaborating laboratory carried out the evaluation of numerous extraction and amplification methods for *Cryptosporidium* spp. DNA. In addition, the CNR-LE and the collaborating laboratory finalized the evaluation of the FTD parasite Stool kits from the Launch company, and the Viasure kit from the CerTEst Biotec company. Training courses on the microscopic research of coccidia using the Heine method and on their molecular characterization were provided by the CNR-LE to Algerian University hospital colleagues.

The evaluation of methods lead to the recommendation to use manual methods for *Cryptosporidium* DNA extraction (ZymoResearch Quick DNA Fecal / soil microbe microprep kit or Qiagen Powerfecal DNA mini kit pro kit) or the easyMag nuclisens automatic method; to choose the FTD® Stool parasite kit from Launch Diagnostic for DNA amplification from commercial method or the PCR method described in the publication by Valeix et al. 2020 from homemade methods.

In 2020, the covid pandemic context has not impacted the research and technical assessment activities of the CNR-LE and collaborating laboratory. However, in the corresponding laboratories of the network, due to the attention paid to the diagnosis of covid, declarations of cryptosporidiosis cases has been delayed as well as the transmission of samples to the CNR-Le and collaborating laboratory.

The CNR-LE's biological collection was enriched by 750 and 637 new samples in 2019 and 2020 respectively (103 received for expertise, 247 for epidemics and 1037 for epidemiological surveillance).

In 2019/2020, concerning the surveillance activity, 40 and 39 laboratories of the network respectively diagnosed 350 and 373 cryptosporidiosis cases in 2019 and 2020. Regarding epidemiological data, interesting modifications were observed in the pandemic context. Indeed, i) the annual summer peak of cryptosporidiosis was observed earlier in 2020 than classically as soon as the end of the first confine (between mid-June and mid-August) and ii) the proportion of cases due to the *C. hominis* species fell from 25% in previous years to 5% in 2020.

In addition, it was observed in 2019, the largest cryptosporidiosis outbreak ever reported in France. The drinking water network contamination in the city of Grasse has led to several hundred documented cases of cryptosporidiosis (probably much more in estimation). Specific water supply measures were taken for several months until installation of an effective system to remove parasites from the drinking water resources. The economic consequences were major for the authorities.

## 1 Missions et organisation du CNR

CNR LE Cryptosporidioses (2017- 2022) Institut de Biologie Clinique (UF 2416) – CHU Rouen		
Pr Loïc Favennec – Biologiste Responsable Dr Damien Costa – Responsable adjoint		
<u>Personnel médical :</u> Pr L. Favennec Dr D. Costa Dr G. Gargala Dr M. Dehais	<u>Personnel scientifique :</u> Dr R. Razakandrainibe	<u>Personnel technique :</u> V. Villier (Université de Rouen)

Laboratoire collaborateur - CNR LE Cryptosporidioses (2017- 2022) – CHU Dijon
Pr Frédéric Dalle- Responsable du Laboratoire collaborateur Dr Stéphane Valot - Responsable adjoint Laboratoire collaborateur

**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, 0.1 ETP, CHU de Rouen  
Dr M. Dehais Docteur en Pharmacie, 0.1 ETP, CHU de Rouen

#### *Personnel scientifique :*

R. Razakandrainibe, Docteur de l'Université, 0.2 ETP, CHU de Rouen

#### *Technicien :*

V. Villier, 0.5 ETP, Université 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

Le CNR-LE a été accrédité COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 depuis 2017 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. La demande d'accréditation complète des activités du CNR (comprenant les analyses PCR et de séquençage) a été déposée selon les lignes de portée correspondantes en 2020. Du fait du contexte sanitaire, l'audit a été reporté par le COFRAC sans précision de date à ce jour. En cas

de validation de la demande d'accréditation par le COFRAC lors de sa prochaine visite, l'ensemble des activités du CNR seront alors accréditées.

Pour rappel le laboratoire collaborateur a été accrédité en 2017 pour la ligne de portée BM-PM04 (sous famille PARASITOMYCO « Recherche et identification et/ou quantification d'acides nucléiques parasitaires). Compte-tenu des évolutions récentes de la réglementation en termes d'accréditation, le laboratoire au sein duquel se trouve le laboratoire collaborateur est accrédité pour l'ensemble des lignes de portées-types d'accréditations correspondantes aux activités qu'il réalise sous le numéro d'accréditation 8-3125. ([https://tools.cofrac.fr/fr/organismes/fiche.php?entite\\_id=82041001](https://tools.cofrac.fr/fr/organismes/fiche.php?entite_id=82041001))

## 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 (fécès ou environnementaux). Cette technique permet également d'augmenter la limite de détection de l'ADN de *Cryptosporidium* spp. particulièrement utile lors des recherches sur matrices environnementales.

2/ Des travaux sont en cours pour optimiser la détection de *Cryptosporidium* spp. sur matrices laitières.

3/ Le CNR-LE et le laboratoire collaborateur ont réalisé l'évaluation de plusieurs techniques de diagnostic moléculaire de la cryptosporidiose englobant extraction et amplification d'ADN. Certains kits d'extraction manuelle et automatisée ont montré d'excellentes performances. Les kits commerciaux de détection de l'ADN de *Cryptosporidium* simplex présentent de meilleures performances que les kits multiplex. Les PCR maisons sont à privilégier pour l'identification des espèces isolées des prélèvements.

4/ En 2019 et 2020, la collection biologique du CNR a été enrichie de 998 prélèvements caractérisés (643 pour le CNR LE et 355 pour le centre collaborateur) pour un total de 1387 prélèvements reçus (829 pour le CNR LE et 558 pour le centre collaborateur).

### 2.1 Évolution des techniques

- 1) Suite à la survenue antérieure d'épidémies de cryptosporidiose d'origine laitière présumée, il a été décidé de développer les techniques d'isolement de *Cryptosporidium* spp. sur matrices laitières. En effet, des essais préliminaires ont démontré un rendement faible de récupération (< 10%) d'un inoculat artificiel d'oocystes de *Cryptosporidium* en lait entier avec les techniques d'isolement classique. Il semblerait que ce rendement dépende au moins en partie de la teneur en matières grasses du lait. Plusieurs essais sont donc en cours afin d'étudier la meilleure technique de récupération des oocystes en

fonction de différentes matrices laitières, transformées ou non. L'optimisation de ces techniques permettra une meilleure investigation des épidémies potentiellement associées à la contamination de ces matrices le cas échéant.

- 2) Une autre problématique récurrente des analyses effectuées dans le cadre du CNR-LE repose sur le constat d'identification exclusif des sous-types dominants de *Cryptosporidium* spp. sur échantillons primaires. Des essais réalisés en mélangeant en différentes proportions plusieurs espèces de *Cryptosporidium* ont démontré l'amplification exclusive par PCR du sous-type majoritaire. Il en résulte un manque de précision dans la caractérisation des espèces et sous-types de *Cryptosporidium* présents dans un échantillon en cas de contamination à plusieurs sous-types. La problématique se révélant cruciale dans l'identification de la source d'une contamination en cas d'épidémie. Ainsi, au cours de l'année 2020, des travaux ont été initiés par le CNR-LE afin de pouvoir également caractériser les sous-types minoritaires présents dans les échantillons pluri-contaminés par des approches de clonage moléculaire. Le résultat attendu étant une caractérisation plus exhaustive des sous-types circulants, notamment dans les prélèvements environnementaux. En parallèle, le laboratoire collaborateur du CNR-LE a développé un outil de génotypage par NGS basé sur l'étude du polymorphisme du gène codant la GP60. Cet outil permet ainsi le génotypage du même gène que celui utilisé actuellement par le CNR-LE et laboratoire collaborateur pour la caractérisation des souches. Mais cet outil permet le traitement d'un grand nombre d'échantillons en même temps ainsi que la détection de plusieurs sous-types dans un même échantillon. Ainsi, une nouvelle analyse des échantillons de l'épidémie de Grasse par NGS a permis de montrer que la contamination était monoclonale au pic de l'épidémie, et qu'une poly-clonalité des échantillons apparaissait à distance du pic épidémique. Cet outil semble donc parfaitement adapté à l'investigation d'épidémies et un manuscrit est en cours de rédaction sur ce travail. Enfin, un travail est en cours afin d'étudier la variabilité des souches issues de cette épidémie en whole genome sequencing afin de préciser la place de cet outil dans l'investigation épidémique de cryptosporidiose.
- 3) Afin d'ouvrir considérablement le champ des applications des analyses par séquençage réalisées dans le cadre du CNR-LE, il est nécessaire d'optimiser l'extraction d'ADN double brin de *Cryptosporidium* en quantité et qualité suffisante. Ainsi, des essais ont été initiés à cette fin. Le but étant de pouvoir obtenir des extraits de qualité pour des analyses en whole genome sequencing sans avoir à passer par une étape d'amplification sélective de l'ADN biaisant les analyses.

## 2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

- 1) En 2019, le laboratoire collaborateur, en collaboration avec le CNR LE, a coordonné une évaluation multicentrique de 6 techniques d'extraction de l'ADN de *Cryptosporidium parvum* utilisant des kits manuels ou des méthodes automatisées associés à différents protocoles de prétraitement mécanique des selles dans le but d'étudier l'incidence de ces techniques de prétraitement sur les performances d'extraction de l'ADN de *Cryptosporidium* sp et de détection ultérieure par PCR. Cette étude a permis de mettre en évidence des différences significatives en fonction des protocoles, notamment aux faibles concentrations de *Cryptosporidium* spp. dans les selles (PI18). En outre, le CNR LE a évalué 6 techniques d'extraction (automatisées ou non) utilisant un dispositif de pré-traitement des selles par lyse mécanique en billes (Stool pre-processing device, Biomérieux). Les techniques testées ont montré des différences significatives en termes de performances pour les plus faibles concentrations en oocystes.
- 2) De plus, le laboratoire collaborateur du CHU de Dijon a finalisé en 2019 l'évaluation des kits Viasure® Simplex et Multiplex pour la détection de *Cryptosporidium* spp. (et *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*) et leur comparaison avec (i) les techniques maison utilisées au laboratoire et (ii) d'autres kits commerciaux disponibles sur le marché (FTD Stool parasites; DIAGENODE-Gastroenteritis / Parasite-panel). Cette étude a permis de montrer une bonne sensibilité de détection de *Cryptosporidium* spp. dans les selles avec les kits simplex et multiplex Viasure®. (CI2) .
- 3) En 2020, le laboratoire collaborateur a réalisé une étude comparative de onze protocoles différents de prétraitement des échantillons de selles avant extraction de l'ADN et détection par PCR. Ce travail a permis de mettre en évidence la supériorité de certains protocoles et leur intérêt pour la détection des parasites présents en faible concentration dans les échantillons de selles. (PI26).
- 4) En complément de l'évaluation des techniques d'extraction, le CNR-LE a comparé les performances d'amplification de l'ADN de *Cryptosporidium* spp. entre 8 techniques différentes (4 commerciales et 4 « maison »). Les techniques commerciales testées étaient les kits : RIDA® GENE Parasitic Stool Panel II, FTD® Stool parasites, Amplidiag® Stool Parasites et Allplex® GI Parasite Assay. Les techniques « maison » avaient été reprises des publications scientifiques de Fontaine et al. 2002, Valeix et al. 2020, Hadfield et al. 2011 et Mary et al. 2013. Les résultats ont démontré des performances variables en termes de limite de détection, spécificité, et capacité à détecter les espèces rares. Les meilleures performances ont été obtenues avec le kit FTD® Stool parasites

pour les PCR commerciales et la technique « maison » issue de la publication de Valeix et al. 2020 qui correspond à la technique utilisée par le laboratoire collaborateur. Les techniques commerciales, si elles ont été capables de détecter les espèces rares testées de *Cryptosporidium* (*C. cuniculus*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. chipmunk*, *C. ubiquitum*), ne permettent pas de distinguer ces espèces. Ainsi, dans le but d'identifier précisément les espèces retrouvées dans les échantillons biologiques, les techniques « maison » conservent tout leur intérêt. De plus, pour optimiser la limite de détection des espèces, il est préconisé de passer chaque échantillon en triplicate (PI32).

- 5) En 2020, a été initiée par le CNR-LE, une étude visant à comparer plusieurs procédures d'extractions automatisée sur l'automate MagNA Pure (Roche Life Science). Les essais préliminaires ont consisté à tester sur une gamme de concentration en oocystes le kit MPure Viral/Pathogen Nucleic Acids Ext Kit B avec ou sans procédé de pré-traitement. Devant les résultats médiocres obtenus dus à la présence d'inhibiteurs de PCR dans les extraits, l'étude se poursuit avec d'autres protocoles.

### **2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires**

En 2019, deux enseignantes chercheurs de l'école vétérinaire d'Alger ont été formées aux techniques de caractérisation moléculaires de *Cryptosporidium*.

En vue du contexte sanitaire, aucune formation sur site n'a eu lieu durant la période 2020.

### **2.4 Collections de matériel biologique**

En 2019, le CNR LE et le laboratoire collaborateur ont reçu un total de 750 échantillons (431 et 319 respectivement) dont 76 pour expertise, 214 pour explorations d'épidémies et 460 pour activité de surveillance.

En 2020, le CNR LE et le laboratoire collaborateur ont reçu un total de 637 échantillons (398 et 239 respectivement) dont 27 pour expertise, 33 pour explorations d'épidémies et 577 pour activité de surveillance.

Les souches sont actuellement conservées à +5°C +/- 3°C et les ADN sont conservés par congélation à -20°C, 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*. Ces séquences sont en attente d'attribution de numéro d'accès sur GenBank.

## 2.5 Activités d'expertise

### 2.5.1 Activités du CNR LE

#### Activités d'expertise

	Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hôpital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
2019-CNR LE	16	CHU Rouen	France	Suivi excrétion parasitaire, Spéciation et génotypage
	1	CHU Guadeloupe	France	Spéciation et génotypage
	1	CH Dieppe	France	Spéciation et génotypage
	1	Groupe Hospitalier Sud ile de France	France	Spéciation et génotypage
	1	CH Orléans	France	Spéciation et génotypage
	2	CHU Montpellier	France	Spéciation et génotypage
	46	Laboratoire CAB	France	Spéciation et génotypage
2019- Laboratoire collaborateur	4	LABM	France	Spéciation et génotypage
	4	CH	France	Spéciation et génotypage
2020-CNR LE	5	Laboratoire CAB	France	Spéciation et génotypage
	6	CH Dieppe	France	Suivi excrétion parasitaire, Spéciation et génotypage
2020- Laboratoire collaborateur	16	CH	France	Spéciation et génotypage

#### Activités de surveillance

	Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hopital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
2019-CNR LE	320	CHU ; LABM ....	France	Spéciation et génotypage
2019- Laboratoire collaborateur	140	CHU ; LABM ....	France	Spéciation et génotypage
2020-CNR LE	362	CHU ; LABM ....	France	Spéciation et génotypage
2020- Laboratoire collaborateur	215	CHU ; LABM ....	France	Spéciation et génotypage

#### Explorations d'épidémie

	Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hopital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
2019-CNR LE	1 (Breuil le sec)	Ars Picardie	France	Spéciation et génotypage
	15 (Pompier)	Saint Valery en caux	France	Spéciation et génotypage
	2 (Lac Hostens)	DDPP 44	France	Spéciation et génotypage
	25 (Grasse)	ARS	France	Spéciation et génotypage
2019- Laboratoire collaborateur	162 (grasse)	(6 CH Grasse, 1 CHU Nice, 23 LABM Biomnis, 132 LABM Bioesterel)	France	Spéciation et génotypage
	9 (Nantua...)	CNR-VGE à la demande de SPF	France	Spéciation et génotypage

2020-CNR LE	25 (Grasse)	ARS	France	Spéciation et génotypage
2020- Laboratoire collaborateur	8 (grasse)	LABM Bioesterel	France	Spéciation et génotypage

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.

## 2.6 Activités de séquençage

Le CNR-LE a quotidiennement accès à la plateforme de séquençage de l'IRIB, UFR Santé Université de Rouen (Séquenceur Sanger 3500 XL Genetic analyzer Applied Biosystem, Hitachi; Séquenceur à haut débit Illumina). Il a accès en interne à une expertise bio-informatique (outil utilisé pour les 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 en train d'être déposées à l'ENA sans metadata associées.

