

**Rapport annuel  
d'activité**

**2018**

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

**Année d'exercice  
2017**

# Résumé analytique en français

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

En 2017, le CNR-Laboratoire expert cryptosporidioses a mis au point une méthode de caractérisation du microsatellite *msc6-7* par PCR puis séquençage des produits d'amplification, et a démontré son intérêt comme marqueur spécifique de l'origine humaine ou animale d'une contamination.

Le CNR LE a réalisé l'évaluation d'une méthode automatisée d'extraction d'ADN à partir d'échantillons fécaux, et d'une trousse diagnostic par PCR. Il a aussi participé à 2 autres évaluations comparatives de méthodes diagnostiques. Il a transféré sa procédure de caractérisation des isolats aux laboratoires collaborateurs du CHU de Dijon et du CHU de Clermont Ferrand.

La collection biologique du CNR LE s'est enrichie de 327 nouveaux prélèvements (71 reçus pour expertise, 160 dans le cadre de la surveillance épidémiologique et 96 dans le cadre d'épidémies).

En 2017, concernant l'activité de surveillance, 32 laboratoires du réseau ont diagnostiqué 200 cas de cryptosporidioses. Parmi ceux-ci, 148 cas ont été déclarés avec envoi de 125 selles au CNR LE et 38 selles ont été envoyées sans déclaration informatique de fait de l'absence de données épidémiologiques disponibles. Vingt pour cent des patients avaient contracté leur infection à l'étranger, 20% était en contact avec un patient diarrhéique, 12% ont pu contracté l'infection lors d'une baignade et 8% du fait d'un aliment potentiellement contaminé.

Quarante cinq pour cent des patients étaient immunocompromis: la moitié d'entre eux étant porteurs d'une greffe d'organe solide et 1/3 infectés par le VIH. Au total, 47% des patients ont été hospitalisés dont la moitié à cause de leur cryptosporidiose, et 2 patients sont décédés.

Deux épidémies de respectivement 142 et 175 cas ont été explorées : l'une due à l'eau de distribution a eu lieu à Caylus (Tarn et Garonne) en juin et l'autre liée à un aliment contaminé a eu lieu en décembre dans un collège près de Nantes. Conformément à la demande de Santé Publique France, le CNR LE va être réorganisée en 2018 avec partage de certaine tâches du CNR LE avec le laboratoire collaborateur du CHU de Dijon.

Enfin, en 2017, le CNR LE a poursuivi son activité de recherche en particulier concernant la circulation des *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement.

# Résumé analytique en anglais

The CNR-Laboratoire expert cryptosporidioses (CNR LE) was designated in 2017 to identify and characterize isolates addressed by corresponding 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 2017, the CNR LE has developed a characterization method for the microsatellite *msc6-7* by PCR and sequencing of amplification products, and has demonstrated its interest as a specific marker of human or animal origin of contamination.

CNR LE performed the evaluation of an automated method of DNA extraction from fecal samples, and a PCR diagnostic kit. He also participated in 2 other comparative evaluations of diagnostic methods. He has transferred his procedure of isolate characterization to the collaborating laboratory of Dijon and Clermont-Ferrand University hospitals.

The CNR LE's biological collection was enriched by 327 new samples (71 received for expertise, 160 for epidemiological surveillance and 96 for epidemics).

In 2017, concerning the surveillance activity, 32 laboratories of the network diagnosed 200 cryptosporidiosis cases in 2017. Of those, 148 were reported with 125 stool samples sent to CNR LE, while 38 stools were sent in the absence of online declaration due to lack of available epidemiological data.

Twenty percent of patients were infected abroad, 20% had contact with a diarrheic patient, 12% were contaminated by recreational waters, and 8% consumed potentially contaminated food.

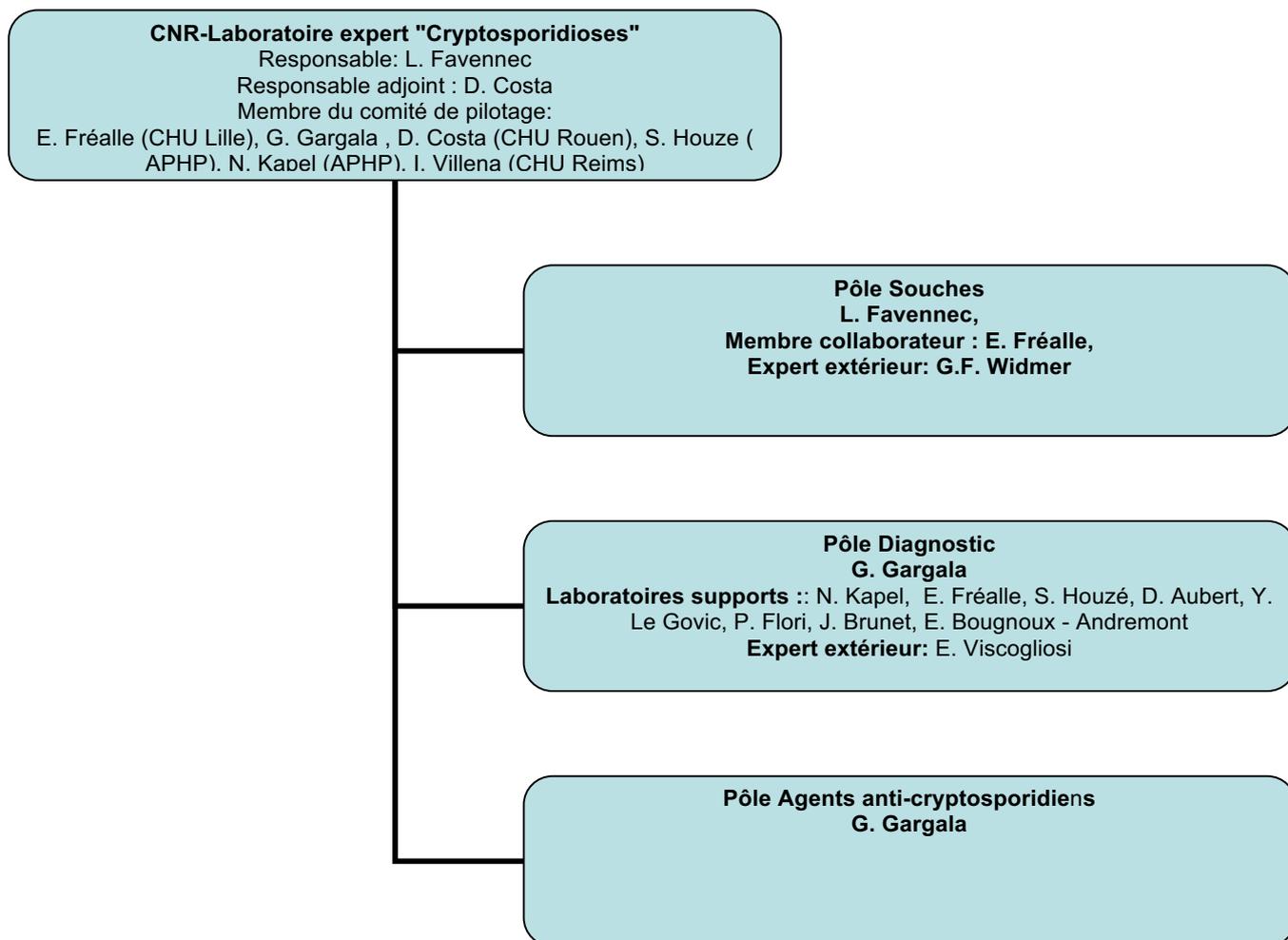
Fourty five percent of patients were immunocompromised, half of them with a solid organ transplant and 1/3 with HIV infection. Overall, 47% of the patients were hospitalized, half of them because of their cryptosporidiosis and 2 patients died.

Two outbreaks with 142 and 175 cases, respectively were investigated: one caused by distribution water occurred in Caylus (Tarn et Garonne) in June, and the other due to contaminated food took place in December in a high school near Nantes. In accordance with the request of Public Health France, the CNR LE will be reorganized in 2018 with task sharing between CNR LE and the collaborating laboratory of Dijon University hospital.

Lastly, in 2017, the CNR LE continued its research activity particularly on the environmental circulation of *Cryptosporidium* spp.

# 1 Missions et organisation du CNR

Conformément au Programme du CNR-LE, l'organigramme établi pour 2017 était le suivant :



En 2017, le laboratoire CNR LE a été accrédité COFRAC selon la norme ISO EN 15189 sur la ligne de portée PM7 (selon le SH INF 50) comprenant entre autre la recherche dans les selles par examen microscopique des cryptosporidies. Le dossier d'accréditation pour la ligne de portée PM8 (selon le SH INF 50) concernant l'expertise par biologie moléculaire de la recherche et de la caractérisation des cryptosporidies du laboratoire expert est en cours de rédaction et sera déposé en 2018.

Sur la demande du comité des CNR, un partage des tâches est prévu avec le laboratoire collaborateur du CHU de Dijon. Du fait des délais nécessaires à la signature de conventions entre le CHU de Rouen et celui de Dijon, l'accord de partenariat n'a pu prendre effet qu'en 2018. Dans ce contexte, la nouvelle organisation du CNR sera exposée dans le rapport d'activité 2018. De même, la mise en place du site internet du CNR LE a été retardée et est en cours. La structuration de ce site sera donc décrite dans le rapport 2018.