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 par techniques Sanger et NGS) sur l'ensemble des isolats reçus.

Au cours de l'année 2019, 488 prélèvements ont été génotypés (327 par le CNR-LE et 161 par le centre collaborateur).

Au cours de l'année 2020, 510 prélèvements ont été génotypés (316 par le CNR-LE et 194 par le centre collaborateur).

### 2.6.2. Activité du CNR-LE

Les investigations réalisées dans le contexte de l'épidémie de Grasse ont révélé une épidémie massive à *C. parvum* de génotype IIdA22G1, un génotype d'origine zoonotique d'après la littérature scientifique. Plusieurs centaines de cas ont été documentés. Le nombre précis de cas reste néanmoins à définir par les autorités de santé mais s'élèverait à plusieurs milliers. Les investigations par séquençage des prélèvements environnementaux ont révélé la présence de plusieurs sous-types de *C. parvum* dans les ressources hydriques de la région de Grasse dont le génotype IIdA22G1. L'origine hydrique de l'épidémie a donc ainsi été révélée et il s'en est suivi de nombreuses mesures de protection des populations jusqu'à la mise en place d'un système efficace de traitement de l'eau destinée à la consommation humaine.

Concernant les investigations des épidémies du Lac d'Hostens et de Breuil le sec, 2 et 1

échantillons de sédiments ont été reçus respectivement pour investiguer l'origine environnementale de l'épidémie. Dans ces prélèvements, les analyses en 18S ont confirmé la présence de *Cryptosporidium* species mais malheureusement les géotypes n'ont pu être obtenus en *gp60*.

Concernant l'épidémie survenue chez les pompiers étant intervenus pour la prise en charge d'un accident de la voie publique d'une bétailière, 15 selles ont été reçues, les analyses *gp60* ont objectivé l'épidémie à *C. parvum* IIaA15G2R1, également retrouvé dans les matières fécales des animaux décédés lors de l'accident.

### **3 Activités de surveillance**

1/ Entre 2019 et 2020, 11 laboratoires ont rejoint le réseau portant désormais à 64 laboratoires, le nombre de laboratoires partenaires du CNR LE.

2/ En 2019 et 2020, le nombre de déclarations de cas a été constant. Il est particulièrement intéressant d'observer des modifications des données épidémiologiques dans le contexte pandémique. Les mesures de restriction et de précautions au niveau national ont influencées certains paramètres épidémiologiques de la cryptosporidiose. Ainsi le pic estival de cryptosporidiose a été observé plus précocement en 2020, dès la levée du premier confinement, et a eu lieu de mi-mai à mi-août. Par ailleurs, la répartition des espèces majoritaires a vu une baisse significative de l'espèce *C. hominis* (5%) au profit de l'espèce *C. parvum* (94%).

3/ Plusieurs épidémies ont été investiguées mais on note la survenue d'une épidémie massive de cryptosporidiose d'origine hydrique entre fin 2019 et début 2020 dans la région de Grasse. Plusieurs centaines de cas ont été investigués mais il est probable que l'épidémie ait touché plusieurs milliers d'individus ce qui en fait la plus grande épidémie rapportée en France à ce jour. Les conséquences économiques pour la municipalité de Grasse ont été majeures.

4/ On note également, une influence délétère de la pandémie sur la surveillance des épidémies de cryptosporidiose. En effet, nombre de laboratoires n'ont pu déclarer en temps réel les cas de cryptosporidioses, ce qui n'a pas permis de documenter la survenue d'épidémies au cours de l'année 2020. Toutefois, en analysant quelques cas groupés de cryptosporidiose avec les données recueillies par le réseau sentinelle de santé publique France, nous suspectons la survenue de plusieurs épidémies en 2020 n'ayant pas pu être documentées.

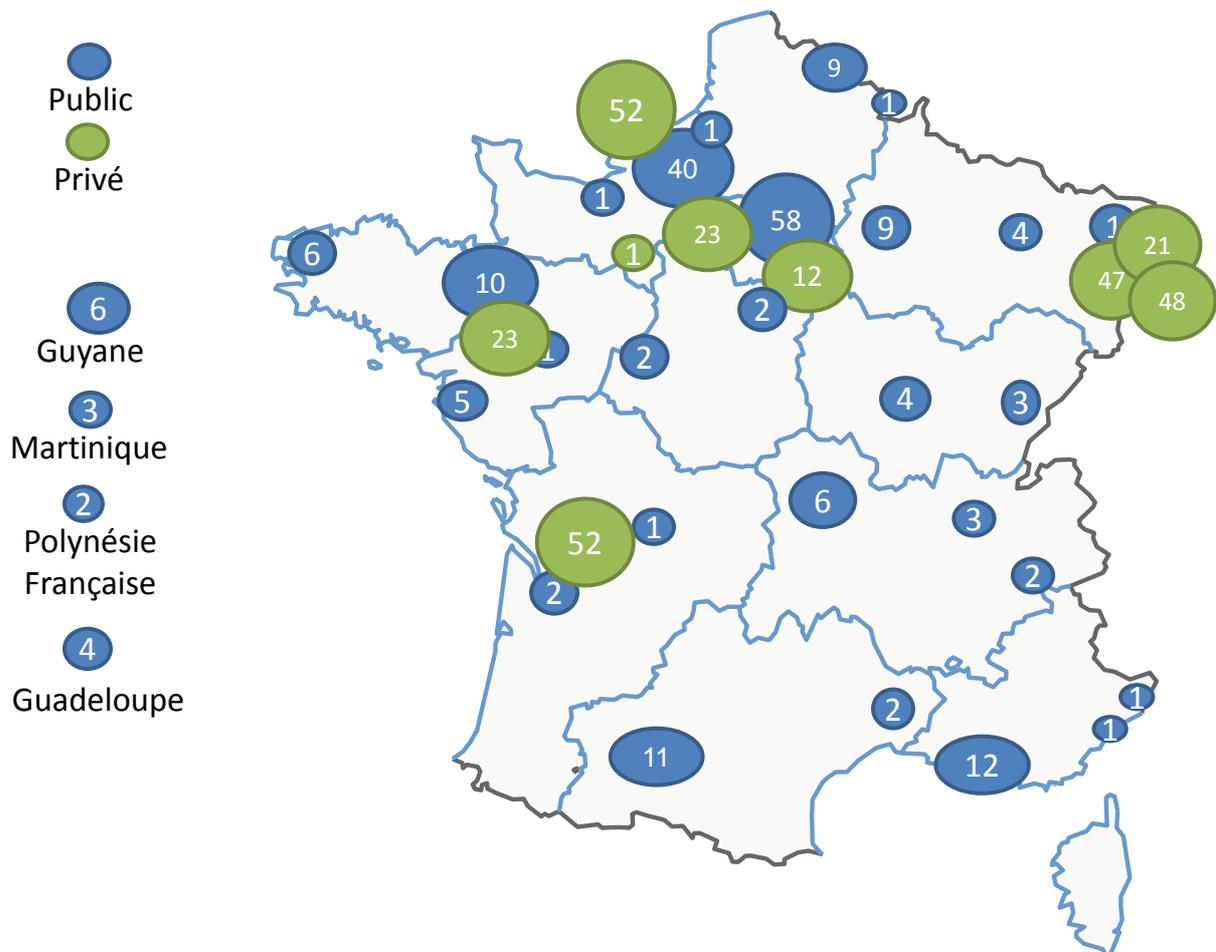
### 3.1 Description du réseau de partenaires

Pour l'année 2019, 11 laboratoires ont rejoint le réseau qui compte désormais 64 laboratoires : 13 laboratoires privés de biologie médicale, 40 CHU (10 parisiens, 27 en province et 3 outre-mer) 9 centres hospitaliers public et 2 HIA, En 2020, il n'y a eu aucun changement par rapport à 2019 concernant les centres partenaires. Ces hôpitaux ont effectuées 79298 recherches de *Cryptosporidium* dans des échantillons de selles en 2019 dont 1.2% (956) étaient positives. En 2020, 100563 recherches de *Cryptosporidium* ont été rapportées pour 856 positives (0.85%).

**Tableau 1 Bilan des analyses et cas de cryptosporidioses diagnostiquées par les membres du Réseau en 2020**

Laboratoires hospitaliers	Examen des selles		Recherche de cryptosporidioses			
	Total	Nbre de patients	Total recherches	Nbre de patients	Nbre de cas	Nbre de patients (cas déclarés)
ALES	109	94	22	22	1	1
AMIENS	553	318	479	294	2	2
ANGERS	616	502	219	171	6	6
ANTIBES	35	24	6	6	2	2
BESANCON	426	288	188	131	7	7
BORDEAUX	1529	930	600	310	4	4
BREST	497	293	388	217	6	4
CAEN	498	346	171	119	1	1
CLERMONT-FER	945	458	444	258	3	1
DIJON	725	500	725	500	3	3
FORTDEFRANCE	153	83	32	32	0	0
GRENOBLE	1635	918	111	82	5	5
LE HAVRE	142	114	16	11	0	0
LILLE	2165	1525	588	433	10	7
LIMOGES	466	250	229	144	11	6
LYON	2628	Non renseigné	402	130	4	2
MARSEILLE	1073	737	468	314	5	5
NANCY	789	484	260	169	4	3
NICE	775	466	405	261	4	2
NIMES	278	209	73	69	1	1
NOUMEA	380	Non renseigné	291	291	4	4
ORLEANS	487	385	93	91	1	1
PARIS BICHAT	1381	847	495	393	18	15
PARIS COCHIN	541	406	98	82	0	0
PARIS NECKER	749	480	733	473	6	1
PARIS POMPIDOU	472	273	400	234	1	1
PARIS St LOUIS	1271	722	945	548	20	16
PARIS StANT/TENON	1237	934	295	244	4	3
Paris Robet Debré	820	Non renseigné	820	Non renseigné	5	Non renseigné
POINTE A PITRE	346	234	187	Non renseigné	3	2

POITIERS	640	445	288	194	1	1
REIMS	2290	1468	1013	737	13	12
RENNES	1343	784	1455	848	9	7
ROUEN	1784	884	884	836	8	5
St ETIENNE	577	410	1127	775	17	15
STRASBOURG	887	640	300	230	8	5
TOULOUSE	1715	1165	1715	1165	36	24
TOURS	925	613	385	246	3	3
VALENCIENNES	393	333	50	35	0	0
<b>TOTAL (CHU+CHG)</b>	<b>34275</b>	<b>19562</b>	<b>17400</b>	<b>11095</b>	<b>236</b>	<b>177</b>
<b>LABM</b>						
cerba	11672	Non renseigné	11672	Non renseigné	128	Non renseigné
Biocéane	725	Non renseigné	725	Non renseigné	8	Non renseigné
Exalab Laboratoire	10536	8178	10536	8178	119	103
LABM Chatelain	11178	Non renseigné	11178	Non renseigné	105	Non renseigné
lcd paris	6160	Non renseigné	6160	Non renseigné	80	Non renseigné
Bioesterel	14036	Non renseigné	14036	Non renseigné	102	Non renseigné
Biopath	5750	1990	5750	1990	9	9
Biorylis	1788	Non renseigné	1788	Non renseigné	36	Non renseigné
SCHUH	4443	Non renseigné	4443	Non renseigné	33	Non renseigné
<b>TOTAL (LABM)</b>	<b>66288</b>	<b>10168</b>	<b>66288</b>	<b>10168</b>	<b>620</b>	<b>112</b>
Total	100563	29730	83688	21263	856	289



**Figure 1** Provenance géographique des échantillons reçus par le CNR-LE et le centre collaborateur en 2019 (sauf épidémie).

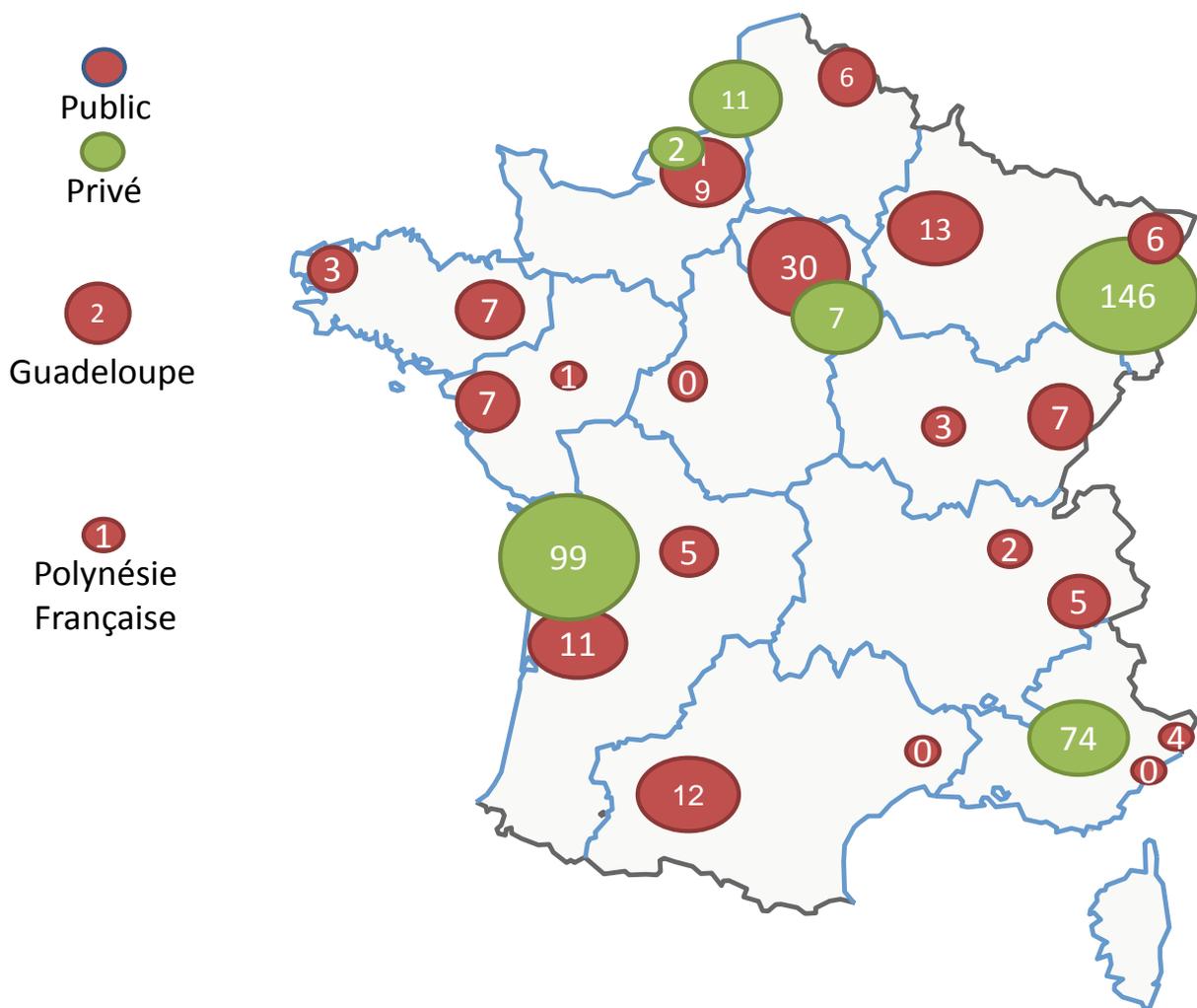


Figure 2 Provenance géographique des échantillons reçus par le CNR-LE et le centre collaborateur en 2020 (sauf épidémie).

### 3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En 2019 et en 2020, 350 et 373 déclarations ont été faites respectivement en ligne sur le site dédié <https://cnrlecryptosporidium.voozаноо.net/cnrlecryptosporidium>. par respectivement 40 et 39 laboratoires

#### 3.2.1 Distribution par âge

Conformément aux données des années précédentes, en 2019 et 2020, les populations les plus touchées par la cryptosporidiose en France étaient les jeunes enfants (< 5 ans) et les jeunes adultes (20 à 35 ans) (Figure 3). Le sexe-ratio était de 1, comme les années précédentes également. Parmi les jeunes enfants, la majorité des cas (50/84) est survenue sur cette période chez les moins de 2 ans et demi.