## **2 - Activités d'expertise**

En 2017, le CNR Laboratoire expert (CNR LE) cryptosporidioses a mis au point une méthode de caractérisation par PCR puis séquençage des produits d'amplification du microsatellite *msc6-7*, et a démontré son intérêt comme marqueur spécifique de l'origine humaine ou animale d'une contamination. Le CNR LE a réalisé l'évaluation d'une méthode automatisée d'extraction d'ADN à partir d'échantillons fécaux, et d'une trousse de diagnostic par PCR, et a aussi participé à 2 autres évaluations comparatives de méthodes diagnostiques. Il a transféré sa procédure de caractérisation génétique des isolats au laboratoire collaborateur du CHU de Dijon et au CHU de Clermont-Ferrand. Enfin, la collection biologique du CNR LE s'est enrichie de 302 nouveaux isolats (71 reçus pour expertise, 137 dans le cadre de la surveillance épidémiologique, et 96 dans le cadre d'épidémies).

### **2.1 Évolutions des techniques**

En 2017, le CNR LE a mis au point une méthode par PCR puis séquençage des produits d'amplification du microsatellite *msc6-7* et a démontré son intérêt comme marqueur spécifique de l'origine humaine ou animale d'une contamination (Annexe 3).

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

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

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

Une technique de PCR en temps réel (Amplidiag stool parasite kit, Mobidiag) a été évaluée de façon multicentrique en collaboration avec les CHU de Lille, Dijon et Clermont-Ferrand. Brièvement, 150 échantillons contenant ou non de l'ADN de *Cryptosporidium* spp. ont été adressés en aveugle aux 3 laboratoires collaborateurs pour analyse. La technique a permis de détecter 500 oocystes par gramme de selles, sa sensibilité variant de 98.5 à 100%, et sa spécificité de 98.35% à 100%. Ce kit s'est avéré sensible, spécifique et capable de détecter les espèces de *Cryptosporidium* habituellement rencontrées chez les patients immunocompétents comme immunodéprimés. Il peut donc être recommandé pour le diagnostic en médecine humaine.

Une autre étude réalisée au laboratoire de Parasitologie du CHU Bichat Claude Bernard en collaboration avec le CNR LE a testé le kit multiplex Amplidiag (Mobidiag) et la technique Film Array (Biomérieux) et a montré l'intérêt de ces techniques et leur supériorité par rapport aux techniques microscopique, en particulier pour la recherche de *Giardia duodenalis*.

Des échantillons caractérisés du CNR ont été adressés au laboratoire du CHU de Rennes (Pr F. Robert Gangneux) dans le cadre d'une étude comparative de 3 techniques diagnostiques « multiplex » par PCR (BD Max Enteric parasite Panel (Becton Dickinson), G-DiaPara (Diagenode) et RIDA GENE parasitic stool panel 1 (R-Biopharm)). Pour le diagnostic de *Cryptosporidium* spp., ces 3 kits présentent des sensibilités respectives de 58%, 75% et 92%.

Parmi les techniques d'extraction automatisées disponibles, nous avons évalué l'association de l'automate d'extraction d'ADN (Automag Prime) et du kit d'extraction d'ADN des échantillons de selles (en cours de mise sur le marché) commercialisé par la société ADEMTECH. Les tests ont été réalisés sur 9 échantillons de selles : 4 selles positives à *C. hominis*, 2 selles positives à *C. parvum*, 2 témoins négatifs et 1 selle positive à *C. cuniculus*. Pour évaluer la qualité d'extraction obtenue selon ce nouveau procédé, chaque extrait obtenu a été soumis, aux PCR de spéciation en temps réel qui sont utilisées en routine par le CNR LE. Les résultats obtenus ont été

comparés avec des extraits de ces mêmes selles obtenus le même jour selon la technique de référence du CNR LE (Kit d'extraction QIAmp Power Fecal kit de Qiagen). Les résultats obtenus selon le protocole d'Ademtech se sont avérés décevants : sur les 4 échantillons avec isolat de *C. hominis* : 1 seul était positif et les 3 autres douteux; sur 2; échantillons avec *C. parvum*, 1 seul était positif; pour l'échantillon contenant *C. cuniculus*, la positivité était "limite" (Ct=44.59 versus Ct= 24.43 en utilisant la technique de référence du CNR LE) alors que la présence de *Cryptosporidium* spp. y était confirmée (concentration microscopique importante de 50 oocystes par champ). Les 2 témoins sans parasite étaient négatifs. En conclusion, la technique d'extraction automatisée d'ADN de *Cryptosporidium* spp. sur selle proposée par la société Ademtech est apparue insuffisante, et est à ce jour en cours d'amélioration.

En mai 2017, un contrôle inter-laboratoires constitué de 4 échantillons de selles (1 fortement positif, un faiblement positif, un négatif et une solution contenant de l'ADN parasite) a été adressé à 40 laboratoires volontaires du réseau. Sur 36 laboratoires ayant répondu, la technique de Ziehl modifiée a été utilisée seule dans 16 d'entre eux, associée à une autre technique dans 16 autres laboratoires, alors que 4 autres laboratoires utilisaient d'autres techniques. La technique de Ziehl modifiée a permis de parvenir à un diagnostic correct pour le prélèvement fortement positif dans 29/32 laboratoires, et pour le prélèvement faiblement positif dans 18/32 laboratoires. Les techniques de recherche d'antigène ont donné des résultats corrects dans 8/8 laboratoires pour le prélèvement fortement positif et 7/8 laboratoires pour le prélèvement faiblement positif. La présence d'ADN parasite a été détectée par PCR dans 8/9 laboratoires. Le prélèvement négatif a été rendu faussement positif par un laboratoire utilisant l'immunofluorescence et par un autre laboratoire utilisant la PCR. Ces résultats sont en cours de publication.

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

La technique de génotypage par *gp60* a été transférée au laboratoire associé du CHU de Dijon. Le transfert de cette technique au laboratoire de Clermont Ferrand est actuellement finalisée.

Une formation à la détection microscopique de *Cryptosporidium* spp. selon la technique de Heine a été dispensée aux collègues du CHU de Reims (Dr Chemla). Cette technique plus sensible que la méthode de coloration décrite par Henricksen a été ensuite mise en place à Reims et a permis le diagnostic de nombreux cas en 2017.

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

Au cours de l'année 2017, la collection biologique du CNR LE a été enrichie de 302 prélèvements caractérisés. En 2017, 12 échantillons de selles ont été envoyés au CHU de Rennes pour une étude comparative de PCR multiplex pour la détection de protozoaires intestinaux (Autier B et al., 2018)

Les souches sont actuellement conservées dans une solution aqueuse de K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub> à 2.5% à +5°C +/- 3°C, condition optimale pour leur conservation. En effet, nous avons montré que dans ces conditions, l'infectivité des oocystes n'est pas significativement altérée après 6 ans (Delaunay et al., 2001). L'ADN parasite est conservé à -80°C +/- 10°C. 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

Dans le cadre de la surveillance, les séquences de *gp60* sont établies pour tous les prélèvements reconnus positifs pour *gp60* (129/137 séquences en 2017). Ces séquences sont en attente d'attribution de numéro d'accès sur GenBank.

## 2.5. Activités d'expertise

Bilan chiffré des activités du CNR LE

Activité d'expertise

Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hopital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
39	CHU Lyon	France	Spéciation
32	CHU Saint Etienne	France	Spéciation et génotypage

Activité de surveillance

Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hopital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
160	CHU ; LABM ....	France	Spéciation et génotypage

Exploration d'épidémie

Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hopital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
84 (épidémie de Caylus)	CHU Begin	France	Spéciation et génotypage
12 (épidémie de Nantes)	CHU Nantes	France	Spéciation et génotypage

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

Les résultats ont été transmis au laboratoire correspondant dans un délai moyen de 8 à 10 jours après réception de l'isolat.

## 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.

Lors de l'épidémie de Caylus, 36 séquençages sur des prélèvements positifs pour le microsatellite *gp60* ont été réalisées à la fois à partir d'isolats humains et à partir d'échantillons d'eau (35/84 isolats cliniques et 1/6 isolats environnementaux positifs en *gp60* ont été séquencés en 2017). Concernant l'épidémie de Nantes, 10/12 isolats cliniques ont pu être séquencés.

### 3. Activités de surveillance

En 2017, concernant l'activité de surveillance, 32 laboratoires du réseau ont diagnostiqué 200 cas de cryptosporidioses. Parmi ceux-ci, 148 cas ont été déclarés avec envoi de 125 selles au CNR et 38 selles ont été envoyées sans déclaration informatique de fait de l'absence de données épidémiologique disponible.

Concernant la cause de l'infection, 20% des patients ont contracté leur infection à l'étranger, 20% était en contact avec un patient diarrhéique, 12% ont pu contracté l'infection lors d'une baignade et 11% du fait d'un aliment potentiellement contaminé.

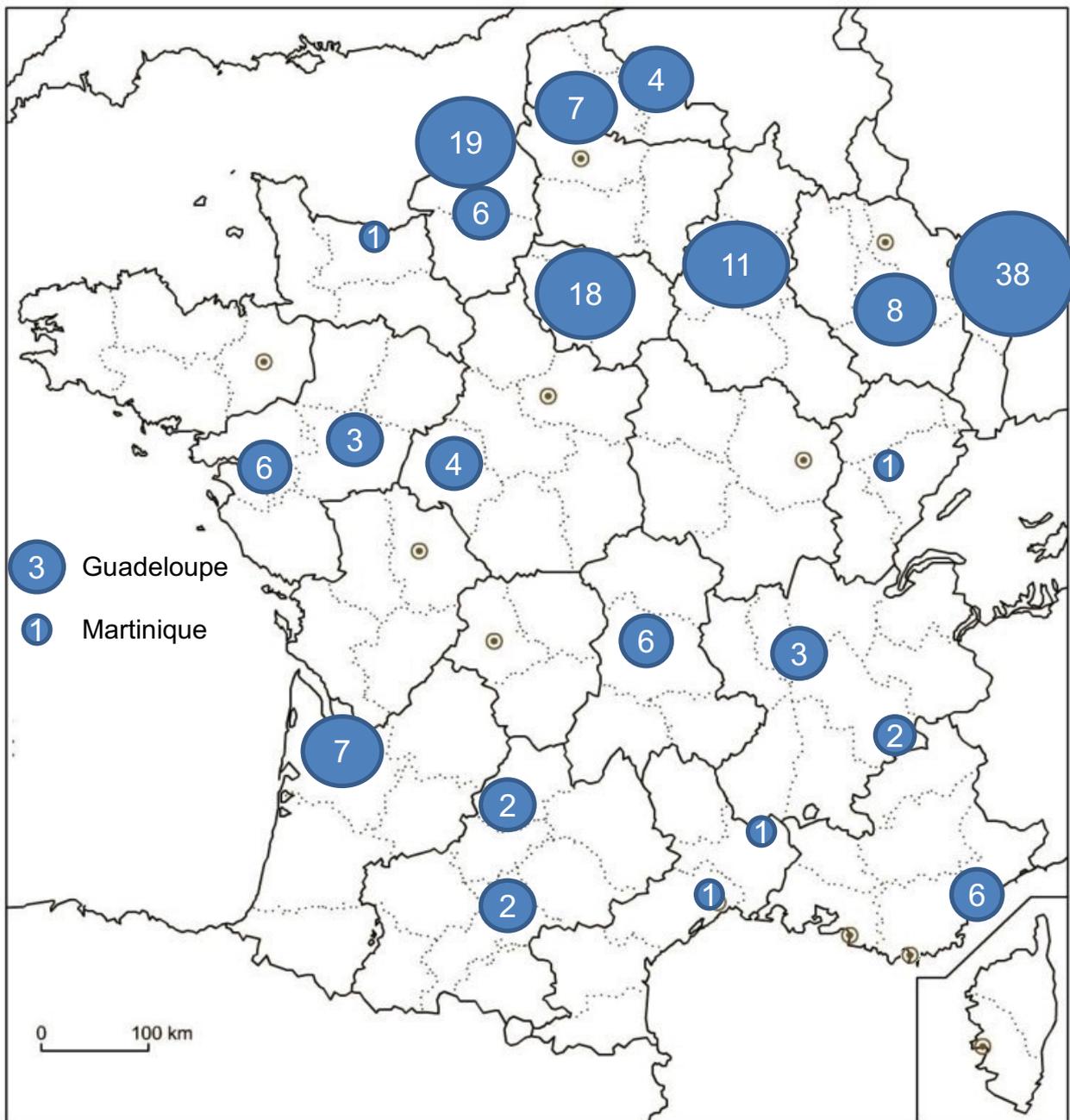
Une immunodépression est retrouvée chez 45% des patients : la moitié d'entre eux étaient porteur d'une greffe d'organe solide et 1/3 infecté par le VIH. Au total, 47 % des patients ont été hospitalisés dont la moitié à cause de leur cryptosporidiose et 2 patients sont décédés.

#### 3.1. Description du réseau de partenaires

Le Réseau de partenaire réunit 45 laboratoires (2 laboratoires de CHG, 4 LABM privés, le laboratoire de l'HIA Bégin et 38 laboratoires de CHU dont 8 à Paris et 3 dans les départements des Antilles Guyane). Parmi ces correspondants, 38 laboratoires ont pu nous fournir leurs données concernant les recherches de *Cryptosporidium*. Les autres laboratoires, du fait de changement de leur système informatique n'ont pas pu nous fournir ces données cette année. Ces 38 laboratoires ont effectué 25349 analyses de selles de 19353 patients explorés (Tableau 1). *Cryptosporidium* spp. a été détecté dans 244 échantillons de selles provenant de 200 patients porteur de ce parasite. Concernant les données de surveillance, les données présentées ont été extraite le 23 mars 2018. Par ailleurs, 148 déclarations de cas sur le site du CNR LE avec données épidémiologiques provenant de 32 laboratoires ont été effectuées par les correspondants. Dans 23 cas, la faible quantité de selles disponibles pour le diagnostic n'a pas permis l'envoi d'échantillons au CNR LE ou au laboratoire associé. Concernant les échantillons pour lesquels une déclaration a été faire sur le site, le CNR LE a reçu 122 selles et le laboratoire associé 3 (Carte 1). Par ailleurs, le CNR LE a reçu 38 selles pour lesquelles le laboratoire correspondant n'a pas déclaré les cas. Du fait de la participation au réseau de la quasi totalité des CHU, la représentativité des données en ce qui concerne la cryptosporidiose des patients immunodéprimés est très bonne. En revanche, le réseau ne collige qu'une minorité des cas de cryptosporidioses chez les patients immunocompétents. Toutefois, le réseau s'est étendu en 2017 avec l'arrivée de 2 nouveaux laboratoires privés effectuant un nombre important d'explorations (5498 patients explorés avec le diagnostic de 31 cas).

Tableau 1 : Bilan des analyses et cas de Cryptosporidioses diagnostiquées par les membres du réseau

Laboratoires	Total examen, de selles	Nombre de patients	Nombre de selles positives	Nombre de patients avec cryptosporidiose
AMIENS	424	283	0	0
ANGERS	155	127	2	2
BESANCON	315	179	2	2
Biopath Laboratoire	1670	1670	5	5
BORDEAUX	651	374	10	6
BREST	372	210	0	0
CAEN	104	89	2	2
Cerba	742	742	21	21
CLERMONT-FER	546	359	11	6
DIJON	656	507	3	3
FORTDEFRANCE	159	111	1	1
GRENOBLE	100	81	2	2
LE HAVRE	7	5	0	0
LILLE	495	338	12	8
LIMOGES	182	108	0	0
LYON	416	416	0	0
MARSEILLE	544	378	1	1
MONTPELLIER	253	253	1	1
NANCY	158	86	6	4
NICE	523	359	13	9
PARIS BICHAT	435	369	7	4
PARIS COCHIN	164	140	0	0
PARIS NECKER	5	3	5	5
PARIS PITIE	687	149	5	3
PARIS POMPIDOU	619	383	0	0
PARIS St LOUIS	1642	832	9	5
PARIS St Antoine	261	218	1	1
POINTE A PITRE	183	122	2	2
POITIERS	193	141	0	0
REIMS	330	280	13	12
RENNES	521	352	12	7
ROUEN	2364	1669	7	6
Laboratoire Schuh	3828	3828	26	26
St ETIENNE	1260	810	26	26
St VALERY	3248	2408	22	19
STRASBOURG	375	324	0	0
TOULOUSE	386	344	9	7
TOURS	376	306	8	4
Total	25349	19353	244	200



Carte 1 : Provenance géographique des 160 échantillons (selles et ADN) reçu par le CNR LE en 2017.

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

La distribution des cas de cryptosporidiose en 2017 en fonction de l'âge est semblable à celle obtenue précédemment par le réseau Crypto Anofel. Le sexe-ratio est proche de 1 comme les années précédentes (Figure 1a). Cette distribution ne prend pas en compte les épidémies. Il est à noter que les cas nombreux observés chez des patients âgés de 25 à 35 ans correspondent à un âge auquel des parents peuvent s'occuper de jeunes enfants. Or le contact avec un enfant portant des couches est un des facteurs de risque reconnu pour la cryptosporidiose de l'immunocompétent. Ce facteur de risque non actuellement renseigné dans le questionnaire va être pris en compte pour 2018. Comme les années précédentes, la majorité des cas apparaît en fin d'été et à l'automne (Figure 1b)