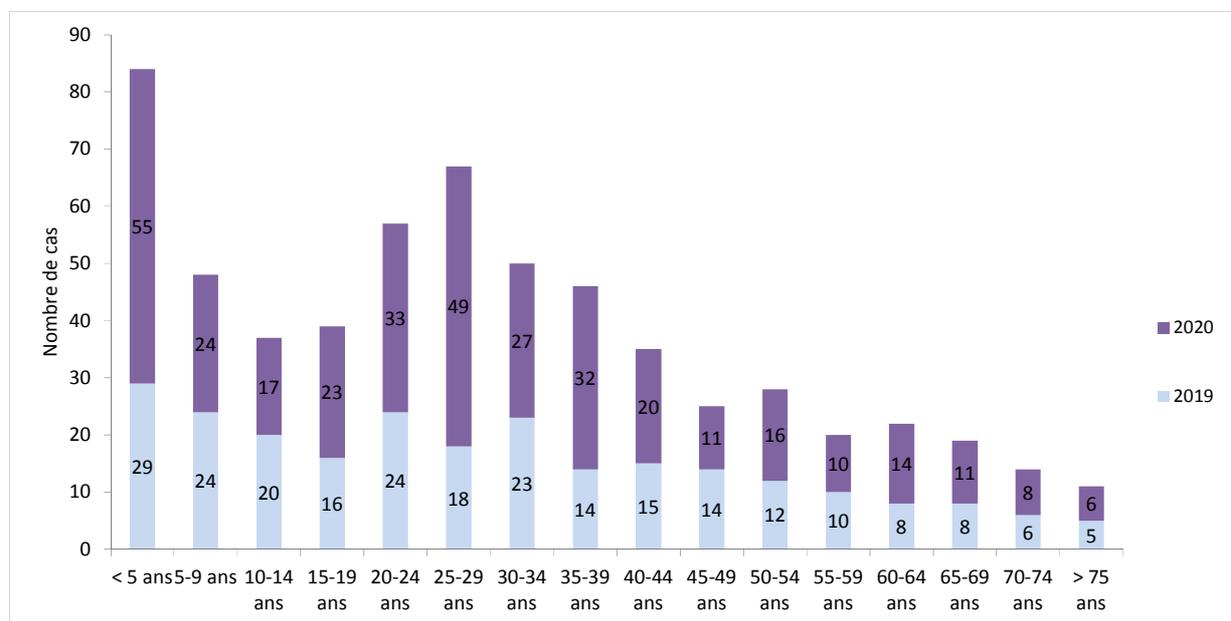
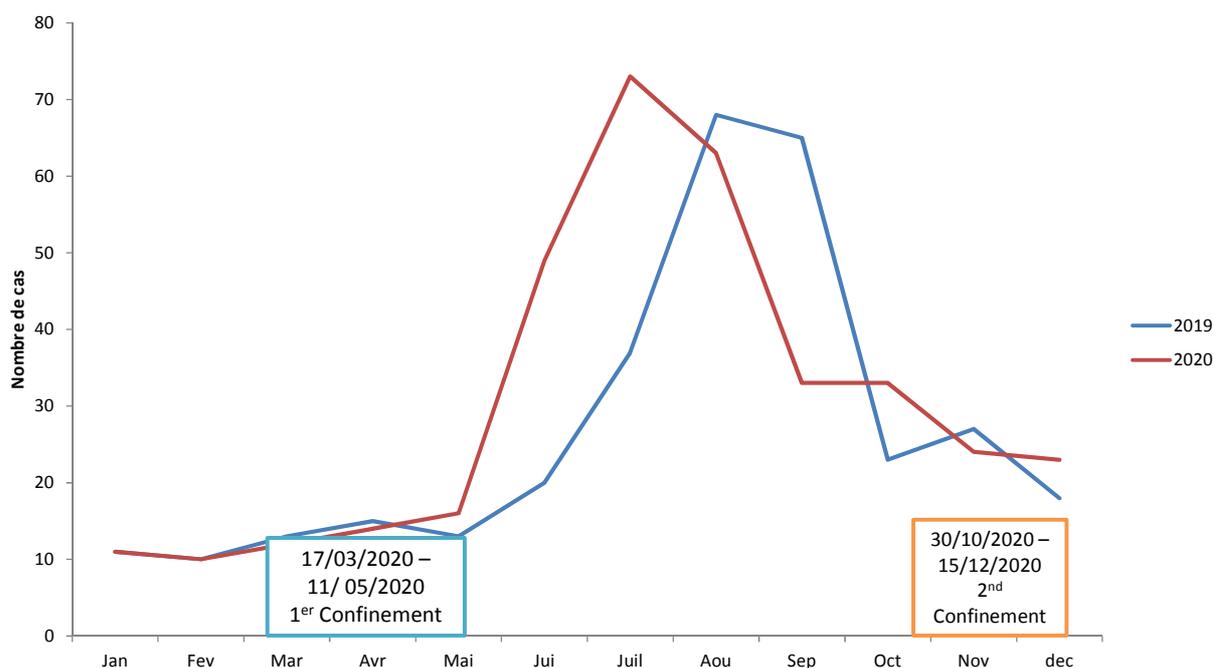


Figure 3 Démographie des cas de cryptosporidiose déclarés en France en 2019/2020

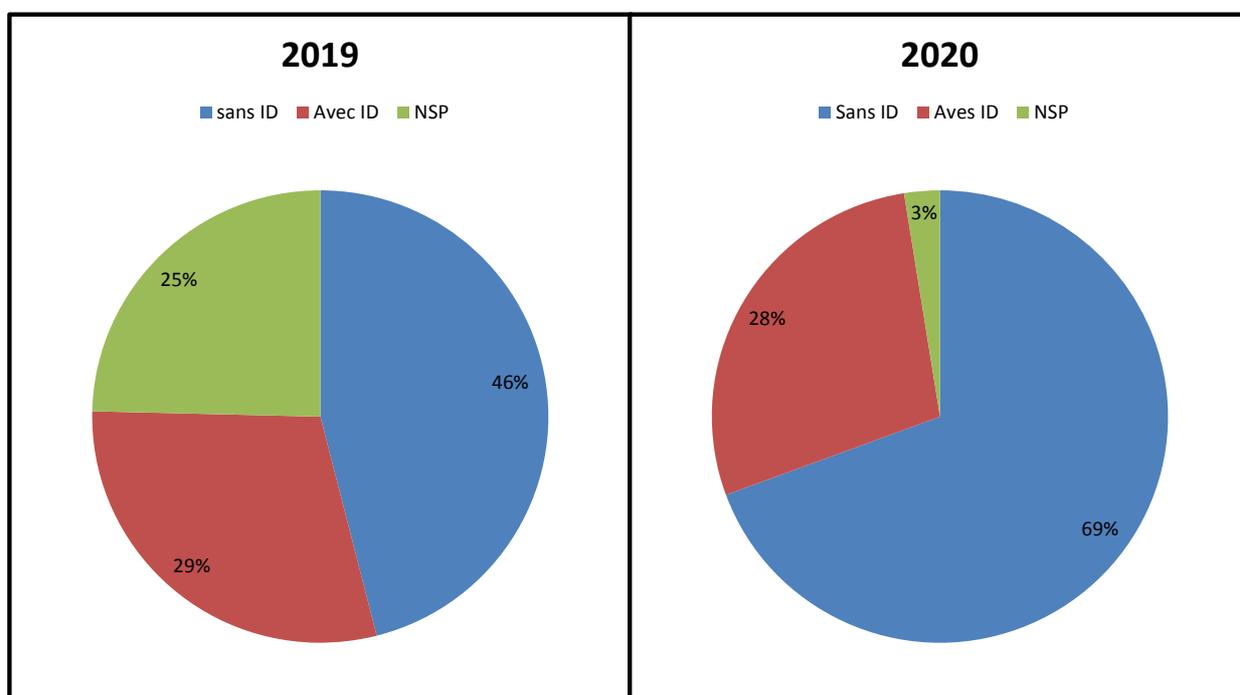
De façon intéressante, les mesures de confinement semblent avoir modifié la cinétique de survenue des cas de cryptosporidioses en France en 2020 (Figure 4). La distribution mensuelle des cas sur l'année 2019 est comparable à celle des années précédentes avec un pic saisonnier estival (entre fin juillet et fin septembre). Par contre, en 2020, le pic saisonnier a été observé plus précocement, dès la levée du premier confinement : entre fin mai et fin août. Concernant le risque de transmission directe par manuportage, à priori, les mesures « barrières » prises dans le cadre du contexte sanitaire n'ont pas évolué sur l'ensemble de l'année 2020. La précocité du pic saisonnier 2020 semble donc attribuable à la mobilité géographique nationale ayant eu lieu à partir de la levée du 1<sup>er</sup> confinement. L'hypothèse principale serait une contamination des patients par une source environnementale (hydrique et/ou alimentaire) durant cette période estivale probablement dans une zone géographique différente de la zone de résidence des patients. L'exposition à des souches de *Cryptosporidium*

absentes ou différentes de la zone de résidence est supposée dans un contexte de probable tolérance immunitaire survenant en cas d'exposition chronique à une même espèce.



**Figure 4 Distribution mensuelle des cas de cryptosporidioses en France en 2019 et 2020.**

En 2019 et 2020, 46 et 69% respectivement des patients avec une cryptosporidiose déclarée au CNR-LE étaient immunocompétents mais 25% des statuts immunitaires n'étaient pas renseignés en 2019 contre 3% en 2020 (Figure 5). La proportion de patients immunodéprimés reste stable par rapport aux années précédentes.



**Figure 5 Statut immunitaire des patients atteints de cryptosporidioses en 2019/2020 (ID: immunodépression / NSP : ne sais pas).**

En 2019/2020, les causes d'immunodépression des patients atteints de cryptosporidiose restent par ordre de fréquence : la transplantation d'organes solides (>50%), l'infection par le VIH

(>20%) et la greffe de moelle osseuse (10%) (Figure 6).

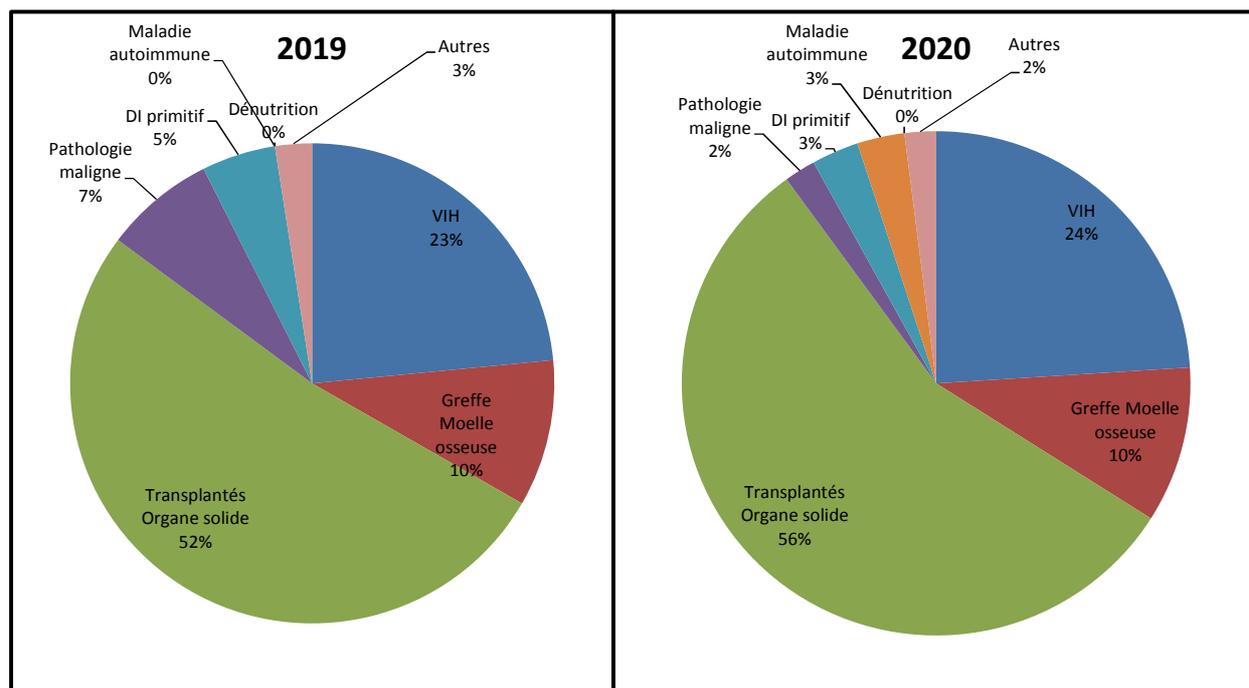


Figure 6 Pathologie expliquant l'immunodépression des patients atteints de cryptosporidioses en 2019/2020

Comme les années précédentes, environ 40% des patients atteints de cryptosporidiose étaient hospitalisés et parmi eux, environ 50% l'était du fait de leur cryptosporidiose. (Figures 7 et 8).

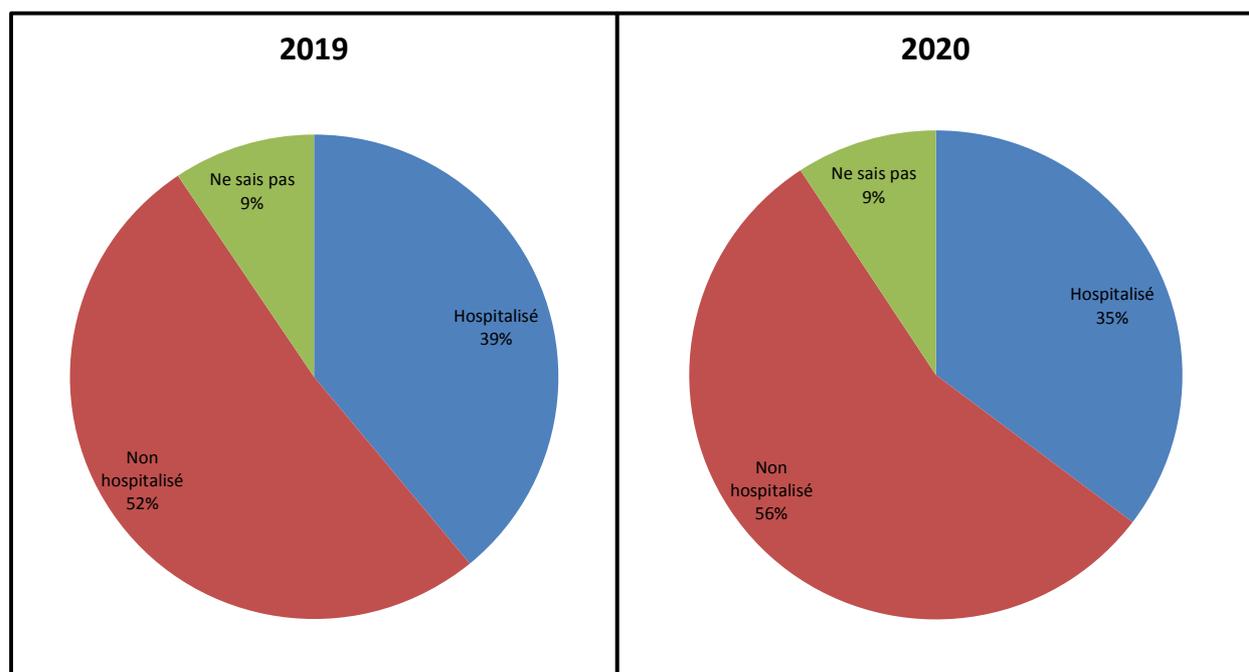
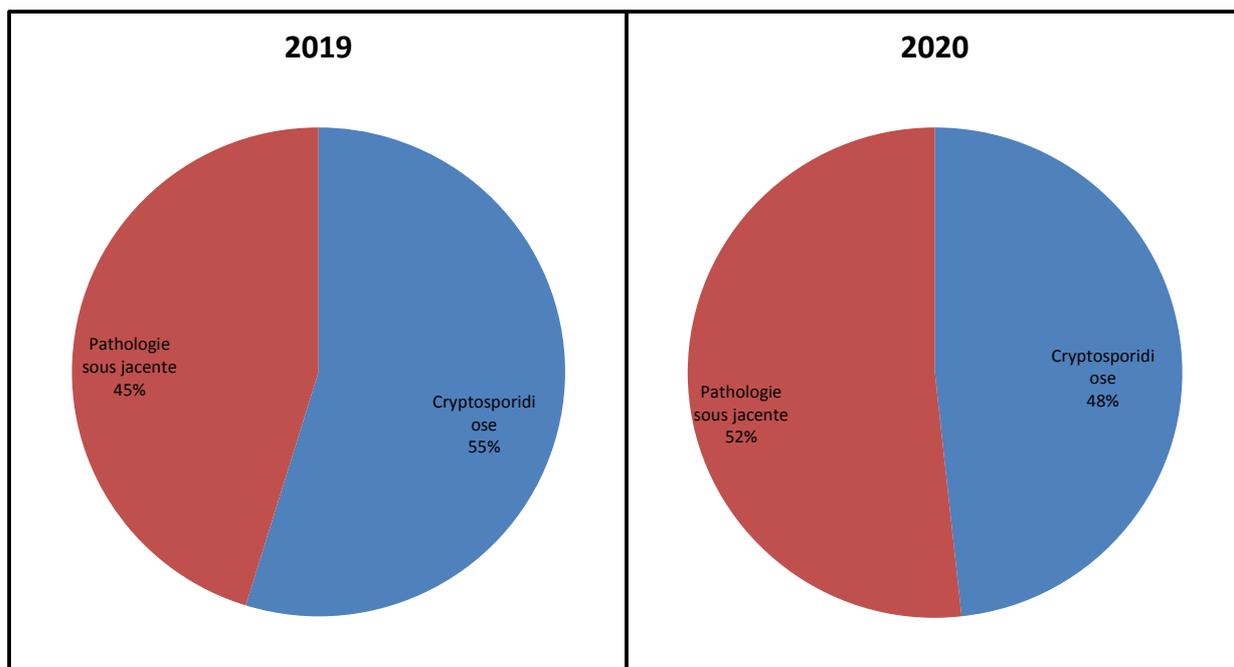


Figure 7 Proportion de patients hospitalisés atteints de cryptosporidioses en 2019/2020.



**Figure 8 Motif d'hospitalisation des patients atteints de cryptosporidiose en 2019/2020**

En 2019 et en 2020, 1 patient atteint de cryptosporidiose est décédé par année (1 immunodéprimé de 45-49 ans en 2019 et 1 immunocompétent de 25-29 ans en 2020). Ce chiffre est constant par rapport aux années précédentes.

Concernant la cause potentielle de l'infection, en 2019 : 15% des patients ont pu contracter leur infection à l'étranger, 11% étaient en contact avec un patient diarrhéique, 22% étaient en contact avec des animaux potentiellement contaminés, 33% ont pu contracter l'infection lors d'une baignade et 11% par l'intermédiaire d'un aliment potentiellement contaminé (ingestion de coquillage cru pour 16 patients, de lait cru non pasteurisé pour 12 patients et de cidre fermier pour 3 patients).

En 2020 : 5% des patients ont pu contracter leur infection à l'étranger, 16% étaient en contact avec un patient diarrhéique, 26% étaient en contact avec des animaux potentiellement contaminés, 18% ont pu contracter l'infection lors d'une baignade et 20% par l'intermédiaire d'un aliment potentiellement contaminé (ingestion de coquillage cru pour 33 patients, de lait cru non pasteurisés pour 33 patients et de cidre fermier pour 7 patients).

En 2019, l'espèce *C. parvum* représentait 68% des isolats (le sous-type majoritaire étant le IIaA15G2R1) et *C. hominis* 29% des isolats (le sous-type IbA10G2 étant le majoritaire). Cette répartition était équivalente à celle des années précédentes où un taux moyen de 72% et 24% de *C. parvum* et *C. hominis* respectivement était observé depuis 2017. Quelques espèces rares ont également été identifiées en 2019 : *C. chipmunk* (n=1), *C. canis* (n=2), *C. cuniculus* (n=4), *C. felis* (n=5), *C. meleagridis* (n=4) et *C. ubiquitum* (n=1).

En revanche en 2020, *C. parvum* a représenté 90% des isolats (IIaA15G2R1 majoritaire) et *C. hominis* 5% d'entre eux (IbA10G2 majoritaire). On note donc une différence importante des proportions de chacune des deux espèces par rapport à l'ensemble des années précédentes (Figure 9) probablement dues aux mesures sanitaires prises dans le contexte pandémique. *C. hominis* connu pour son tropisme humain préférentiel a donc été moins isolé que les années précédentes. Deux hypothèses principales sont avancées pour expliquer cela : 1) le renforcement des mesures d'hygiène des mains dans le contexte pandémique associé aux mesures de distanciation a probablement limité les contacts interhumains à risque ; 2) la limitation des voyages (à l'étranger et en métropole) a probablement joué également un rôle. Il est également intéressant de noter qu'en termes de nombre total de cas, les déclarations ont été similaires en 2019 (N=349) et 2020 (N=373) ; la cryptosporidiose en France ne semble donc pas transmise par les contacts interhumains en dehors du domicile familial. L'exposition à *C. parvum* semble donc ubiquitaire en France et au regard des conclusions précédentes sur *C. hominis*, l'exposition à *C. parvum* semble multifactorielle mais probablement préférentiellement liée à l'alimentation contaminée (hydrique et crudités). Pour les espèces rares, les isolats sont trop faiblement représentés pour pouvoir tirer ce type de conclusions.

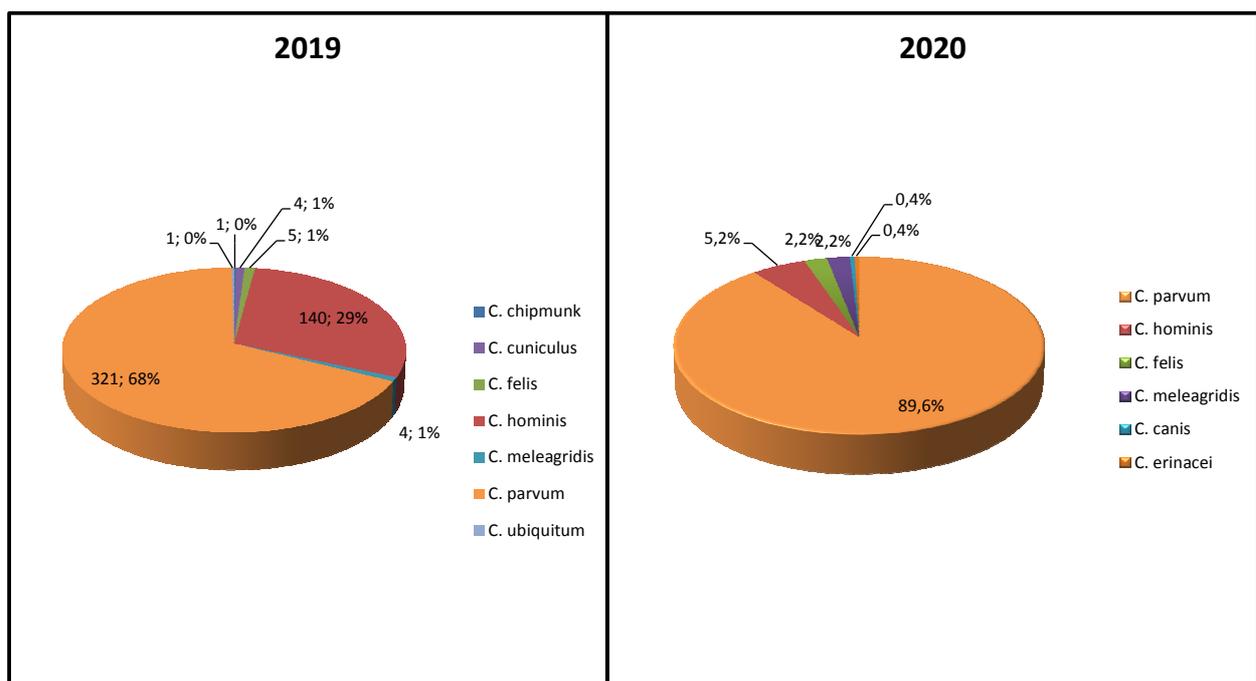


Figure 9 Répartition des espèces de *Cryptosporidium* isolées en 2019 et 2020.

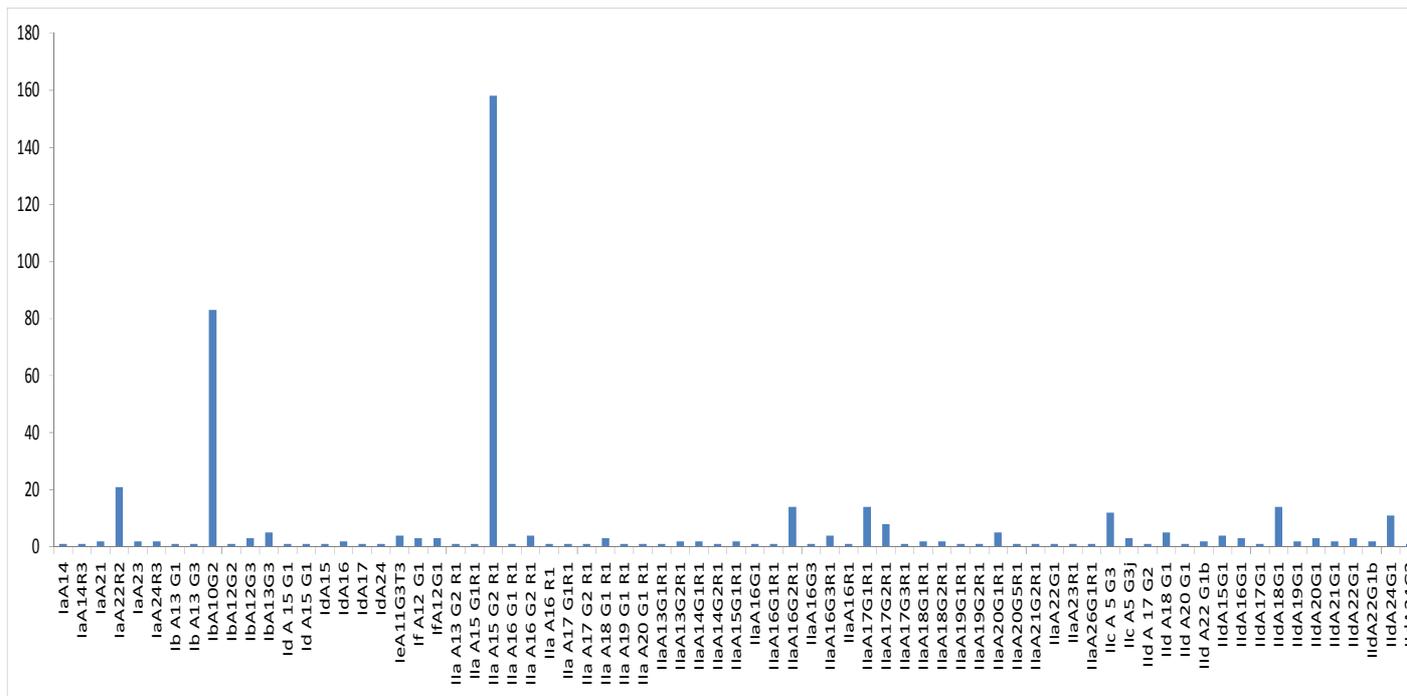


Figure 10 Génotypes gp60 des isolats de *Cryptosporidium* adressés et déclarés au CNR-LE en 2019

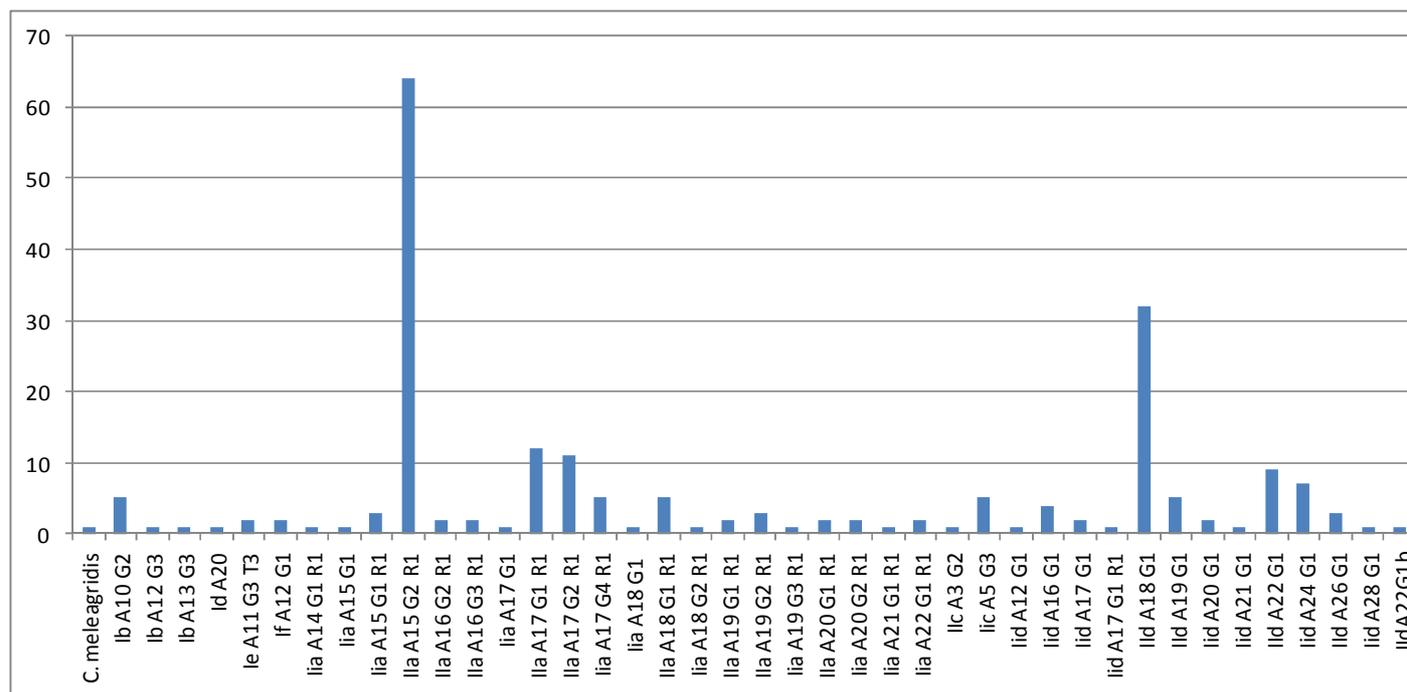


Figure 11 Génotypes gp60 des isolats de *Cryptosporidium* adressés et déclarés au CNR-LE en 2020

### 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

En continuité de nos échanges précédents, la collaboration avec le LNR de Maison Alfort a été renforcée avec la participation commune à un projet de recherche obtenu par le CNR-LE concernant la circulation environnementale de *Cryptosporidium* dans le bassin Grassois.

Les échanges internationaux avec le laboratoire de référence européen de Swansea du Pr Chalmers se pérennisent au travers des contrôles inter-laboratoires et de discussions scientifiques régulières autour de problématiques communes.

Enfin, l'année 2019 a été marquée par l'organisation en juin à Rouen, et pour la première fois en France, du 7th International *Giardia* and *Cryptosporidium* conference (IGCC), congrès international de référence dans le domaine de cette spécialité. Le congrès qui a réuni 237 chercheurs de 34 nationalités issus de plus de 100 équipes de recherche a été organisé par les membres du CNR-LE. Les nations les plus représentées en dehors de la France étaient les Etats Unis, la Grande Bretagne, l'Australie et le Brésil. Le nombre de chercheurs présents a dépassé le nombre escompté, confortant ainsi l'IGCC dans son statut de principale réunion scientifique internationale dans le domaine. Ce congrès a permis de renforcer la visibilité internationale du CNR-LE et d'initier de nombreux échanges prometteurs de prochaines collaborations internationales.