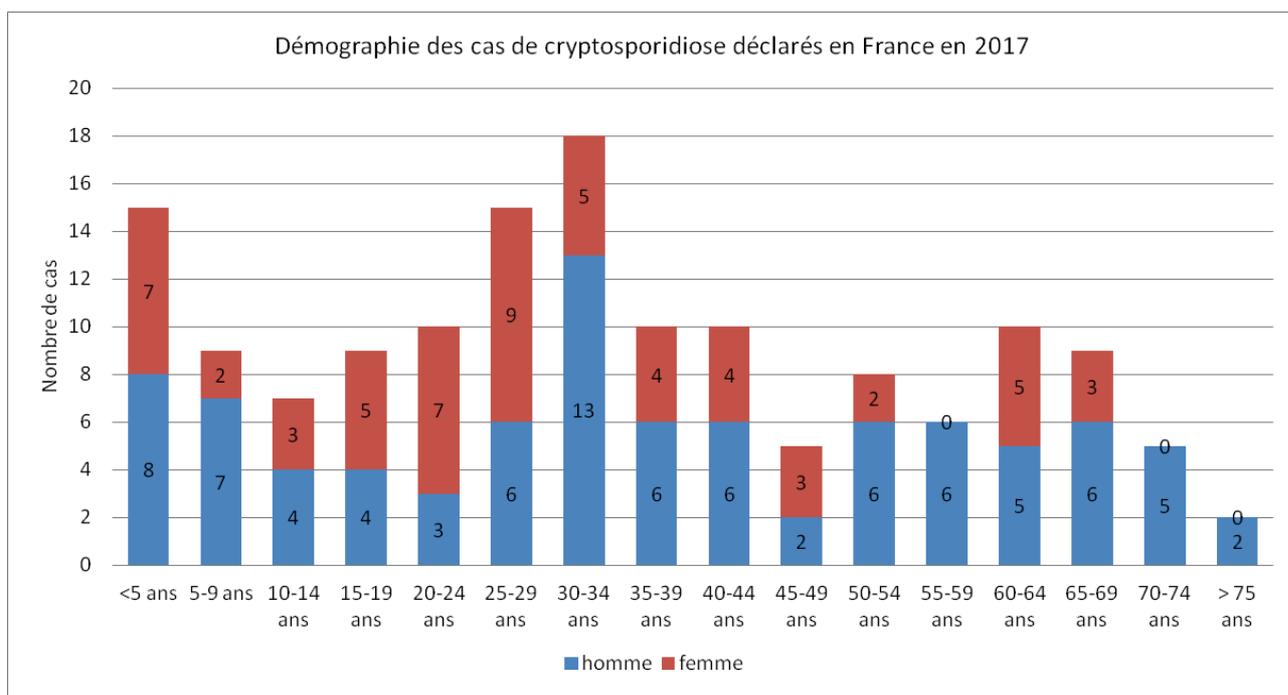


Figure 1a : Démographie des cas de cryptosporidiose déclarés en France en 2017

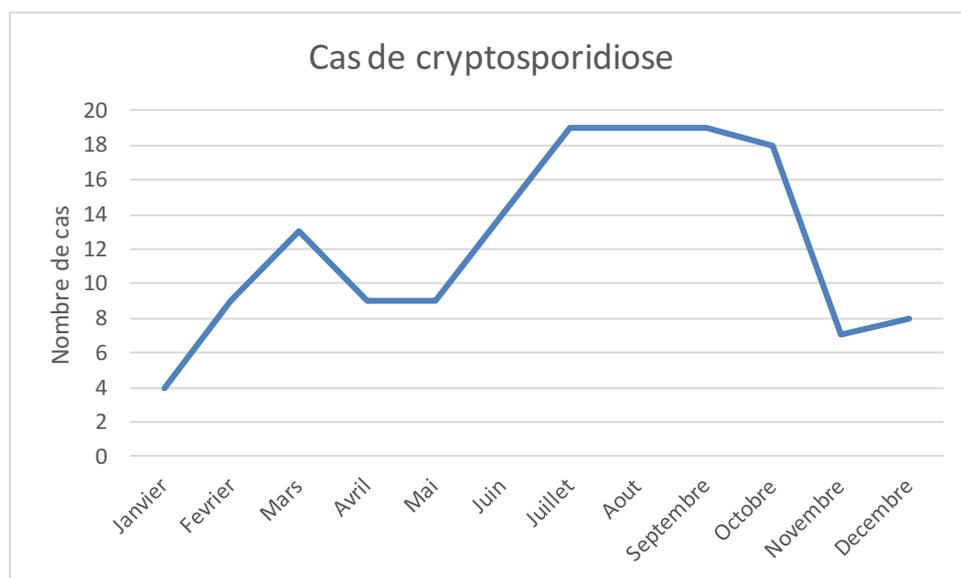


Figure 1b : Distribution mensuelle des cas de cryptosporidioses

En 2017, 45% des patients avec une cryptosporidiose déclarée au CNR LE étaient immunocompétents (Figure 2). Cette proportion est légèrement plus élevée qu'en 2016, ce qui est probablement lié à la participation au réseau en 2017 de nouveaux laboratoires privés.

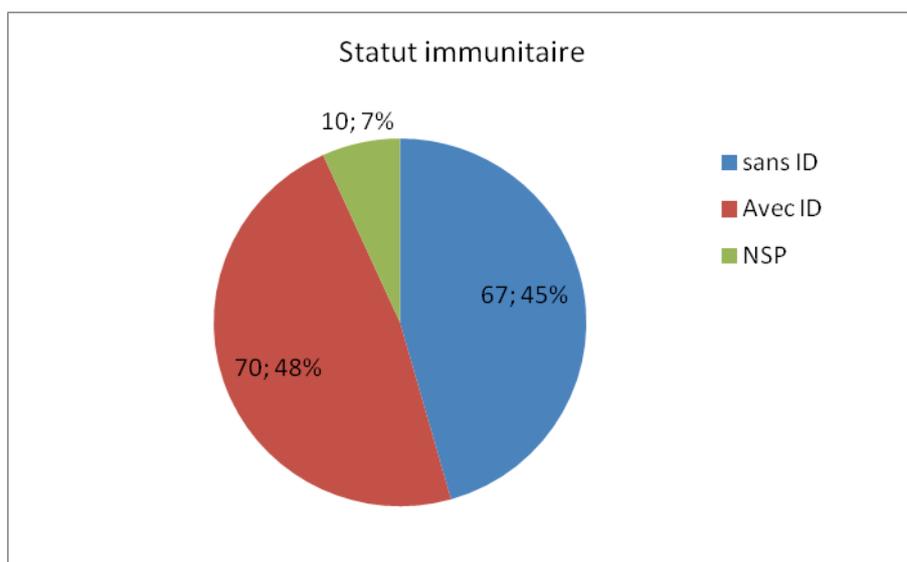


Figure 2 : Statut immunitaire des patients atteints de cryptosporidies

En revanche, les causes d'immunodépression des patients atteints de cryptosporidies restent les mêmes en proportion que celle retrouvées les années précédentes (Figure 3). Comme les années précédentes, la moitié des patients atteints de cryptosporidies étaient hospitalisés et parmi eux, la moitié l'étaient du fait de leur cryptosporidies. (Figures 4 et 5)

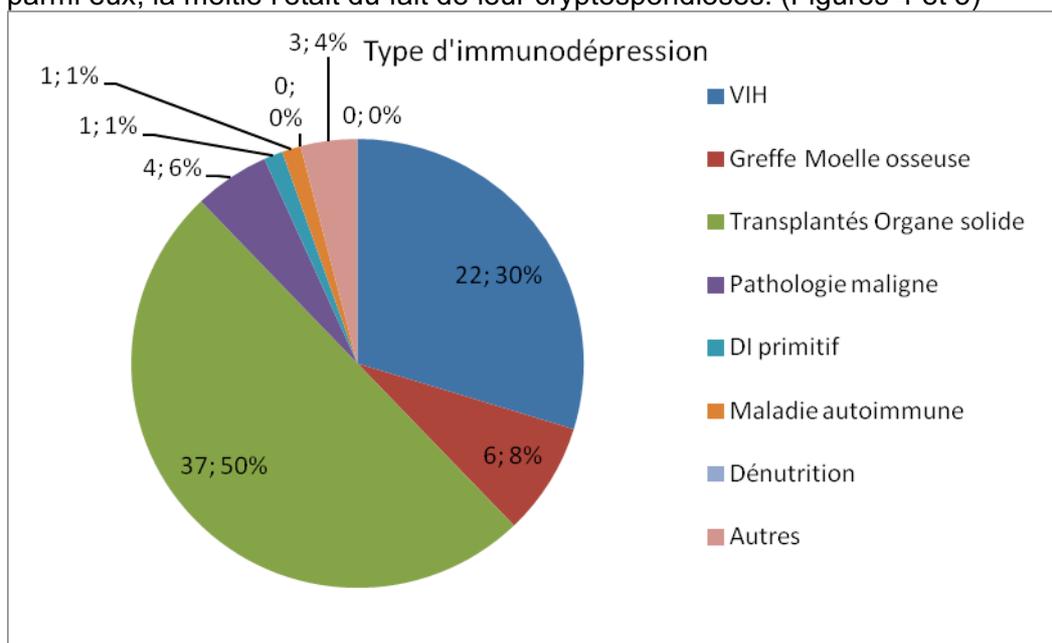


Figure 3 : Pathologie expliquant l'immunodépression des patients atteints de cryptosporidies

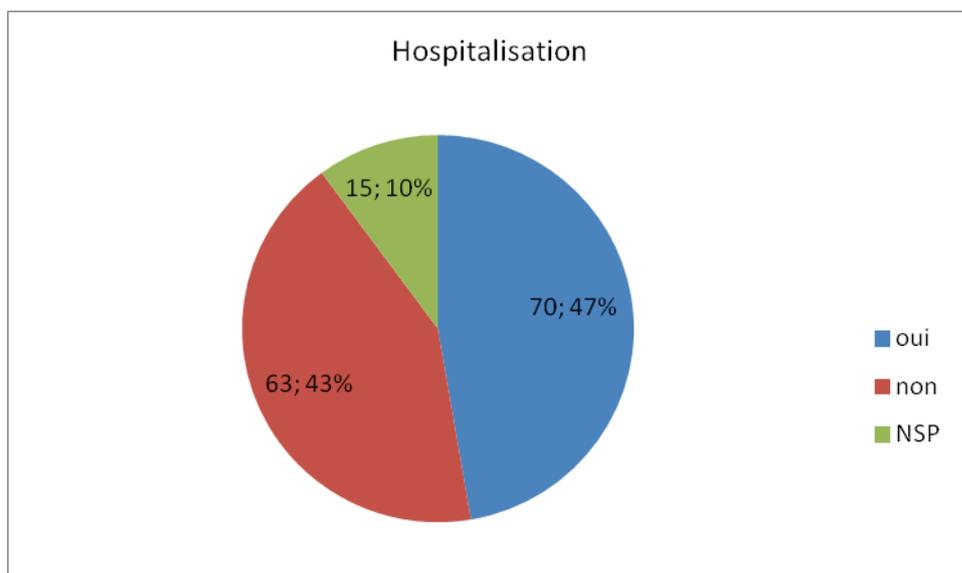


Figure 4 : Proportion de patients hospitalisés atteints de cryptosporidioses

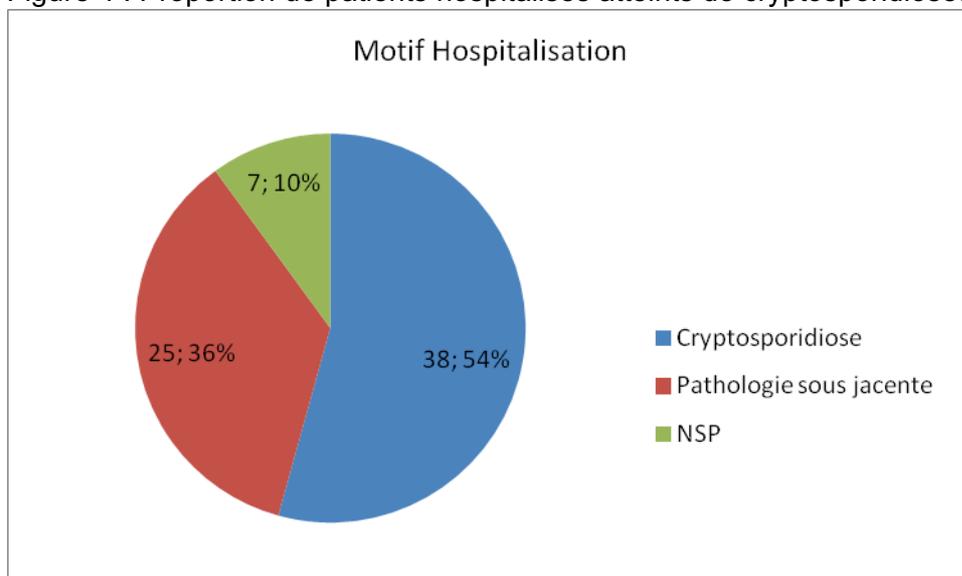


Figure 5 : Motif d'hospitalisation des patients atteints de cryptosporidioses

En 2017, 2/148 patients atteints de cryptosporidiose sont décédés. Concernant la cause de l'infection, 20% des patients ont contracté leur infection à l'étranger, 20% était en contact avec un patient diarrhéique, 12% ont pu contracté l'infection lors d'une baignade et 8% du fait d'un aliment potentiellement contaminé (ingestion de coquillage cru pour 8 patients, de lait cru non pasteurisés pour 2 autres patients ou de cidre fermier non pasteurisé pour 2 autres patients).