### **3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

Afin de documenter la circulation anthroponotique des souches de *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement hydrique en contexte karstique et selon les épisodes climatiques, une enquête est en cours dans le bassin Grassois en collaboration avec des hydrogéologues. Il s'agit de suivre mensuellement la contamination des ressources hydrique en amont de station de traitement des eaux et pendant les épisodes de pluie intense. En parallèle, les données microbiologiques classiques de suivi de la potabilité de l'eau sont documentées sur ces mêmes points de prélèvements.

## **4 Alertes**

Entre 2019 et 2020, le CNR-LE et le laboratoire collaborateur ont pu détecter et/ou investiguer 5 épidémies de cryptosporidiose : une épidémie liée à la baignade dans le lac de l'Hostens (4 cas); Deux épidémies plurimicrobiennes liées à la contamination accidentelle du réseau d'eau potable (épidémie de Breuil le sec fin avril 2019 (170 malades) et épidémie de Nantua (160 malades, septembre 2019) ; une épidémie massive liée à la contamination du réseau de distribution d'eau potable à Grasse, débutée en novembre 2019 a été identifiée après l'alerte donnée par le CNR LE à Santé Publique France : Le 13 novembre 2019, le CNR

LE informait Santé publique France d'un nombre anormalement élevé d'isolats de *Cryptosporidium* diagnostiqué par un regroupement de laboratoires d'analyse médicale dans la région PACA. Les investigations ont révélé la survenue d'une épidémie massive de cryptosporidiose d'origine hydrique à *C. parvum* de génotype *gp60* IIdA22G1. Néanmoins, les analyses réalisées sur les prélèvements hydriques ont révélé la présence de plusieurs sous-types de *Cryptosporidium* : IIdA22G1 / IIaA15G2R1 / IIdA17G2 / IIdA18G1 / IIaA17G1R1 reflétant la problématique d'identification des sous-types dominants sur prélèvements primaires évoquées précédemment. La population desservie par le réseau d'eau contaminé avoisine les 90 000 habitants. L'origine exacte de la contamination hydrique n'a pu être caractérisée, bien que le génotype dominant en cause soit principalement rencontré chez les ovins. Des parasites de ce génotype ont été retrouvés chez 138 patients ayant bu de l'eau contaminée. Le nombre de patients atteints de gastroentérite est toujours en cours d'estimation mais il s'agit de l'épidémie française la plus importante jamais décrite.

Enfin, une épidémie (12 cas avérés à *C. parvum* IIaA15G2R1) est survenue en octobre 2019 à Neufchatel en Bray chez des pompiers étant intervenus sur un accident de la voie publique et impliquant un camion transportant 140 veaux.

En 2020, une alerte a été transmise à Santé Publique France par le CNR-LE à la suite du diagnostic par le laboratoire collaborateur de cas groupés dans la région bordelaise de cryptosporidiose intestinale à IIdA18G1 (16 cas groupés). Malgré les investigations de santé publique France, aucune cause commune d'infection n'a été retrouvée. En outre, une épidémie de cryptosporidiose a probablement eu lieu entre juin et août aux alentours de Villefranche-de-Rouergue (Occitanie). En effet, l'un de nos laboratoires partenaire nous a alerté en réalisant rétrospectivement son bilan annuel, observant un regroupement de cas (une dizaine) survenus chez des enfants dans cette zone géographique en l'espace de quelques semaines. L'analyse des cartes du réseau sentinelles de surveillance des diarrhées aiguës montre effectivement un pic de diarrhées dans cette zone géographique au cours des semaines 25 et 26 (du 15/06 au 28/06 2020). Malheureusement des investigations plus poussées n'ont pas pu être réalisées, les échantillons fécaux sur lesquels le diagnostic a été porté n'ayant pas été conservés. De nombreux laboratoires partenaires du réseau, en particulier les laboratoires privés, nous ont témoigné de leur difficulté à concilier la recherche du Sars CoV-2 avec leurs activités de routine, expliquant au moins en partie ce manque de réactivité vis-à-vis des potentielles épidémies de cryptosporidiose pendant cette période.

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

Au dernier trimestre 2019, le CHU de Rouen (site hébergeant le serveur de données du CNR-LE) a été victime d'une attaque informatique de grande envergure. Les données issues

des déclarations sauvegardées ont pu être récupérées mais les conséquences ont été majeures : nécessitant la reconstruction totale d'un nouveau site de déclaration en ligne du CNR LE, ainsi que la saisie manuelle de l'ensemble des fiches de déclarations sur la nouvelle banque de données.

### 5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Initialement des formations multiples nationales et internationales avaient été prévues sur la période 2020 mais en raison du contexte sanitaire, les échanges internationaux sur site ont été annulés. En revanche en décembre 2019, 2 collègues algériennes sont venues se former au génotypage des souches au CNR LE à Rouen.

Comme chaque année, le CNR-LE a proposé un contrôle de qualité inter-laboratoire (CIL) aux laboratoires participants en 2019 et en 2020. 49 laboratoires ont participé au CIL 2019 et 40 en 2020. Chaque année, cinq échantillons ont été adressés à chaque laboratoire pour analyse : 3 destinés à l'examen microscopique ou à la recherche d'antigène et 2 à la détection par PCR. Les résultats sont satisfaisants et ont permis d'identifier la grande diversité des techniques utilisées (Cf Annexes 1 et 2).

#### - *Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) :*

Au niveau national, les biologistes du CNR-LE et du laboratoire collaborateur ont été sollicités pour rédiger des sections correspondant à leurs domaines d'expertise dans l'ouvrage « Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales » - fiches ECNi des collègues aux éditions Elsevier Masson paru en 2019.

De plus, les biologistes du CNR-LE et du laboratoire collaborateur ont été sollicités pour élaborer des cours sur la cryptosporidiose et les autres coccidioses disponibles sur la plateforme SIDES NG.

#### - *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 des réunions annuelles qui ont eu lieu les 19 novembre 2019 en présentiel à l'hôpital Cochin de Paris (environ 40 participants dont les frais de transport ont été pris en charge par le CNR-LE) et 23 novembre 2020 en distanciel. Ces réunions ont permis des échanges directs et la validation des décisions proposées par le comité de pilotage. L'ensemble des communications effectuées lors des réunions ont été envoyées par mail à tous les membres du réseau.

Concernant le contrôle inter-laboratoire 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 par les membres du réseau (4 en 2019 et 15 en 2020).

Les rapports annuels du CNR-LE sont disponibles sur le site du CNR-LE de même que les publications du CNR-LE et des centres partenaires.

*Activités de conseil aux professionnels de santé :*

Grâce à la communication aux professionnels de Santé du numéro de téléphone du CNR - LE, les biologistes médecins (LF, GG) du CNR-LE sont régulièrement sollicités (environ 120 appels par an) et apportent un appui aux professionnels concernés par la cryptosporidiose (médecins en charge des patients dont en particulier infectiologues, réanimateurs, gastroentérologues, pédiatres ; hygiénistes ; pharmaciens). De même, le laboratoire collaborateur est régulièrement sollicité par les professionnels de santé pour des conseils sur le diagnostic et la prise en charge de la cryptosporidiose.

## **5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires**

Lors de l'investigation de l'épidémie de Grasse, L. Favennec a représenté le CNR-LE en tant qu'expert aux réunions avec le Corruiss (Direction Générale de la Santé), le point focal alerte de santé Publique France, la cire PACA Corse, l'ARS Paca, la municipalité de Grasse et la préfecture des Alpes maritimes.

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

Il est prévu que des conseils d'hygiène à destination du grand public seront disponibles sur le site internet du CNR-LE.

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

*Ne mentionner ici que les nouveaux éléments, ne figurant pas déjà dans le dossier de candidature du CNR ou dans le rapport de l'année précédente.*

## **6.1 Activités de recherche en cours**

### **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 a été prolongée de manière à inclure plus d'animaux infectés par le parasite pour consolider les analyses statistiques. Les résultats démontrent pour l'instant une tendance à la transmission horizontale de *Cryptosporidium* dans les exploitations.

### **2. Etude de la circulation environnementale de *Cryptosporidium* sp. en milieu karstique**

Une étude est actuellement en cours dans le bassin Grassois afin de documenter la circulation des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement hydrique. L'objectif du projet est d'étudier la circulation et la survie des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement afin de documenter l'exposition de la population au travers des continuums hydrologiques du bassin grassois : étude de la circulation des oocystes de *Cryptosporidium* et évaluation de leur infectivité dans les bassins versants, depuis le sol pâturé (ovins, bovins, équins, suidés) jusqu'aux sources utilisées pour l'alimentation en eau potable. Des prélèvements d'eau sur site sont réalisés chaque mois sur une période de 9 mois d'échantillonnage.

A partir des résultats obtenus, un modèle statistique de la dissémination des cryptosporidies dans l'environnement étudié sera élaboré. Cela permettra de contribuer à la prévision des phénomènes biologiques et hydro-géologiques pouvant entraîner la contamination des ressources en eau.

### **3. Etude comparative des rendements d'extraction de *Cryptosporidium* sur matrices laitières**

Suite à la survenue d'épidémie les années précédentes sur matrices laitières, des travaux sont en cours afin d'évaluer les rendements d'extraction d'oocystes de *C. parvum* sur produits laitiers transformés ou non. Des oocystes de *C. parvum* ont été inoculés dans du lait entier et demi-écrémé de vache. A partir du lait contaminé, les rendements d'extraction des oocystes ont été comparés dans le lait et après transformation en faisselle/fromage blanc et dans le petit lait. Les résultats ont démontré un meilleur rendement de récupération en faisselle. Ces résultats sont importants pour la surveillance épidémiologique. Nous savons désormais qu'en cas de suspicion d'épidémie sur fromage frais, il est préférable d'investiguer la présence de *Cryptosporidium* sur faisselle.

### **4. Etude Cryptolait**

En complément de la thématique précédente, le financement d'un projet collaboratif a été obtenu en collaboration entre le CNR LE et notre partenaire ACTALIA sur l'évaluation de la contamination du lait cru de vache par le parasite *Cryptosporidium* spp. et des pratiques associées dans un contexte de circulation parasitaire supposée. Ce projet a été lauréat d'un appel à projet 2020 en Recherche technologique pour la compétitivité et la durabilité des filières de la production et de la transformation. Ce projet vise donc à développer et valider une procédure pour la détection/caractérisation de *Cryptosporidium* dans le lait cru de vache par biologie moléculaire, puis d'évaluer la probabilité de contamination du lait cru dans un contexte supposé de circulation de *Cryptosporidium* dans l'élevage. Ces données contribueront à accompagner les professionnels de la filière dans la maîtrise de la qualité sanitaire du lait cru.

## **5. Optimisation de l'extraction d'ADN de *Cryptosporidium* en vue d'analyses en WGS.**

L'extraction d'ADN de *Cryptosporidium* à partir des selles en quantité et qualité suffisante est un vrai challenge technique. L'impossibilité de cultiver *Cryptosporidium* nécessite d'optimiser le processus d'extraction correspondant. Ainsi, différents protocoles sont en cours d'évaluation pour sélectionner celui permettant la meilleure extraction d'ADN de *Cryptosporidium* spp. pour passer directement à l'étape de Whole genome sequencing.

## **6. Développement d'outils de typage moléculaire par NGS et WGS.**

Le laboratoire collaborateur du CNR-LE a développé un outil de typage moléculaire de *Cryptosporidium* spp. par NGS, ciblant le gène codant la protéine gp60 (technique de typage de référence actuellement). Des travaux sont en cours actuellement visant à évaluer l'intérêt du WGS dans l'investigation d'épidémies de cryptosporidiose. Le CNR LE développe quant à lui des techniques de séquençage WGS.

### **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**

*NB : Les membres du CNR, du laboratoire collaborateur (\*) et des membres du réseau du CNR (\*\*) sont en indiqués en gras.*

#### ***Publications nationales***

PN1 La cryptosporidiose et son impact en santé publique. M. SAWANT, S. BENAMROUZ, M. CHABE, K. GUYOT, **D. COSTA, L. FAVENNEC, G. GARGALA**, E. VISCOGLIOSI, G. CERTAD. Revue de Biologie Médicale. 2020.

Loury P, Gross L, Dugast F, Favennec L, Dalle F, de Rougemont A, *et al.* Épidémie de cryptosporidiose dans un collège de l'ouest de la France, novembre 2017. Bull Epidemiol Hebd. 2019;(16):295-300.

#### **Cours en ligne**

## D. COSTA

MOOC pour l'ANOFEL : « Protozooses intestinales : la cryptosporidiose » et « Protozooses intestinales : autres que le cryptosporidiose ». 2020

### **Publications internationales**

2019

PI1 Multiplex PCR reveals a high prevalence of multiple pathogens in traveller's diarrhoea in children.

POULETTY M, DE PONTUAL L, LOPEZ M, MORIN L, POILANE I, PHAM LL, CARBONNELLE E, TITOMANLIO L, FAYE A, **BONACORSI S\*\***.

Arch Dis Child. 2019 Feb;104(2):141-146.

PI2 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.

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\*\***.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2019 Jan;93(1):33-36.

PI3 Assessment of the first commercial multiplex PCR kit (ParaGENIE Crypto-Micro Real-Time PCR) for the detection of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bienersi*, and *Encephalitozoon intestinalis* from fecal samples. **MORIO F\*\***, **POIRIER P\*\***, **LE GOVIC Y\*\***, LAUDE A, **VALOT S\***, **DESOUBEAUX G\*\***,

**ARGY N\*\***, **NOURRISSON C\*\***, **POMARES C\*\***, **MACHOUART M\*\***, **DALLE F\***, **BOTTEREL F\*\***, **BOURGEOIS N\*\***, **CATEAU E\*\***, LETERRIER M, BESER J, **LAVERGNE RA\*\***, **LE PAPE P\*\***.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2019 Sep;95(1):34-37.

PI4 Prevalence, Molecular Identification, and Risk Factors for *Cryptosporidium* Infection in Edible Marine Fish: A Survey Across Sea Areas Surrounding France. CERTAD G, FOLLET J, GANTOIS N, HAMMOUMA-GHELBOUN O, **GUYOT K\*\***, BENAMROUZ-VANNESTE S, **FRÉALLE E\*\***, SEESAO Y, DELAIRE B, CREUSY C, EVEN G, VERREZ-BAGNIS V, RYAN U, GAY M, ALIOUAT-DENIS C, VISCOGLIOSI E.

Front Microbiol. 2019 May 15;10:1037.

PI5 Comparative Evaluation of Commercial Concentration Procedures for Human Intestinal Parasite Detection. **LEMÉTEIL D.**, **GARGALA G.**, **RAZAKANDRAINIBE R.**, BALLETT JJ, **FAVENNEC L.**, **COSTA D.** Laboratory Medicine. 2019, Jul 16;50(3):243-248.

2020

PI6 Cryptosporidiosis and microsporidiosis as causes of diarrhea in kidney and/or pancreas transplant recipients. DELTOMBE C, LEFEBVRE M, **MORIO F\*\***, BOUTOILLE D, IMBERT BM, **LE PAPE P\*\***, RAFFI F, HOURMANT M. Med Mal Infect. 2020 Aug;50(5):407-413.

PI7 Use of the bivalve *Dreissena polymorpha* as a biomonitoring tool to reflect the protozoan load in freshwater bodies. GÉBA E, **AUBERT D\*\***, DURAND L, ESCOTTE S, LA CARBONA S, CAZEAUX C, BONNARD I, BASTIEN F, PALOS LADEIRO M, DUBEY JP, **VILLENA I\*\***, GEFFARD A, BIGOT-CLIVOT A. Water Res. 2020 Mar 1;170:115297.

PI8 Detection methods and prevalence of transmission stages of *Toxoplasma gondii*, *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in fresh vegetables: a review. BERROUCH S, ESCOTTE-BINET S, HARRAK R, **HUGUENIN A\*\***, FLORI P, **FAVENNEC L**, **VILLENA I\*\***, HAFID J. Parasitology. 2020 Apr;147(5):516-532.

PI9 Update on *Cryptosporidium* spp.: highlights from the Seventh International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference. WIDMER G, CARMENA D, KVÁČ M, CHALMERS RM, KISSINGER JC, XIAO L, SATERIALE A, STRIEPEN B, LAURENT F, LACROIX-LAMANDÉ S, **GARGALA G**, **FAVENNEC L**. Parasite. 2020;27:14.

PI10 Cryptosporidiosis after treatment with fingolimod: a case report and pharmacovigilance review.

MARTINOT M, ABOU-BACAR A, LAMOTHE M, TEBACHER MA, ZADEH MM, **DALLE F\***, **FAVENNEC L**, **COSTA D**, **BRUNET J\*\***, SELAL F. BMC Infect Dis. 2020 Mar 30;20(1):257.

PI11 Evaluation of the Allplex™ Gastrointestinal Panel-Parasite Assay for Protozoa Detection in Stool Samples: A Retrospective and Prospective Study. AUTIER B, GANGNEUX JP, **ROBERT-GANGNEUX F\*\***.Microorganisms. 2020 Apr 15;8(4):569.

PI12 Cryptosporidiosis in HIV-positive patients and related risk factors: A systematic review and meta-analysis. AHMADPOUR E, SAFARPOUR H, XIAO L, ZAREAN M, HATAM-NAHAVANDI K, BARAC A, **PICOT S\*\***, RAHIMI MT, RUBINO S, MAHAMI-OSKOU EI M, SPOTIN A, NAMI S, BAGHI HB.Parasite. 2020;27:27.

PI13 Genetic basis for virulence differences of various *Cryptosporidium parvum* carcinogenic isolates. AUDEBERT C, BONARDI F, CABOCHE S, **GUYOT K\*\***, TOUZET H, MERLIN S, GANTOIS N, CREUSY C, MELONI D, MOURAY A, VISCOGLIOSI E, CERTAD G, BENAMROUZ-VANNESTE S, CHABÉ M.Sci Rep. 2020 Apr 30;10(1):7316.

PI14 Survival and infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* oocysts bioaccumulated by *Dreissena polymorpha*. GÉBA E, ROUSSEAU A, LE GUERNIC A, ESCOTTE-BINET S, **FAVENNEC L**, LA CARBONA S, **GARGALA G**, DUBEY JP, **VILLENA I\*\***, BETOULLE S, **AUBERT D\*\***, BIGOT-CLIVOT A.J Appl Microbiol. 2021 Feb;130(2):504-515.

PI15 Detection of intestinal parasites: Importance of the concentration method used. **LEMETEIL D**, **GARGALA G**, ANQUETIL LE, **RAZAKANDRAINIBE R**, BALLETT JJ, **FAVENNEC L**, **COSTA D**.Travel Med Infect Dis. 2020 Nov-Dec;38:101828.

PI16 Update on *Giardia*: Highlights from the seventh International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference. BURET AG, CACCIÒ SM, **FAVENNEC L**, SVÅRD S.Parasite. 2020;27:49.

PI17 Epidemiology of Cryptosporidiosis in France from 2017 to 2019. **COSTA D**, **RAZAKANDRAINIBE R**, **VALOT S\***, VANNIER M, **SAUTOUR M\***, **BASMACIYAN L\***, **GARGALA G**, **VILLER V**, **LEMETEIL D**, BALLETT JJ; FRENCH NATIONAL NETWORK ON SURVEILLANCE OF HUMAN CRYPTOSPORIDIOSIS, **DALLE F\***, **FAVENNEC L**.Microorganisms. 2020 Sep 4;8(9):1358.

PI18 Multicenter Comparative Study of Six *Cryptosporidium parvum* DNA Extraction Protocols Including Mechanical Pretreatment from Stool Samples. VALEIX N, **COSTA D**, **BASMACIYAN L\***, **VALOT S\***, VINCENT A, **RAZAKANDRAINIBE R**, **ROBERT-GANGNEUX F\*\***, **NOURRISSON C\*\***, PEREIRA B, **FRÉALLE E\*\***, **POIRIER P\*\***, **FAVENNEC L**, **DALLE F\***.Microorganisms. 2020 Sep 22;8(9):1450.

PI19 Evaluation of a modified method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts on spinach leaves. **RAZAKANDRAINIBE R**, KUBINA S, **COSTA D**, ROBINSON G, **LA CARBONA S\*\***, **AUBERT D\*\***, DAVID A, **GARGALA G**, **VILLENA I\*\***, **FAVENNEC L**, CHALMERS RM. Food Waterborne Parasitol. 2020 Oct 6;21:e00097.

PI20 Asymptomatic *Cryptosporidium* infections in ewes and lambs are a source of environmental contamination with zoonotic genotypes of *Cryptosporidium parvum*. BORDES L, HOUERT P, **COSTA D**, **FAVENNEC L**, VIAL-NOVELLA C, FIDELLE F, GRISEZ C, PREVOT F, JACQUIET P, **RAZAKANDRAINIBE R**.Parasite. 2020;27:57.

PI21 *Cryptosporidium*-Biofilm Interactions: a Review. LEFEBVRE M, **RAZAKANDRAINIBE R**, **VILLENA I\*\***, **FAVENNEC L**, **COSTA D**.Appl Environ Microbiol. 2021 Jan 15;87(3):e02483-20.

PI22 Assessment of a Multiplex PCR for the Simultaneous Diagnosis of Intestinal Cryptosporidiosis and Microsporidiosis: Epidemiologic Report from a French Prospective Study. MONIOT M, **NOURRISSON C\*\***, FAURE C, DELBAC F, **FAVENNEC L**, **DALLE F\***, GARROUSTE C, **POIRIER P\*\***.J Mol Diagn. 2021 Apr;23(4):417-423.

PI23 Target Identification of an Antimalarial Oxaborole Identifies AN13762 as an Alternative Chemotype for Targeting CPSF3 in Apicomplexan Parasites. BELLINI V, SWALE C, **BRENIER-PINCHART MP\*\***, PEZIER T, GEORGEAULT S, LAURENT F, HAKIMI MA, BOUGDOUR A.iScience. 2020 Nov 27;23(12):101871.

## 2021

PI24 Detection of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts from Lamb's Lettuce: CC-qPCR's Intake.

KUBINA S, **COSTA D**, **FAVENNEC L**, **GARGALA G**, ROUSSEAU A, **VILLENA I\*\***, LA CARBONA S, **RAZAKANDRAINIBE R**. Microorganisms. 2021 Jan 21;9(2):215.

PI25 Multicenter Evaluation of an ELISA for the Detection of *Cryptosporidium* spp. Antigen in Clinical Human Stool Samples. **RAZAKANDRAINIBE R**, MÉRAT C, **KAPEL N\*\***, **SAUTOUR M\*\***, **GUYOT K\*\***, **GARGALA G**, **BALLET JJ\***, **LE PAPE P\*\***; FRENCH CRYPTOSPORIDIOSIS NETWORK, **DALLE F\***, **FAVENNEC L**. Microorganisms. 2021 Jan 20;9(2):209.

PI26 Comparative Study of Eleven Mechanical Pretreatment Protocols for *Cryptosporidium parvum* DNA Extraction from Stool Samples. CLAUDEL L, VALEIX N, **BASMACIYAN L\***, PEREIRA B, **COSTA D**, VINCENT A, **VALOT S\***, **FAVENNEC L**, **DALLE F\***. Microorganisms. 2021 Feb 2;9(2):297.

PI27 Case Report: Two Cases of Cryptosporidiosis in Heavily Pretreated Patients With Myeloma. DEMONCHY J, CORDIER C, **FRÉALLE E\*\***, DEMARQUETTE H, HERBAUX C, ESCURE G, WILLAUME A, VAN DE WYNGAERT Z, NOEL MP, FACON T, FAURE K, CARO J, MORGAN G, DAVIES FE, ALFANDARI S, BORIES C, BOYLE EM. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2021 Feb 2:S2152-2650(21)00037-9.

PI28 Systemic efficacy on *Cryptosporidium parvum* infection of aminoxanide (RM-5061), a new amino-acid ester thiazolide prodrug of tizoxanide. DIAWARA EH, FRANÇOIS A, STACHULSKI AV, **RAZAKANDRAINIBE R**, **COSTA D**, **FAVENNEC L**, ROSSIGNOL JF, **GARGALA G**. Parasitology. 2021 Mar 29:1-10.

PI29 Occurrence of Ten Protozoan Enteric Pathogens in Three Non-Human Primate Populations. **MENU E\*\***, DAVOUST B, MEDIANNIKOV O, AKIANA J, MULOT B, DIATTA G, LEVASSEUR A, RANQUE S, RAOULT D, BITTAR F. Pathogens. 2021 Mar 2;10(3):280.

PI30 Disseminated *Cryptosporidium* infection in an infant with CD40L deficiency. DUPUY F, **VALOT S\***, **DALLE F\***, STERIN A, **L'OLLIVIER C\*\***. IDCases. 2021 Apr 7;24:e01115.

PI31 'Seven shades of *Cryptosporidium*'. CRESTIA J, **RAZAKANDRAINIBE R**, **COSTA D**, **DAMIANI C\*\***, **TOTET A\*\***, **LE GOVIC Y\*\***. Clin Microbiol Infect. 2021 Apr 29:S1198-743X(21)00210-X.

PI32 Comparative Performance of Eight PCR Methods to Detect *Cryptosporidium* species. **COSTA D**, SOULIEUX L, **RAZAKANDRAINIBE R**, **BASMACIYAN L\***, **GARGALA G**, **VALOT S\***, **DALLE F\***, **FAVENNEC L**. Pathogens. 2021 May 23;10(6):647.

PI33 Risk factors for sporadic cryptosporidiosis: A systematic review and meta-analysis. KOOH P, THÉBAULT A, CADAVEZ V, GONZALES-BARRON U, **VILLENA I\*\***. Microbial analysis. 2021, 17 100116.

#### *Communications nationales*

CN1 **D. COSTA**. Les infections gastro-intestinales parasitaires. Collège de Bactériologie-Virologie-Hygiène, 2019, Paris.

CN 2 **D. COSTA**, **S. VALOT\***, **FRENCH NATIONAL NETWORK ON SURVEILLANCE OF HUMAN CRYPTOSPORIDIOSIS**, **G. GARGALA**, **F. DALLE\***, **R. RAZAKANDRAINIBE**, **L. FAVENNEC**. Epidemiology of cryptosporidiosis in France (2015-2018). Congrès National de la SFP-SFMM 2019, Tours.

CN3 N. VALEIX, **S. VALOT**, **L. BASMACIYAN\***, **D. COSTA**, A. VINCENT, **R. RAZAKANDRAINIBE**, **F. ROBERT-GANGNEUX\*\***, **C. NOURRISSON\*\***, B. PEREIRA, **E. FREALLE\*\***, **P. POIRIER\*\***, **L. FAVENNEC**, **F. DALLE\***. Etude comparative multicentrique de méthodes d'extraction d'ADN de *Cryptosporidium parvum* à partir d'échantillons de selles. Congrès National de la SFP-SFMM 2019, Tours

#### *Communications internationales*

CI1 **D. COSTA**, **R. RAZAKANDRAINIBE**, C. TONG, S. WATIER, L. HOLTERBACH, A. MERENS, C. PETIT, V. POMMIER DE SANTI, **G. GARGALA**, **L. FAVENNEC**. *C. hominis* waterborne outbreak in a

French military camp, 2017. 7<sup>th</sup> International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference 2019, Rouen, France.

CI2 **L. BASMACIYAN\***, A. FRANCOIS, A. VINCENT, **S. VALOT\***, **D. COSTA**, **F. MORIO\*\***, **L. FAVENNEC**, **F. DALLE\***. The CerTest VIASURE™ PCR simplex and multiplex assays for the detection of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba sp* and *Cryptosporidium sp.*: Comparative evaluation with two commercial multiplex PCR kits and routine in-house simplex PCR assay. 7<sup>th</sup> International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference 2019, Rouen, France.

**CI3 R. RAZAKANDRAINIBE**, **D. COSTA**, I DIAWARA, M. LECOMTE, **G. GARGALA**, **L. FAVENNEC**. MCS6-7 sequences as markers of the bovine origin of *Cryptosporidium parvum* isolates from infected bovines and humans. 7<sup>th</sup> International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference 2019, Rouen, France.

CI4 P. LOURY, **L. FAVENNEC**, **R. RAZAKANDRAINIBE**, L. GROSS, F. DUGAST, **F. DALLE\***, A. DE ROUGEMONT, B. POLACK, D. GIRAUDEAU, **S. VALOT\***, **D. COSTA**, B. HUBERT. Cryptosporidiosis outbreak within a middle school in western France, november 2017. 7<sup>th</sup> International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference 2019, Rouen, France.

### Conférences sur invitation

#### 2019

##### **FAVENNEC L**

Detection of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium spp.* in stools : Is microcopy still accurate ? 7<sup>th</sup> International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference 2019, Rouen, France.

##### **GARGALA G**

Therapeutic aspects of cryptosporidiosis  
7<sup>th</sup> International *Giardia* and *Cryptosporidium* Conference 2019, Rouen, France.

#### 2020

##### **GARGALA G.**

Activity of thiazolides against *Cryptosporidium*.  
Third bi-annual Symposium on Innovative Therapeutics for *Cryptosporidium*. Washington, 11-12 mars 2020.

## **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 participation commune aux investigations environnementales de la circulation des oocystes de *Cryptosporidium* au sein du projet obtenu par le CNR LE.

De plus, le laboratoire Eurofins sollicite occasionnellement le CNR LE pour son activité d'expertise de séquençage sur des isolats environnementaux positifs à *Cryptosporidium spp.*

## 8 Programme d'activité pour les années suivantes

Suite au contexte sanitaire exceptionnel, la réactivité de certains membres du réseau a diminué en 2020. L'objectif des années à venir visera à retrouver une participation dynamique, active et prospective de l'ensemble des membres du réseau afin de pouvoir détecter en temps réel des cas groupés ou des phénomènes épidémiologiques.

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 impactés par le contexte sanitaire sera accentué dès que possible.

Travaux de recherche appliquée envisagés par le CNR-LE et le laboratoire collaborateur, en lien avec ses missions :

1/ Dans le cadre d'un programme de recherche (2018-2022) 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 en protéomique et en transcriptomique des oocystes. 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/ Nous avons déposé un appel à candidature pour un doctorat de 3 ans en co-direction avec nos collègues de Besançon pour travailler sur le développement de capteurs passifs pour un monitoring continu de la contamination environnementale à *Cryptosporidium*. Il s'agira d'étudier (en laboratoire dans un premier temps), différents prototypes de captage des oocystes en environnement hydrique. Puis, après avoir sélectionné les meilleurs capteurs, nous les testerons en condition environnementale réel. Le but de ce projet vise à optimiser la détection des oocystes dans l'eau d'une façon efficace et simple pour pouvoir généraliser le suivi de la contamination des eaux à *Cryptosporidium*.

3/ Un projet est en cours, associant le laboratoire collaborateur du CNR-LE et l'équipe CNRS UMR 6249 Chrono-environnement (Besançon), visant à étudier l'évolution de la distribution de *Cryptosporidium* sp. aux différentes périodes de l'histoire, depuis le néolithique à nos jours, à partir d'une collection d'échantillons anciens disponible dans l'équipe CNRS UMR 6249

Chrono-environnement (Besançon). Cette équipe a collecté des échantillons anciens et optimisé une technique d'extraction des acides nucléiques en vue de leur séquençage en NGS. La contribution du laboratoire collaborateur du CNR-LE dans ce projet sera la mise en évidence de *Cryptosporidium* spp. par techniques moléculaires puis, sur les échantillons d'intérêt, le séquençage de génome entier (Whole Genome Sequencing) de *Cryptosporidium* spp. en vue d'études épidémiologiques. Ce projet doit à terme favoriser l'émergence d'un pôle régional d'analyses paléogénétiques trouvant de nombreuses applications dans différents champs de recherche fondamentale, tant dans les domaines des paléo-sciences, des sciences de l'évolution, de la santé, que de l'archéologie.