Pour la première année en 2017, les isolats ont tous été caractérisés en temps réel. Concernant *Cryptosporidium parvum* espèce majoritaire comme les années précédentes, le génotype IIaA15G2R1 apparaît comme majoritaire suivi du génotype IIa A16G2R1. Ces 2 génotypes sont les plus répandus aussi bien chez l'homme que chez les ruminants en Europe occidentale. Concernant *Cryptosporidium hominis*, le génotype dominant IaA10G2 est aussi le plus répandu en Europe occidentale (Figures 6 et 7).

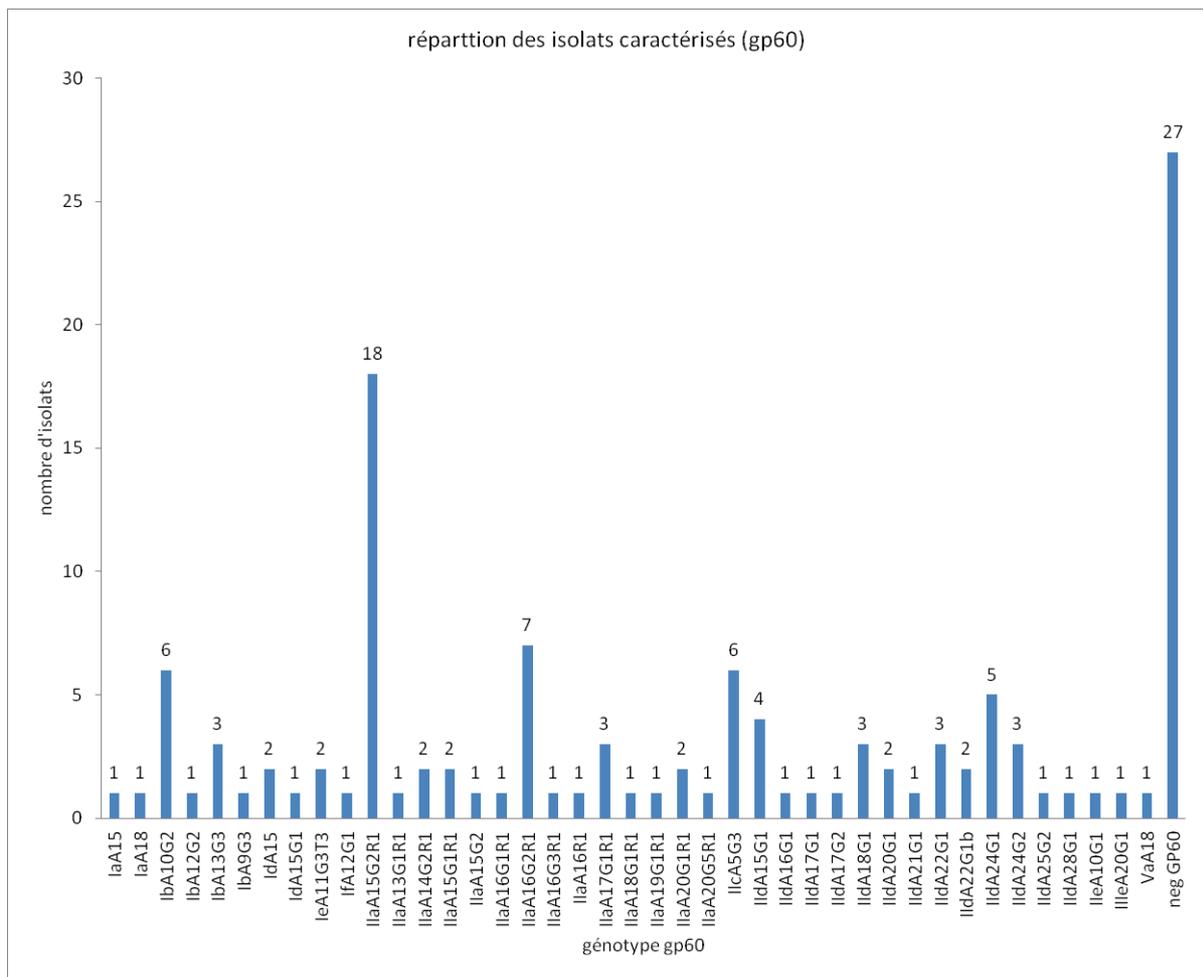


Figure 6 : Génotype *gp60* des isolats de *Cryptosporidium* adressés au CNR LE en 2017

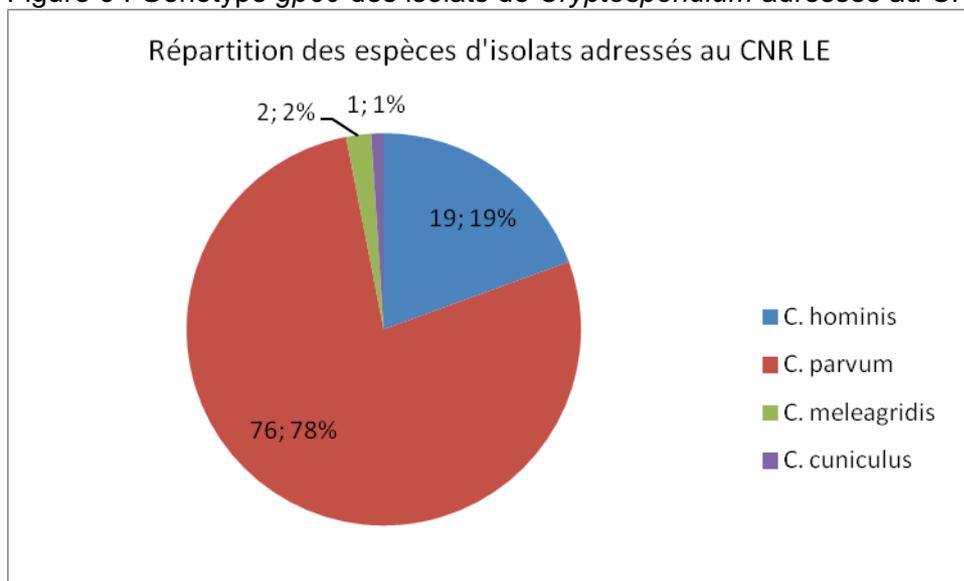


Figure 7 : Répartition des espèces de *Cryptosporidium* au sein des isolats adressés en 2017 au CNR LE.

### 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

Une collaboration étroite a été entreprise avec le LNR de Maison Alfort (Dr Vallée, Dr Polack) à l'occasion d'une réunion sur le site de Maison Alfort le 22 septembre 2018 entre les membres du CNR LE expert et ceux du LNR « Parasites transmis par les aliments ». Cette collaboration s'est concrétisée lors de l'investigation des épidémies de Caylus et de Nantes avec échanges d'isolats.

Une collaboration étroite avec le laboratoire de référence européen de Swansea a été développée avec accueil du Pr Chalmers au CNR, et mission début 2018 à Swansea d'un chercheur post-doctoral du laboratoire. Un échange d'isolat au niveau européen en vue de la réalisation d'un contrôle de qualité inter-laboratoire pour la caractérisation génétique des isolats est prévue au mois de juin 2018.

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

Dans le but de la recherche d'isolats à potentiel zoonotique chez les bovins en France, dans le cadre d'une enquête nationale sur l'incidence de la cryptosporidiose bovine, nous avons mis en évidence une fréquence élevée de portage asymptomatique de *Cryptosporidium spp.* à potentiel zoonotique dont de nombreux isolats de *C. hominis* (CF *Infra*).

## **4 Alerte**

1/ Epidémie de Caylus. En juin 2017, une épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique a été mise en évidence dans le camp militaire de Caylus (Tarn-et-Garonne, France). En fait, depuis 2015, de nombreux cas groupés de gastroentérites aiguës (GEA) avaient été signalés chez les militaires stagiaires récemment établis au camp de Caylus., L'identification de l'agent pathogène, *Cryptosporidium hominis* a été obtenue en 2017 grâce à l'utilisation d'une stratégie diagnostique syndromique (Filmarray, Biomérieux, France) par le Laboratoire de l'Hôpital d'Instruction des Armées (HIA) Bégin.