**Annexe 1 : Résultats au CIL 2019**

**INSTITUT DE BIOLOGIE CLINIQUE  
Laboratoire de Parasitologie Mycologie**

**CNR LABORATOIRE EXPERT**

**CRYPTOSPORIDIOSES**

**CIL *Cryptosporidium* 2019**

**Nombre de participants : 49**

<b>Echantillon A (selle)</b>			<b>Résultats des participants*</b>		
	<b>Résultat attendu</b>	<b>Votre Résultat</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>NR</b>
<b>Microscopie +/- TDR</b>	<b>Positif</b>		38	0	11
<b>PCR</b>	<b>Positif</b>		19	0	30
<b>Ct obtenus (moy +/- ET)</b>					

NR : non réalisé. \*: Certains participants utilisent plusieurs techniques d'analyse.

TDR : Test de Diagnostic Rapide

<b>Résultats des participants</b>		
<b>Nombre d'oocystes</b>	De : <1/10 champs à 150/10 champs	
<b>Techniques utilisées par les participants</b>		
	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>
<b>Ziehl-Nielsen</b>	29	0
<b>Glycérine</b>	1	0
<b>Heine</b>	4	0
<b>Kinyoun</b>	1	0
<b>Auramine</b>	1	0
<b>Merifluor®</b>	1	0
<b>Ridaquick®</b>	0	0
<b>ImmunoCard STAT®</b>	0	0
<b>Giardia/Cryptosporidium quick chek®</b>	0	0
<b>TDR</b>	1	0
<b>Non réalisé</b>	11	

Résultats des participants : selles A			
Techniques PCR utilisées			
Extraction	Amplification	Positif (Ct)	Négatif
Fast Prep 24 + easy mag d'après Mary et al JCM 2013 (pages 2256 à 2263)	BMC infectious diseases (2016), Brunet et el.	Ct 23	
STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit 7444300.4UC384. <b>Kit</b> : Stararlet IVD (Microlab STARlet IVD <sup>®</sup> )	Allplex GI Assays. <b>Kit</b> : Seegen. GI9703X	Ct 34.88	
FastDNA stool mini kit. <b>Kit</b> : Kit QIAamp R. <b>Lot</b> : 163021578	Stratagène Mx3005. <b>Kit</b> : Kit Ridagen/P61715 , <b>lot</b> :14259		
QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen). <b>Lot</b> : 163019516. <b>Ref</b> : 51804	Temps réel une sonde Taqman. GenBank : EU675853.1. (Mary et al, JCM, 2013). Amplification d'un fragment de 178pb spécifique de <i>Cryptosporidium sp.</i>	Ct 20.73	
Quick-DNA Fecal/Soil Microbe - Zymo Research. <b>Lot et Ref</b> : D6010	Le Govic et al. Eur J clin Microbiol Infect dis 2016 ; 35(1) ; 137-148	Ct 23.83	
Easymag	Ridagene	Ct 23	
EZ1 DNA tissus kit Quiagen. Ref : 953034. Lot : 163023905	Amplidiag MOBIDIAG. Ref : AD SP100 Lot : 19019157		
FilmArray GI panel v2.1. <b>Lot</b> : 650919	FilmArray GI panel v2.1. <b>Lot</b> : 650919		
Starlet Microlab. <b>Kit</b> : Allplex GI Seegen. GI0818E02	Technique MuDT PCR temps réel. Eurokit CFX 96		
BD max enteric Parasite Panel. <b>Ref</b> : 442960. <b>Lot</b> : 9106889	BD max enteric Parasite Panel. Ref : 442960. Lot : 9106889	Ct 25.3	
SP200 Elitech (précédée d'une étape de broyage mécanique)	Technique maison Mary et al, JCM 2013	Ct 24.93	
NucliSens EasyMag (BioMérieux)	Allplex GI-Parasite (Eurobio Ingen)	Ct 25.45	
Pré-extraction Magnalyser + BLB + Extraction manuelle Hight Pure PCR template preparation kit (Roche)	Amplidiag Stool Parasites MOBIDIAG	Ct 25.39	
PCR avec l'automate BDmax fournisseur : Becton-Dickinson. Kit BD Max Enteric Parasi. Ref : 442960. Lot : K53916273720201116			
Easymag avec lyse préalable en tampon de lyse (Easymag) et congélation/décongélation; <b>Kit</b> : BioMérieux Easymag	R Biopharm. Ridagene Parasite Stool Panel. Ref : 13228	Ct 26.82	
Biomerieux EMAG.	Bioevolution, cryptosporidies generique. Ref : BE-A990-CD. Lot: 190312	Ct 24.19	
Kit Amplidiag stool parasites AD-SP100. Automates amplidiag easy et CFX 96			
Starmag universal Cartridge kit Seegen. Lot : UC 9619E22	Allplex GI Parasite Assay-Seegene. Lot : GI 0819 E02	Ct 38.48	
EZ1 virusminikit Quiagen sur extraction quiazen EZ1 XL. Ref : 955134. Lot : 163027155	Seegene. Allplec Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02	Ct 25.24	
	PCR Multiplexe EVROBIO NIMBUS. Allplex Seegene GI Parasite Assay. <b>Ref</b> : G19703X <b>Lot</b> : G10819E02	Ct 26	
	Mary et al JCM 2013		
Seegen. Star Mag (744300 40C384). Lot : UC 9614I27	Seegene. Allplex Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02	Ct 26.82	

<b>Echantillon B (selle)</b>					
			<b>Résultats des participants*</b>		
	<b>Résultat attendu</b>	<b>Votre Résultat</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>NR</b>
<b>Microscopie +/- TDR</b>	<b>Positif</b>		36	2	11
<b>PCR</b>	<b>Positif</b>		18	1	30
<b>Ct obtenus (moy +/- ET)</b>					

NR : non réalisé. \*: Certains participants utilisent plusieurs techniques d'analyse.

TDR : Test de Diagnostic Rapide

<b>Résultats des participants</b>		
<b>Nombre d'oocystes</b>	<b>De rare à 5/10 champs</b>	
<b>Techniques utilisées par les participants</b>		
	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>
<b>Ziehl-Nielsen</b>	27	2
<b>Glycérine</b>	1	0
<b>Heine</b>	4	0
<b>Kinyoun</b>	1	0
<b>Auramine</b>	1	0
<b>Merifluor®</b>	1	0
<b>Ridaquick®</b>	0	0
<b>ImmunoCard STAT®</b>	0	0
<b>Giardia/Cryptosporidium quick chek®</b>	0	0
<b>TDR</b>	1	0
<b>Non réalisé</b>	11	

Résultats des participants Selles B			
Techniques PCR utilisées			
Extraction	Amplification	Positif (Ct)	Négatif
Fast Prep 24 + easy mag d'après Mary et al JCM 2013 (pages 2256 à 2263)	BMC infectious diseases (2016), Brunet et el.	Ct 28	
STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit 7444300.4UC384. <b>Kit</b> : Stararlet IVD (Microlab STARlet IVD°	Allplex GI Assays. <b>Kit</b> : Seegen. GI9703X	Ct 37.4	
FastDNA stool mini kit. <b>Kit</b> : Kit QIAamp R. <b>Lot</b> : 163021578	Stratagène Mx3005. <b>Kit</b> : Kit Ridagen/ P61715 , <b>lot</b> :14259		1
QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen). <b>Lot</b> : 163019516. <b>Ref</b> : 51804	Temps réel une sonde Taqman. GenBank : EU675853.1. (Mary et al, JCM, 2013). Amplification d'un fragment de 178pb spécifique de <i>Cryptosporidium</i> sp.	Ct 26.06	
Quick-DNA Fecal/Soil Microbe - Zymo Research. <b>Lot et Ref</b> : D6010	Le Govic et al. Eur J clin Microbiol Infect dis 2016 ; 35(1) ; 137-148	Ct 29.04	
Easymag	Ridagene	Ct 26	
EZ1 DNA tissues kit Quiagen. Ref : 953034. Lot : 163023905	Amplidiag MOBIDIAG. Ref : AD SP100 Lot : 19019157		
FilmArray GI panel v2.1. <b>Lot</b> : 650919	FilmArray GI panel v2.1. <b>Lot</b> : 650919		
Starlet Microlab. <b>Kit</b> : Allplex GI Seegen. GI0818E02	Technique MuDT PCR temps réel. Eurokit CFX 96		
BD max enteric Parasite Panel. <b>Ref</b> : 442960. <b>Lot</b> : 9106889	BD max enteric Parasite Panel. Ref : 442960. Lot : 9106889	Ct 30.4	
SP200 Elitech (précédée d'une étape de broyage mécanique)	Technique maison Mary et al, JCM 2013	Ct 28.63	
NucliSens EasyMag (BioMérieux)	Allplex GI-Parasite (Eurobio Ingen)	Ct 28.3	
Pré-extraction Magnalyser + BLB + Extraction manuelle Hight Pure PCR template preparation kit (Roche)	Amplidiag Stool Parasites MOBIDIAG	Ct 30.81	
PCR avec l'automate BDmax fournisseur : Becton-Dickinson. Kit BD Max Enteric Parasi. Ref : 442960. Lot : K53916273720201116			
Easymag avec lyse préalable en tampon de lyse (Easymag) et congélation/décongélation; <b>Kit</b> : BioMérieux Easymag	R Biopharm. Ridagene Parasite Stool Panel. Ref : 13228	Ct 31.3	
Biomerieux EMAG.	Bioevolution, cryptosporidies generique. Ref : BE-A990-CD. Lot: 190312	Ct 28.67	
Kit Amplidiag stool parasites AD-SP100. Automates amplidiag easy et CFX 96			
Starmag universal Cartridge kit Seegen. Lot : UC 9619E22	Allplex GI Parasite Assay-Seegene. Lot : GI 0819 E02	Ct 41.55	
EZ1 virusminikit Quiagen sur extraction quiazen EZ1 XL. Ref : 955134. Lot : 163027155	Seegene. Allplec Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02	Ct 31.95	
	PCR Multiplexe EVROBIO NIMBUS. Allplex Seegene GI Parasite Assay. <b>Ref</b> : G19703X <b>Lot</b> : G10819E02	Ct 31	
	Mary et al JCM 2013		
Seegen. Star Mag (744300 40C384). Lot : UC 9614I27	Seegene. Allplex Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02	Ct 31.74	

<b>Echantillon C (selle)</b>					
			<b>Résultats des participants*</b>		
	<b>Résultat attendu</b>	<b>Votre Résultat</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>NR</b>
<b>Microscopie +/- TDR</b>	<b>NEGATIF</b>		0	38	11
<b>PCR</b>	<b>NEGATIF</b>		0	19	30
<b>Ct obtenus (moy +/- ET)</b>					

NR : non réalisé. \*: Certains participants utilisent plusieurs techniques d'analyse.

TDR : Test de Diagnostic Rapide

<b>Résultats des participants</b>		
<b>Techniques utilisées par les participants</b>		
	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>
<b>Ziehl-Nielsen</b>	0	29
<b>Glycérine</b>	0	1
<b>Heine</b>	0	4
<b>Kinyoun</b>	0	1
<b>Auramine</b>	0	1
<b>Merifluor®</b>	0	1
<b>Ridaquick®</b>	0	0
<b>ImmunoCard STAT®</b>	0	0
<b>Giardia/Cryptosporidium quick chek®</b>	0	0
<b>TDR</b>	0	1
<b>Non réalisé</b>	11	

<b>Résultats des participants Selles C</b>			
<b>Techniques PCR utilisées</b>			
<b>Extraction</b>	<b>Amplification</b>	<b>Positif (Ct)</b>	<b>Négatif</b>
Fast Prep 24 + easy mag d'après Mary et al JCM 2013 (pages 2256 à 2263)	BMC infectious diseases (2016), Brunet et el.		1
STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit 7444300.4UC384. <b>Kit</b> : Stararlet IVD (Microlab STARlet IVD°	Allplex GI Assays. <b>Kit</b> : Seegen. G19703X		1
FastDNA stool mini kit. <b>Kit</b> : Kit QIAamp R. <b>Lot</b> : 163021578	Stratagène Mx3005. <b>Kit</b> : Kit Ridagen/ P61715 , <b>lot</b> :14259		1
QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen). <b>Lot</b> : 163019516. <b>Ref</b> : 51804	Temps réel une sonde Taqman. GenBank : EU675853.1. (Mary et al, JCM, 2013). Amplification d'un fragment de 178pb spécifique de <i>Cryptosporidium sp.</i>		1
Quick-DNA Fecal/Soil Microbe - Zymo Research. <b>Lot et Ref</b> : D6010	Le Govic et al. Eur J clin Microbiol Infect dis 2016 ; 35(1) ; 137-148		1
Easymag	Ridagene		
EZ1 DNA tissues kit Quiagen. Ref : 953034. Lot : 163023905	Amplidiag MOBIDIAG. Ref : AD SP100 Lot : 19019157		1
FilmArray GI panel v2.1. <b>Lot</b> : 650919	FilmArray GI panel v2.1. <b>Lot</b> : 650919		1
Starlet Microlab. <b>Kit</b> : Allplex GI Seegem. G10818E02	Technique MuDT PCR temps réel. Eurokit CFX 96		
BD max enteric Parasite Panel. <b>Ref</b> : 442960. <b>Lot</b> : 9106889	BD max enteric Parasite Panel. Ref : 442960. Lot : 9106889		1
SP200 Elitech (précédée d'une étape de broyage mécanique)	Technique maison Mary et al, JCM 2013		1
NucliSens EasyMag (BioMérieux)	Allplex GI-Parasite (Eurobio Ingen)		1
Pré-extraction Magnalyser + BLB + Extraction manuelle Hight Pure PCR template preparation kit (Roche)	Amplidiag Stool Parasites MOBIDIAG		1
PCR avec l'automate BDmax fournisseur : Becton-Dickinson. Kit BD Max Enteric Parasi. Ref : 442960. Lot : K53916273720201116			1
Easymag avec lyse préalable en tampon de lyse (Easymag) et congélation/décongélation; <b>Kit</b> : BioMérieux Easymag	R Biopharm. Ridagene Parasite Stool Panel. Ref : 13228		1
Biomerieux EMAG.	Bioevolution, cryptosporidies generique. Ref : BE-A990-CD. Lot: 190312		1
Kit Amplidiag stool parasites AD-SP100. Automates amplidiag easy et CFX 96			1
Starmag universal Cartridge kit Seegem. Lot : UC 9619E22	Allplex GI Parasite Assay-Seegene. Lot : GI 0819 E02		
EZ1 virusminikit Quiagen sur extraction quiazen EZ1 XL. Ref : 955134. Lot : 163027155	Seegene. Allplec Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02		1
	PCR Multiplexe EVROBIO NIMBUS. Allplex Seegene GI Parasite Assay. <b>Ref</b> : G19703X <b>Lot</b> : G10819E02		1
	Mary et al JCM 2013		1
Seegen. Star Mag (744300 40C384). Lot : UC 9614I27	Seegene. Allplex Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02		1

### Echantillons d'ADN

Echantillon 1(ADN de <i>C. cuniculus</i> )					
			Résultats des participants		
	Résultat attendu	Votre Résultat	Positif	Négatif	NR
<b>PCR</b>	<b>POSITIF</b>		20	1	28
<b>Ct obtenus (n=17)</b>					