Du 10 au 22 juin 2017, 2 épidémies successives de GEA (respectivement 40 et 60 patients) survenues chez des militaires stagiaires ont été détectées avec un taux d'attaque initial global de 28% sans qu'aucune augmentation significative de l'incidence des GEA n'ait été préalablement signalée dans la population civile. L'envoi des échantillons de selles au CNR LE *Cryptosporidium* (Rouen) a permis la confirmation de l'épidémie (isolats de *Cryptosporidium hominis* de génotype unique IbA10G2).

L'enquête épidémiologique a permis d'identifier l'eau du réseau comme origine de l'épidémie. En effet, des analyses effectuées selon la norme NF T 90-455 ont révélé microscopiquement la présence d'oocystes de *Cryptosporidium spp.* en quantités importantes sur plusieurs sites du camp militaire et du réseau civil. L'examen par le CNR- LE de prélèvements hydriques a permis d'identifier le seul génotype *Cryptosporidium hominis* IbA10G2 et de confirmer ainsi l'origine hydrique des épisodes épidémiques.

Une restriction d'utilisation d'eau a donc été prescrite fin juin 2017 avec distribution d'eau embouteillée à la population militaire et civile desservie par le réseau contaminé. L'utilisation d'une unité mobile d'ultrafiltration a permis la levée de la restriction à partir de mi-août 2017, après vérification de la décontamination parasitaire.

Le suivi à 1 mois et à 3 mois des militaires ayant bu de l'eau contaminée a permis d'établir que le taux d'attaque initial de l'épidémie (du 10 au 29 juin) avait été de 40 % avec 142 cas probables identifiés au cours des 2 épidémies qui coïncidaient aux arrivées successives de 2 compagnies militaires sur le site. Le suivi coprologique des patients a montré la persistance d'ADN parasitaire dans les selles 1 mois et 3 mois après l'infection chez respectivement 17/42 et 11/21 des patients. Les examens microscopiques n'étaient positifs qu'après concentration chez 10/42 à 1 mois, et tous les examens microscopiques étaient négatifs à 3 mois. Enfin, 7

patients présentaient des symptômes digestifs compatibles avec le début d'un syndrome de l'intestin irritable post-infectieux 3 mois après l'infection.

2/ Epidémie de Nantes. Le jeudi 23 novembre 2017, un médecin de santé scolaire a appelé la Cellule de veille et d'alerte (CVA) de l'ARS Pays de la Loire pour signaler que 180 élèves d'un collège public de Loire-Atlantique présenteraient des troubles digestifs. Un questionnaire d'enquête épidémiologique sur la consommation d'eau et/ou de repas à la cantine a été mis en ligne le vendredi 24 novembre 2017 sur le site du collège, pour les élèves et leurs parents, les professeurs et les autres membres du personnel de l'établissement. Parmi les 293 personnes ayant répondu au questionnaire, 175 sujets symptomatiques ont été identifiés dont 165 élèves, 8 professeurs et 2 salariés. Le collège comptant 456 élèves au total, le taux d'attaque pour l'ensemble des élèves était de 36 %. La quasi-totalité (98 %) des sujets déclaraient avoir présenté une diarrhée, les autres signes cliniques rapportés étaient des nausées (64 %), des douleurs abdominales (62 %), de la fièvre (33 %) et des vomissements (26 %). Quinze prélèvements de selles analysés par le laboratoire privé local et (ou) par le laboratoire du CHU de Dijon CNR des virus des gastro-entérites, et aucun agent pathogène bactérien ou viral n'a été identifié. Deux des prélèvements, pris au hasard, ont fait l'objet d'une recherche d'autres agents pathogènes par approche syndromique (FilmArray, Biomérieux) par le CNR Laboratoire collaborateur de Dijon qui s'est avérée positive pour *Cryptosporidium* spp. Quinze prélèvements de selles ont fait l'objet d'une recherche de *Cryptosporidium* par le CNR LE cryptosporidioses : 12 étaient positives, toutes d'espèce *C. parvum*. Le typage du parasite par séquençage a permis l'identification dans 9 prélèvements du génotype *C. parvum* IIaA15G2R1, un génotype très fréquent chez l'homme et chez les bovins. Une large majorité (90 %) des répondants déclarait avoir mangé à la cantine du collège le 20 et/ou 21 novembre, et la proportion de malades y était significativement plus élevée. Dans les menus du 20 et du 21 novembre, le seul aliment cru consommé par l'ensemble des sujets symptomatiques était un fromage blanc non pasteurisé provenant d'une ferme "biologique", dont aucun échantillon n'avait été conservé.

Une enquête vétérinaire réalisée dans la ferme n'a détecté aucune anomalie dans le mode opératoire de préparation des fromages blancs, mais a établi que 2 veaux de la ferme étaient contaminés par *Cryptosporidium* spp.. L'analyse par le CNR LE de ces parasites a révélé qu'il s'agissait de *C. parvum* du même génotype, IIaA15G2R1, que celui des isolats provenant des patients diarrhéiques. .. Le séquençage du microsatellite MSC 6-7, réalisé par le CNR LE à partir de 3 prélèvements de patients, est en faveur d'une contamination d'origine bovine. L'analyse comparative des isolats humains et des isolats des veaux de la ferme par séquençage à haut débit est en cours au CNR LE.

A l'occasion de ces épidémies, des contacts réguliers avec des médecins épidémiologistes de Santé Publique France, du service de santé des armées (Dr V. Pommier de Santi, Dr Tong) et de la Cire des pays de Loire (Dr Hubert), la DDPP de Loire Atlantique (Dr Dugast) ainsi que l'ARS des pays de Loire (Dr Prat) ont permis le maintien d'une communication en temps réel.

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

### **5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé**

*Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques ;*

En fin d'année 2017, nous avons accueilli au CNR Madame Amel Benat Enseignant- chercheur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger pour la former au génotypage d'isolats zoonotiques.

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

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

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

-Coccidioses intestinales (G. Gargala)

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

Les données de surveillance et de production du CNR LE ont été communiquées aux membres du réseau des laboratoires participants au cours d'une réunion annuelle qui a eu lieu le 5 décembre en 2017 à la Faculté des Sciences biologiques et pharmaceutiques (Paris Descartes). Cette réunion a permis des échanges directs et la validation des décisions proposées par le comité de pilotage. L'ensemble des communications effectuées lors de la réunion de 2017 a été envoyé par mail à tous les membres du réseau.

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

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

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

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

*Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités si ces données sont disponibles),* Grâce à la communication aux professionnels de Santé du numéro de téléphone du CNR LE, les biologistes médecins (LF, GG) du CNR LE sont régulièrement sollicités (environ 100 appels pour l'année 2017) et apporter un appui aux professionnels concernés par la cryptosporidiose (médecins en charge des patients dont en particulier infectiologues, réanimateurs, gastroentérologues, pédiatres ; hygiénistes ; pharmaciens)

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

Lors de l'épidémie de cryptosporidiose de Caylus, le Centre d'épidémiologie du Service de Santé des Armées s'est rapproché du CNR LE afin d'obtenir des conseils en vue de l'investigation de cette épidémie.

## **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 nouveau site internet du CNR LE

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

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

N.B. Ne seront décrites ici que les études non mentionnées précédemment (Etudes de nouveaux marqueurs épidémiologiques, Paragraphe 2.1, études d'évaluation des réactifs, paragraphe 2.2 ; investigations d'épidémies, paragraphe 4)

### **6.1.1 Etude de la circulation d'isolats zoonotiques en France**

1/ Etude de la prévalence de l'infection à *Cryptosporidium* spp. chez des jeunes veaux en France (Razakandrainibe *et al.*, 2018)

Summary. *Cryptosporidium* spp. infections are the most frequent parasitic cause of diarrhea in

humans and cattle. However, asymptomatic cases are less often documented than symptomatic cases or cases with experimentally infected animals. *Cryptosporidium* (*C.*) *hominis* infection accounts for the majority of pediatric cases in several countries, while *C. parvum* is a major cause of diarrhea in neonatal calves. In cattle *Cryptosporidium* spp. infection can be caused by *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* and *C. ryanae*, and recently, reports of cattle cases of *C. hominis* cryptosporidiosis cases suggest that the presence of *C. hominis* in calves was previously underestimated.

From February to November 2015, *Cryptosporidium* spp. infected calves were detected in 29/44 randomly included farms from 5 geographic regions of France. *C. hominis* and *C. parvum* were found in 12/44 and 26/44 farms, respectively with higher *C. hominis* prevalence in the western region. In 9 farms, both *C. parvum* and *C. hominis* were detected. Eighty-six of 412 (73/342 asymptomatic and 13/70 symptomatic) one to nine-week-old calves shed *C. hominis* or *C. parvum* oocysts (15 and 71 calves, respectively), with no mixed infection detected. The predominant *C. hominis* IbA9G3 genotype was present in all regions, and more frequent in the western region. An incompletely characterized Ib, and the IbA13G3, IbA9G2 and IbA14G2 genotypes were present only in the western region. For *C. parvum*, the most frequent genotype was IIaA16G3R1 with no geographic clustering. Most *C. hominis* infected calves were asymptomatic, with some exceptions of IbA9G2 and IbA9G3 isolates, while *C. parvum* IIaA16G3R1 was associated with symptoms.

Present results indicate for the first time that in several geographic regions of France, *C. hominis* was present in about one fifth of both asymptomatic and symptomatic infected calves, with isolated genotypes likely associated with human infection. Further investigations are aimed at documenting direct or indirect transmissions between livestock and humans.

## 2/ Etude de rôle potentiel de rongeurs (*Microtus arvalis*) dans la circulation environnementale des isolats de *Cryptosporidium* spp.

L'objectif de ce travail commencé en 2017 est d'étudier le rôle potentiel de rongeurs (*Microtus arvalis*) dans la circulation des isolats de *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement. Cette étude est réalisée en partenariat avec le laboratoire du CHU de Clermont-Ferrand. La tâche du CNR LE a été de caractériser les isolats de *Cryptosporidium* spp. provenant de fèces de *Microtus arvalis*. Jusqu'ici, seules deux espèces (*C. parvum* et *Cryptosporidium* génotype muskrat) ont été détectées. Cette étude se poursuit en 2018.