Résultats des participants ADN1			
Techniques PCR utilisées			
Extraction	Amplification	Positif (Ct)	Négatif
Fast Prep 24 + easy mag d'après Mary et al JCM 2013 (pages 2256 à 2263)	BMC infectious diseases (2016), Brunet et el.	Ct 27	
STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit 7444300.4UC384. <b>Kit</b> : Stararlet IVD (Microlab STARlet IVD°	Allplex GI Assays. <b>Kit</b> : Seegen. Gi9703X	Ct 29.75	
FastDNA stool mini kit. <b>Kit</b> : Kit QIAamp R. <b>Lot</b> : 163021578	Stratagène Mx3005. <b>Kit</b> : Kit Ridagen/ P61715 , <b>lot</b> :14259		
QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen). <b>Lot</b> : 163019516. <b>Ref</b> : 51804	Temps réel une sonde Taqman. GenBank : EU675853.1. (Mary et al, JCM, 2013). Amplification d'un fragment de 178pb spécifique de <i>Cryptosporidium sp.</i>	Ct 28.45	
Quick-DNA Fecal/Soil Microbe - Zymo Research. <b>Lot et Ref</b> : D6010	Le Govic et al. Eur J clin Microbiol Infect dis 2016 ; 35(1) ; 137-148	Ct 30.86	
Easymag	Ridagene	Ct 27	
EZ1 DNA tissus kit Quiagen. <b>Ref</b> : 953034. <b>Lot</b> : 163023905	Amplidiag MOBIDIAG. <b>Ref</b> : AD SP100 <b>Lot</b> : 19019157		
FilmArray GI panel v2.1. <b>Lot</b> : 650919	FilmArray GI panel v2.1. <b>Lot</b> : 650919		
Starlet Microlab. <b>Kit</b> : Allplex GI Seegen. G10818E02	Technique MuDT PCR temps réel. Eurokit CFX 96		
BD max enteric Parasite Panel. <b>Ref</b> : 442960. <b>Lot</b> : 9106889	BD max enteric Parasite Panel. <b>Ref</b> : 442960. <b>Lot</b> : 9106889	Ct 33.7	
SP200 Elitech (précédée d'une étape de broyage mécanique)	Technique maison Mary et al, JCM 2013	Ct 28.56	
NucliSens EasyMag (BioMérieux)	Allplex GI-Parasite (Eurobio Ingen)	Ct 30.42	
Pré-extraction Magnalyser + BLB + Extraction manuelle High Pure PCR template preparation kit (Roche)	Amplidiag Stool Parasites MOBIDIAG	Ct 31.18	
PCR avec l'automate BDmax fournisseur : Becton-Dickinson. <b>Kit</b> BD Max Enteric Parasi. <b>Ref</b> : 442960. <b>Lot</b> : K53916273720201116			
Easymag avec lyse préalable en tampon de lyse (Easymag) et congélation/décongélation; <b>Kit</b> : BioMérieux Easymag	R Biopharm. Ridagene Parasite Stool Panel. <b>Ref</b> : 13228	Ct 26.3	
Biomérieux EMAG.	Bioevolution, cryptosporidies generique. <b>Ref</b> : BE-A990-CD. <b>Lot</b> : 190312	Ct 26.48	
Kit Amplidiag stool parasites AD-SP100. Automates amplidiag easy et CFX 96			1
Starmag universal Cartridge kit Seegen. <b>Lot</b> : UC 9619E22	Allplex GI Parasite Assay-Seegene. <b>Lot</b> : GI 0819 E02	Ct 38.74	
EZ1 virusminikit Quiagen sur extraction quiazen EZ1 XL. <b>Ref</b> : 955134. <b>Lot</b> : 163027155	Seegene. Allplec Gi Assay Parasite. <b>Ref</b> : G19703X. <b>Lot</b> : G10819E02	Ct 27.2	

	PCR Multiplexe EVROBIO NIMBUS. Allplex Seegene GI Parasite Assay. Ref : G19703X Lot : G10819E02	Ct 27			
	Mary et al JCM 2013	Ct 30			
Seegen. Star Mag (744300 40C384). Lot : UC 9614127	Seegene. Allplex Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02	Ct 32.8			
Echantillon 2 (ADN de <i>C. parvum</i> )					
			Résultats des participants		
	Résultat attendu	Votre Résultat	Positif	Négatif	NR
<b>PCR</b>	<b>Négatif</b>		0	21	28
<b>Ct obtenus (n=17)</b>					

Résultats des participants ADN2			
Techniques PCR utilisées			
Extraction	Amplification	Positif (Ct)	Négatif
Fast Prep 24 + easy mag d'après Mary et al JCM 2013 (pages 2256 à 2263)	BMC infectious diseases (2016), Brunet et el.		1
STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit 7444300.4UC384. Kit : Stararlet IVD (Microlab STARlet IVD°	Allplex GI Assays. Kit : Seegen. Gi9703X		1
FastDNA stool mini kit. Kit : Kit QIAamp R. Lot : 163021578	Stratagène Mx3005. Kit : Kit Ridagen/ P61715 , lot :14259		1
QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen). Lot : 163019516. Ref : 51804	Temps réel une sonde Taqman. GenBank : EU675853.1. (Mary et al, JCM, 2013). Amplification d'un fragment de 178pb spécifique de <i>Cryptosporidium sp.</i>		1
Quick-DNA Fecal/Soil Microbe - Zymo Research. Lot et Ref : D6010	Le Govic et al. Eur J clin Microbiol Infect dis 2016 ; 35(1) ; 137-148		1
Easymag	Ridagene		1
EZ1 DNA tissus kit Quiagen. Ref : 953034. Lot : 163023905	Amplidiag MOBIDIAG. Ref : AD SP100 Lot : 19019157		1
FilmArray GI panel v2.1. Lot : 650919	FilmArray GI panel v2.1. Lot : 650919		1
Starlet Microlab. Kit : Allplex GI Seegem. GI0818E02	Technique MuDT PCR temps réel. Eurokit CFX 96		1
BD max enteric Parasite Panel. Ref : 442960. Lot : 9106889	BD max enteric Parasite Panel. Ref : 442960. Lot : 9106889		1
SP200 Elitech (précédée d'une étape de broyage mécanique)	Technique maison Mary et al, JCM 2013		1
NucliSens EasyMag (BioMérieux)	Allplex GI-Parasite (Eurobio Ingen)		1
Pré-extraction Magnalyser + BLB + Extraction manuelle Hight Pure PCR template preparation kit (Roche)	Amplidiag Stool Parasites MOBIDIAG		1
PCR avec l'automate BDmax fournisseur : Becton-Dickinson. Kit BD Max Enteric Parasi. Ref : 442960. Lot : K53916273720201116			1
Easymag avec lyse préalable en tampon de lyse (Easymag) et congélation/décongélation; Kit : BioMérieux Easymag	R Biopharm. Ridagene Parasite Stool Panel. Ref : 13228		1
Biomerieux EMAG.	Bioevolution, cryptosporidies generique. Ref : BE-A990-CD. Lot: 190312		1

Kit Amplidiag stool parasites AD-SP100. Automates amplidiag easy et CFX 96			1
Starmag universal Cartridge kit Seegem. Lot : UC 9619E22	Allplex GI Parasite Assay-Seegene. Lot : GI 0819 E02		1
EZ1 virusminikit Quiagen sur extraction quiazen EZ1 XL. Ref : 955134. Lot : 163027155	Seegene. Allplec Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02		1
	PCR Multiplexe EVROBIO NIMBUS. Allplex Seegene GI Parasite Assay. Ref : G19703X Lot : G10819E02		1
	Mary et al JCM 2013		1
Seegen. Star Mag (744300 40C384). Lot : UC 9614I27	Seegene. Allplex Gi Assay Parasite. Ref : G19703X. Lot : G10819E02		1

## Annexe 2 : Résultats au CIL 2020



# INSTITUT DE BIOLOGIE CLINIQUE Laboratoire de Parasitologie Mycologie CNR LABORATOIRE EXPERT CRYPTOSPORIDIOSES

### CIL *Cryptosporidium* 2020

Nombre total de participants : 40

Echantillon A (selle)			Résultats des participants*		
	Résultat attendu		Positif	Négatif	NR
Microscopie +/- TDR	Positif		30	1	8
PCR	Positif		16	0	21
Ct obtenus (moy +/- ET)	27.8 +/- 3.6				

NR : non réalisé. \*: Certains participants utilisent plusieurs techniques d'analyse.

TDR : Test de Diagnostic Rapide

Résultats des participants		
Nombre d'oocystes	De : 2 à 200/10 champs	
Techniques utilisées par les participants		
	Positif	Négatif
Ziehl-Nielsen seul	19	0
Ziehl-Nielsen + Heine	1	0
Bailenger + Ziehl-Nielsen	6	0
Bailenger + Ziehl Nielsen + Heine	1	0
Glycérine	1	0
Heine	2	0
Kinyoun	0	1
Ridaquick® *	2	0
Non réalisé	8	

\* Les tests Ridaquick® ont été réalisés en complément du Ziehl-Nielsen modifié pour 2 centres.

<b>Résultats des participants : selles A</b>			
<b>Techniques PCR utilisées</b>			
<b>Extraction</b>	<b>Amplification</b>	<b>Positif (Ct)</b>	<b>Négatif</b>
Emag (Biomérieux)	Amplidiag stool Parasites Mobidiag	Ct = 24 (n=1)	
BD max	BD max Enteric Parasite Becton Dickinson	Ct (26.8) Ct (23.7) (n=2)	
Ingenius (Elitech)	Kit Paragénie crypto/micro (Ademtech)	Ct (29.21) (n=1)	
EasyMag	Kit Paragénie Crypto-micro (Ademtech)	Ct (29.9) (n=1)	
QIAamp Fast DNA Stool	Mary et al 2013	Ct (34.05) (n=1)	
Ingenius (Elitech)	Mary et al 2013	Ct (27) (n=1)	
EMag	R-Biopharm Rida Gene	Ct (24.82) (n=1)	
Quick DNA Fecal/soil Microbe Zymoresearch	Le Govic et al 2016	Ct (24.35) (n=1)	
Easymag	Brunet et al. 2016	Ct (23.1) (n=1)	
Easymag	Seegene Allplex GI	Ct (25.2) (n=1)	
Starlet	Seegene Allplex GI	Ct (31.41) Ct (34.45) Ct (34.8) (n=3)	
PowerFecal kit	Hadfield et al. 2010	Ct (24.87) (n=1)	
Filmarray		Ct non communiqué (n=1)	

<b>Echantillon B (selle)</b>					
			<b>Résultats des participants*</b>		
	<b>Résultat attendu</b>	<b>Votre Résultat</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>NR</b>
<b>Microscopie +/- TDR</b>	<b>Positif</b>		29	2	8
<b>PCR</b>	<b>Positif</b>		16	0	21
<b>Ct obtenus (moy +/- ET)</b>	<b>29.95 +/- 3.02</b>				

NR : non réalisé. \*: Certains participants utilisent plusieurs techniques d'analyse.

TDR : Test de Diagnostic Rapide

<b>Résultats des participants</b>		
<b>Nombre d'oocystes</b>	De <1 à 54/10 champs	
<b>Techniques utilisées par les participants</b>		
	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>
<b>Ziehl-Nielsen seul</b>	19	0
<b>Ziehl-Nielsen + Heine</b>	1	0
<b>Bailenger + Ziehl-Nielsen</b>	5	1
<b>Bailenger + Ziehl Nielsen + Heine</b>	1	0
<b>Glycérine</b>	1	0
<b>Heine</b>	2	0
<b>Kinyoun</b>	0	1
<b>Ridaquick® *</b>	2	0
<b>Non réalisé</b>	8	

\* Les tests Ridaquick® ont été réalisés en complément du Ziehl-Nielsen modifié pour 2 centres.

<b>Résultats des participants Selles B</b>			
<b>Techniques PCR utilisées</b>			
<b>Extraction</b>	<b>Amplification</b>	<b>Positif (Ct)</b>	<b>Négatif</b>
Emag (Biomérieux)	Amplidiag stool Parasites Mobidiag	Ct = 30 (n=1)	
BD max	BD max Enteric Parasite Becton Dickinson	Ct (29.6) Ct (26.4) (n=2)	
Ingenius (Elitech)	Kit Paragénie crypto/micro (Ademtech)	Ct (30.89) (n=1)	
EasyMag	Kit Paragénie Crypto-micro (Ademtech)	Ct (30.9) (n=1)	
QIAamp Fast DNA Stool	Mary et al 2013	Ct (30.85) (n=1)	
Ingenius (Elitech)	Mary et al 2013	Ct (31) (n=1)	
EMag	R-Biopharm Rida Gene	Ct (27.29) (n=1)	
Quick DNA Fecal/soil Microbe Zymoresearch	Le Govic et al 2016	Ct (25.73) (n=1)	
Easymag	Brunet et al. 2016	Ct (24.3) (n=1)	
Easymag	Seegene Allplex GI	Ct (27) (n=1)	
Starlet	Seegene Allplex GI	Ct (37.3) Ct (34.08) Ct (37.24) (n=3)	
PowerFecal kit	Hadfield et al. 2010	Ct (26.67) (n=1)	
Filmarray	Ct non communiqué (n=1)		

<b>Echantillon C (selle)</b>					
			<b>Résultats des participants*</b>		
	<b>Résultat attendu</b>	<b>Votre Résultat</b>	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>NR</b>
<b>Microscopie +/- TDR</b>	<b>Negatif</b>		0	31	8
<b>PCR</b>	<b>Negatif</b>		0	16	21
<b>Ct obtenus (moy +/- ET)</b>					

NR : non réalisé. \*: Certains participants utilisent plusieurs techniques d'analyse.

TDR : Test de Diagnostic Rapide

<b>Résultats des participants</b>		
<b>Techniques utilisées par les participants</b>		
	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>
<b>Ziehl-Nielsen seul</b>	0	19
<b>Ziehl-Nielsen + Heine</b>	0	1
<b>Bailenger + Ziehl-Nielsen</b>	0	6
<b>Bailenger + Ziehl Nielsen + Heine</b>	0	1
<b>Glycérine</b>	0	1
<b>Heine</b>	0	2
<b>Kinyoun</b>	0	1
<b>Ridaquick® *</b>	0	2
<b>Non réalisé</b>	8	

<b>Résultats des participants Selles C</b>			
<b>Techniques PCR utilisées</b>			
<b>Extraction</b>	<b>Amplification</b>	<b>Positif (Ct)</b>	<b>Négatif</b>
Emag (Biomérieux)	Amplidiag stool Parasites Mobidiag		n=1
BD max	BD max Enteric Parasite Becton Dickinson		n=2
Ingenius (Elitech)	Kit Paragénie crypto/micro (Ademtech)		n=1
EasyMag	Kit Paragénie Crypto-micro (Ademtech)		n=1
QIAamp Fast DNA Stool	Mary et al 2013		n=1
Ingenius (Elitech)	Mary et al 2013		n=1
EMag	R-Biopharm Rida Gene		n=1
Quick DNA Fecal/soil Microbe Zymoresearch	Le Govic et al 2016		n=1
Easymag	Brunet et al. 2016		n=1
Easymag	Seegene Allplex GI		n=1
Starlet	Seegene Allplex GI		n=3
PowerFecal kit	Hadfield et al. 2010		n=1
Filmarray			n=1

## Echantillons d'ADN

Echantillon 1 (ADN de <i>C. parvum</i> )					
			Résultats des participants		
	Résultat attendu	Votre Résultat	Positif	Négatif	NR
<b>PCR</b>	<b>Positif</b>		23	3	13
<b>Ct obtenus (moy +/- ET)</b>	35.9 +/- 1.2				

Résultats des participants ADN1			
Techniques PCR utilisées			
Extraction	Amplification	Positif (Ct)	Négatif
	Amplidiag stool Parasites Mobidiag	Ct (35) Ct (36.29) Ct (37) (n=3)	
	BD max Enteric Parasite Becton Dickinson	Ct (34.6) Ct (35.5) (n=2)	
	Kit Paragénie crypto/micro (Ademtech)	Ct (35.49) Ct (35.3) Ct (36.8) (n=3)	
	Mary et al 2013	Ct (39) Ct (34) Ct (36) Ct (37.63) Ct (35.76) (n=5)	
	R-Biopharm Rida Gene	Ct (36.56) (n=1)	
	Le Govic et al 2016	Ct (38.1) (n=1)	
	Brunet et al. 2016	Ct (32.5) (n=1)	
	Seegene Allplex GI	1 Ct non communiqué Ct (39.19) Ct (36) Ct (35.88) Ct (36.6) Ct (35.17) (n=6)	n=3
	Hadfield et al. 2010	Ct (34.26) (n=1)	

Echantillon 2					
			Résultats des participants		
	Résultat attendu	Votre Résultat	Positif	Négatif	NR
PCR	Negatif			26	13
Ct obtenus (moy +/- ET)					

Résultats des participants ADN2			
Techniques PCR utilisées			
Extraction	Amplification	Positif (Ct)	Négatif
	Amplidiag stool Parasites Mobidiag		n=3
	BD max Enteric Parasite Becton Dickinson		n=2
	Kit Paragénie crypto/micro (Ademtech)		n=3
	Mary et al 2013		n=5
	R-Biopharm Rida Gene		n=1
	Le Govic et al 2016		n=1
	Brunet et al. 2016		n=1
	Seegene Allplex GI		n=9
	Hadfield et al. 2010		n=1