## 3/ Etude de la contamination de singes *Macacus fascicularis* en quarantaine au Centre de primatologie de Strasbourg avant leur expédition à visée d'expérimentation animale dans des laboratoires français.

L'objectif de ce travail réalisé en collaboration avec le laboratoire de Parasitologie du CHU de Strasbourg a été d'étudier la contamination des 86 singes *Macacus fascicularis* en quarantaine au centre de primatologie de Strasbourg avant leur expédition à visée d'expérimentation animale dans des laboratoires français. Ces animaux proviennent d'un élevage situé à l'île Maurice (33 individus) et d'un autre élevage situé au Vietnam (53 individus). Seuls 2 animaux provenant de l'île Maurice ont été trouvés infectés, porteurs de *Cryptosporidium hominis* de génotype IbA13G3.

## 4/ Etude de la contamination de lacs de barrage en France

Dans le cadre de la préparation de la vidange de 3 lacs de barrage, le but du travail réalisé en 2017 en collaboration avec le Service environnement d'EDF et l'UMR CNRS 6143 de l'Université de Rouen a été de rechercher la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans des prélèvements représentatifs de sédiments de retenue d'eau, en vue de caractériser leur viabilité, leur infectivité et leurs génotypes. Les prélèvements de sédiments d'une seule retenue d'eau renfermaient en faible quantité des oocystes non viables de *C. parvum* de génotype

IlaA16G3R1. En conséquence le risque de contamination des cours d'eau en aval lors de la vidange de ces lacs de barrage, apparait très limité.

### **612 Etude de la pathogénicité de *Cryptosporidium* spp.**

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

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

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

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

### *Publications nationales*

Gargala G., Razakandrainibe R., Costa D., Dumant C. La cryptosporidiose, une cause de diarrhée aiguë. Arch Pediatr. 2017; 24:1344-9.

Costa D., Razakandrainibe R, Favennec L. Diagnostic étiologique d'une diarrhée persistante au retour . Revue Francophone des laboratoires, 2017 ; 497, 44-49.

### Chapitre d'ouvrage

#### Leméteil D.

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

#### Gargala G.

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

### *Publications internationales*

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

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

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

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

Lanternier F, Amazzough K, Favennec L, Mamzer-Bruneel MF, Abdoul H, Tourret J, Decramer S, Zuber J, Scemla A, Legendre C, Lortholary O, Bougnoux ME\*\*; ANOFEL Cryptosporidium National Network and Transplant Cryptosporidium Study Group. *Cryptosporidium spp.* Infection in Solid Organ Transplantation: The Nationwide "TRANSCRYPTO" Study. Transplantation. 2017 Apr;101(4):826-830.

#### *Communications nationales*

Razakandrainibe R., Diawara I., Costa D., Jozan T., Gargala G., Jaquet R., Ballet JJ., Favennec L. *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in Western France. Congrès SFP-SFMM 2017, 29-31 Mars 2017, Toulouse, France.

#### *Communications internationales*

Razakandrainibe R. Diawara I, Costa D., Le Goff L., Jozan T., Jaquet R., Gargala G., Ballet JJ., Favennec L. Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic pre-weaned calves in western France. VI<sup>e</sup> IGCC, 26-28 avril 2017, La Havane, Cuba

Favennec L., Anofel members Clinical and epidemiological characteristics of *Cryptosporidium spp.* Infections in adult and pediatric immunocompromized patients in France, 2015-2016. VI<sup>e</sup> IGCC, 26-28 avril 2017, La Havane, Cuba

Razakandrainibe R., Frealle E\*\*, Nourrisson C\*\*, Valot S.\*, Favennec L., Kapel N.\*\*, Dutoit E.\*\*, Poirier P.\*\*, Dalle F.\*, Anofel members. Real time PCR procedure for *Cryptosporidium spp.* Detection in human stools : a multicentric evaluation. VI<sup>e</sup> IGCC, 26-28 avril 2017, La Havane, Cuba

Diawara EI, Le Goff L., Stachulski AV, Francois A., Razakandrainibe R., Ballet JJ, Favennec L. Rosignol JF, Gargala G. Activity of aminoester thiazolide RM 5061 against *Cryptosporidium parvum* in cell culture assay and in experimentally infected gerbils. VI<sup>e</sup> IGCC, 26-28 avril 2017, La Havane, Cuba

Razakandrainibe R. Gargala G., Costa D., Bougnoux ME\*\*, Favennec L. Fatal disseminated *Cryptosporidium erinacei* infection in an infant with hyper IgM syndrome caused by CD40L deficiency. VI<sup>e</sup> IGCC, 26-28 avril 2017, La Havane, Cuba

Razakandrainibe R., Frealle E\*\*, Nourrisson C\*\*, Valot S.\*, Favennec L., Kapel N.\*\*, Dutoit E.\*\*, Poirier P.\*\*, Dalle F.\*, Anofel members. 27th ECCMID, Vienna, 2017. Multicentric evaluation of the real-time PCR assay Amplidiag Stool Parasites for *Cryptosporidium spp.* detection in human stools

Razakandrainibe R., Gargala G., La Carbona S., Costa D., Ballet JJ., Favennec L. *Cryptosporidium parvum* infection in a kidney transplanted patient enabled subsequent cryptosporidiosis diagnosis in household diarrhea cases. European Network for Foodborne Parasites in Europe (EURO-FBP), 16-17<sup>th</sup> May 2017, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

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

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

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

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

#### *Publications des laboratoires participant au réseau*

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

Essid R, Menotti J.\*\*, Hanen C, Aoun K, Bouratbine A. Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from human populations in an urban area of Northern Tunisia. Infect Genet Evol. 2018 Mar;58:237-242. doi: 10.1016/j.meegid.2018.01.004. Epub 2018 Jan 7. PubMed PMID: 29320719.

Osman M, Benamrouz S, Guyot K\*\*, Baydoun M, Frealle E\*\*, Chabe M, Gantois N, Delaire B, Goffard A, Aoun A, Jurdi N, Dabboussi F, Even G, Slomianny C, Gosset P, Hamze M, Creusy C, Viscogliosi E, Certad G. High association of *Cryptosporidium* spp. infection with colon adenocarcinoma in Lebanese patients. PLoS One. 2017 Dec 19;12(12):e0189422.

Baydoun M, Vanneste SB, Creusy C, Guyot K\*\*, Gantois N, Chabe M, Delaire B, Mouray A, Baydoun A, Forzy G, Chieux V, Gosset P, Senez V, Viscogliosi E, Follet J, Certad G. Three-dimensional (3D) culture of adult murine colon as an in vitro model of cryptosporidiosis: Proof of concept. Sci Rep. 2017 Dec 11;7(1):17288.

Osman M, El Safadi D, Benamrouz-Vanneste S, Cian A, Moriniere R, Gantois N, Delgado-Viscogliosi P, Guyot K\*\*, Bosc S, Chabé M, Petit T, Viscogliosi E, Certad G. Prevalence, transmission, and host specificity of *Cryptosporidium* spp. in various animal groups from two French zoos. Parasitol Res. 2017 Dec;116(12):3419-3422.

Essid R, Chelbi H, Siala E, Bensghair I, Menotti J\*\*, Bouratbine A. Polymorphism study of *Cryptosporidium hominis* gp60 subtypes circulating in Tunisia. Microb Pathog. 2017 Sep;110:298-303.

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

Une collaboration étroite a été entreprise avec le LNR « Parasites transmis par les aliments » de Maison-Alfort (Dr Vallée, Dr Polack), (*cf supra* 3.4). La coopération s'est établie en particulier dans le cadre de l'analyse d'une source alimentaire (fromage blanc) potentiellement à l'origine de l'épidémie de Nantes. Des échantillons contenant des isolats de *Cryptosporidium* spp. ont aussi été échangés afin de comparer les méthodes de caractérisation des oocystes de *Cryptosporidium* spp. utilisées respectivement par le LE et le LNR. La coopération entre ces 2 structures se renforce actuellement, avec en particulier préparation conjointe d'une réunion scientifique.

#### **8 Programme d'activité pour les années suivantes**

Les perspectives du programme d'activité du CNR pour 2018-2019 sont conformes à la proposition de programme de travail quinquennal (2017-2021) envisagée dans le dossier de candidature.

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

8.2 . Projets de formation envisagés.

Une formation post-universitaire lors des Journées de Microbiologie clinique aura lieu à Paris en Septembre 2018.

Au niveau européen, une demande auprès de l'ESCMID. va être déposée pour l'organisation par le CNR LE à Rouen en juin 2019 d'une session de formation au diagnostic des protozooses intestinales (« educational workshop »).

Le site internet du CNR LE qui est en voie d'être finalisé donnera, via un espace réservé aux professionnels de santé, à la diffusion de conseils et informations pour le diagnostic et la prise en charge de la cryptosporidiose des patients immunocompétents et immunosupprimés.

8.3 Travaux de recherche appliquée envisagés, en lien avec les missions du CNR- Laboratoire expert

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

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

## **Annexe 1 : Missions & organisation du CNR**

### **1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés**

Le CNR-Laboratoire expert cryptosporidioses a été désigné en 2017 dans le but d'identifier et de caractériser les souches adressées par les laboratoires de biologie médicale correspondants. Il doit contribuer au maintien à la détention, à l'évaluation et à la diffusion de techniques diagnostiques, d'identification et de caractérisation des isolats. Il doit apporter son expertise pour le diagnostic moléculaire, animer et développer un réseau de laboratoires déclarants, permettant de fournir des données sur l'évolution et les caractéristiques des cas des cryptosporidioses et de signaler à l'Agence de Santé publique tout événement inhabituel (épidémies, ..). Enfin, il doit gérer la collection d'échantillon biologique et la base de donnée.

### **1.2 Organisation du CNR**

#### **Equipe du CNR LE :**

##### **Personnel Médical :**

L. Favennec Biologiste Responsable 0.4 ETP, Pharmacien biologiste, CNRLE,  
D. Costa, 0.3 ETP Dr Pharmacie, responsable Adjoint, CHU de Rouen  
G. Gargala Dr Med, 0.2 ETP, CHU de Rouen

##### **Ingénieur :**

R. Razakandrainibe, 0.2 ETP, Université de Rouen

##### **Technicien :**

V. Villiers, 0.5 ETP, Université de Rouen

**Secrétariat :** 0.2 ETP, CNR LE

### **1.3 - Locaux et équipements**

#### **Description détaillée des locaux**

Adresse : laboratoire Parasitologie-Mycologie, Pôle de Biologie Clinique, CHU de Rouen, 1 rue de Germont, 76031 Rouen cedex

Le laboratoire hospitalier est installé sur une surface totale de 395 m2 dont une surface dédiée au CNR de 95 m2.

Les locaux sont en adéquation avec la réglementation actuelle notamment celle spécifique à la biologie moléculaire. Des mesures très strictes de confinement et de séparation y sont imposées : organisation en trois locaux géographiquement séparés (préparation des ADN, préparation des mélanges réactionnels, étape amplification et post amplification) ; respect du sens du flux ; personnel autorisé ; séparation complète des matériels, blouses, consommables et réactifs ; sur-blouses ; autres mesures classiques de prévention des contaminations. De plus, en "pré-amplification" ont été physiquement séparées les activités de diagnostic en routine (sécurisation maximum) et les activités dites de développement (en particulier les activités du CNR).

La surveillance métrologique de l'ensemble des équipements (y compris l'enregistrement en continu des températures des enceintes réfrigérées) et la gestion des DASRI est assurée par le CHU de Rouen.

L'espace dédié pour la conservation des échantillons est au CRB du CHU de Rouen certifié NFS 96900 par EQS.

Le laboratoire candidat a accès au secteur septique de l'animalerie agréée de la Faculté de médecine et de pharmacie de Rouen où il dispose d'une pièce d'expérimentation de 15 m2 Il y réalisera les expérimentations animales destinées à l'évaluation des agents anti cryptosporidiens et des procédés physico chimique de décontamination.

## Surface des locaux :

### 1/ Bureaux

N° pièce	Niveau	Surface	Fonction
03B001	3	20 m2	Biologiste responsable
04B002	3	12 m2	Biologiste
03B003	3	14 m2	Biologiste
03B004	3	18 m2	Biologiste

### 2/ secteur Biologie moléculaire

03A011	3	13 m2	Préparation et stockage des souches,
03A012	3	10 m2	Extraction
03A013	3	10 m2	Pièce technique mix PCR
03A019	3	62 m2	Pièce technique Amplification et post amplification (PCR temps réel)
04	4	58 m2	Plateau technique de séquençage

### 3/ secteur Diagnostic microscopique

03A014	3	34 m2	Pièce microscopie à contraste de phase
03A023	3	5 m2	Pièce microscopie à fluorescence

### 4/ secteur Sérologie

03A015	3	54 m2	Pièce technique (réception, enregistrement), pièce sérologie automatisé (ELISA, WB)
--------	---	-------	-------------------------------------------------------------------------------------

Animalerie Zone A2 avec SAS, hébergement et zone laboratoire

zone A2 RDC Faculté 15 m2

## Description des principaux équipements

Le laboratoire dispose des équipements nécessaires pour les études en biologie moléculaire : automates diversifiés couvrant le panel des techniques actuellement sur le marché : PCR temps réel et PCR conventionnelle et séquenceur de type Sanger. Il dispose également d'un spectromètre de masse avec détecteur Malдитof (Biotyper, Bruker). La diversité des équipements présents dans le laboratoire permet d'assurer une expertise complète dans ces domaines.

La salle de préparation et stockage des souches contient :

- poste de sécurité microbiologique (PSM)(X1)
- centrifugeuse (X1)
- congélateur à -20°C et à -80°C pour la conservation des ADN (X1)

La salle d'extraction est équipée de :

- poste de sécurité microbiologique (PSM) (X1)
- bains secs chauffants (X2)
- centrifugeuse pour microtubes (X2)
- extracteur semi- automatique (EZ1 Advanced XL ; Qiagen) (X1)
- réfrigérateur à +4°C, congélateur à -20°C (X1)

La salle de préparation de mix est équipée de :

- Congélateur à -20°C (avec enregistrement continu de la température et alarme en temps réel 24h/24)(X1)

La salle d'amplification comporte :

- thermocycleurs en temps réel : LightCycler 2.0 (Roche) (X1), CFX96 Touch(X1) (Biorad), et QX200Droplet DigitalPCR System (X1)
- thermocycleurs classiques (X2)

La salle de microscopie est équipée de : microscopes à contraste de phase (X6), et dans une pièce séparée un microscope à fluorescence

L'ensemble des enceintes réfrigérées bénéficient d'un enregistrement continu de la température et d'un système d'alarme en temps réel 24h/24.

En complément, les Laboratoires Supports mettent à disposition leurs locaux et équipements pour participer aux activités du CNR.

#### 1.4 Collections de matériel biologique

**Organisation de la collection** La collection de matériel biologique du CNR LE renferme des prélèvements de selles et d'ADN parasitaire d'origine humaine. Les souches sont actuellement conservées dans une solution aqueuse de K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub> à 2.5% à +5°C +/- 3°C condition optimale pour leur conservation. En effet, nous avons montré que dans ces conditions, l'inféctivité des oocystes n'est pas significativement altérée après 6 ans (Delaunay et al., 2001). L'ADN parasitaire est conservé à -80°C +/- 10°C. Une déclaration de collection est actuellement en cours et les souches recueillies via le Réseau du CNR sont conservées par le Centre de ressource biologique certifié du CHU de Rouen (cf. Contrat de prestation de service avec le CRB du CHU de Rouen).

**Conditions de mise à disposition.** Les souches, avec l'accord de cession du biologiste responsable de l'isolement, sont destinées à être disponibles pour des projets scientifiques. Les souches déposées au CRB seront distribuées à la communauté scientifique, après avis du comité de pilotage, moyennant un coût permettant de couvrir les frais encourus par leur préparation et leur conservation. Au cours de l'année 2017, 12 échantillons de selles ont été fournies pour des collègues du CHU de Rennes pour une étude comparative de 3 kits PCR multiplex pour la détection des protozoaires intestinaux.

**Evolution des collections depuis le début du mandat actuel (2017-2021) du CNR.** Au cours de l'année 2017, notre collection a été enrichie avec des souches obtenues pour la surveillance et caractérisée par leur microsatellite *gp60* de *C. parvum* (80), *C. hominis* (20), *C. meleagridis* (1) et *C. cuniculus* (1). 58 isolats ont en cours de validation.

#### 1.5 Démarche qualité du laboratoire

Tous les laboratoires correspondants du CNR sont en démarche qualité et tous sont engagés dans le processus d'accréditation selon la norme NF EN ISO15189 pour la biologie médicale.

EN 2017, le laboratoire CNR LE a été accrédité COFRAC selon la norme ISO EN 15189 sur la ligne de portée PM7 (selon le SH INF 50) comprenant entre autre la recherche dans les selles par examen microscopique des cryptosporidies. Le dossier d'accréditation pour la ligne de portée PM8 (selon le SH INF 50) concernant l'expertise par biologie moléculaire de la recherche et de la caractérisation des cryptosporidies du laboratoire expert est en cours de rédaction et sera déposé en 2018.

Pour la collection d'échantillons, les souches isolées par les membres du CNR sont adressées au CRB du CHU de Rouen qui est certifié selon la norme propre aux Centres de Ressources Biologiques (certification NFS 96900 du 4 février 2016 par Euro-Quality System).

Le Dr Costa, responsable adjoint du CNR LE est Responsable Qualité, et titulaire d'un DU Qualité.

Dans le cadre de la démarche Qualité nous sommes inscrit depuis plusieurs années au contrôle britannique (UKNEQAS) pour le diagnostic de la cryptosporidiose pour lequel nous avons toujours eu des résultats satisfaisants.

## **Annexe 2 : Capacités techniques du CNR**

### **2.1 Liste des techniques de référence**

Dans le cadre de son activité d'expertise, le CNR LE utilise 3 techniques diagnostiques complémentaires :

1. L'examen microscopique des selles après coloration de Heine sur selle native ou après concentration de Bailenger. (Il s'agit de la technique déjà accrédité selon la norme NF EN ISO 15189, ligne de portée PM7 du SH INF 50 depuis l'année 2017). Cette technique rapide permet de vérifier la présence ou l'absence d'oocystes dans les selles réceptionnées. Elle permet également le dénombrement des oocystes.
2. La PCR temps réel de spéciation permettant de rechercher la présence de *Cryptosporidium* spp., *C. hominis* et *C. parvum* dans les échantillons extraits.
3. Le séquençage du gène de la *gp60* permettant d'identifier précisément les isolats.

Les résultats obtenus avec chacune de ces 3 techniques complémentaires sont systématiquement confrontés avant de rendre définitivement le résultat de l'expertise d'un échantillon.

Dans le cas d'épidémie, le séquençage d'autres microsattellites est réalisé : gènes *msc 6-7*, *cp 47*.

### **2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR**

Techniques de diagnostic :

Technique microscopique après coloration d'un frottis de selles obtenu après concentration par méthode de bailenger ; coloration possible : Henricksen, Heine, Auramine.

Technique utilisable pour la biologie moléculaire :

Extraction de l'ADN à partir des selles par le kit Power fecal (Qiagen)

Amplification par le kit Amplidiag (Mobidiag )