



# RAPPORT ANNUEL

# D'ACTIVITE 2023

***Année d'exercice 2022***

## CNR Cryptosporidioses

	<b>Organisme / Structure d'hébergement</b>	<b>Responsable</b>
Laboratoire CNR	CHU de Rouen – CNR-LE centre coordonnateur	L. Favennec
Laboratoire Collaborateur	CHU de Dijon	F. Dalle

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
<b>1. Missions et organisation du CNR</b>	<b>6</b>
Mission et Organisation	6
Démarche Qualité	6
<b>2. Activités d'expertise</b>	<b>7</b>
2.1 Evolution des techniques	7
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	9
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2.4 Collections de matériel biologique	10
2.5 Activités d'expertises	11
2.6 Activités de séquençage	12
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	14
<b>3. Activités de surveillance</b>	<b>15</b>
3.1 Description du réseau de partenaires	15
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	18
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	24
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	24
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	24
<b>4. Alertes</b>	<b>26</b>
<b>5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil</b>	<b>27</b>
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	27
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	28
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	28
<b>6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR</b>	<b>30</b>
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	30
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	32
<b>7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux</b>	<b>35</b>

<b>8.</b>	<b>Programme d'activité pour les années suivantes</b>	<b>36</b>
<b>1.</b>	<b>Annexe 1 : Missions &amp; organisation du CNR</b>	<b>38</b>
1.1	Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	38
1.2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	38
1.3	Locaux et équipements	39
1.4	Collections de matériel biologique	43
1.5	Démarche qualité du laboratoire	45
<b>2.</b>	<b>Annexe 2 : Capacités techniques du CNR</b>	<b>47</b>
2.1	Liste des techniques de référence	47
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	48

## RESUME ANALYTIQUE

### Faits marquants

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 2022, le CNR-LE et le laboratoire collaborateur ont continué l'évaluation des performances des techniques commerciales et ces travaux ont abouti à des améliorations des protocoles fabricants correspondants.

En 2022, 7 laboratoires ont rejoint le réseau du CNR (portant la liste des laboratoires du réseau à 71) et la collection biologique du CNR a été enrichie de 949 prélèvements caractérisés pour un total de 1040 prélèvements reçus. Néanmoins, du fait du nombre important d'analyses réalisées dans le contexte sanitaire du SARS-CoV-2, plusieurs laboratoires privés ont été moins réactifs sur la déclaration des cas de Cryptosporidioses. Bien que la détection des épidémies a pu être indirectement impactée par la crise sanitaire, trois alertes épidémiques ont été lancées au cours de l'année.

Plusieurs travaux sont en cours pour optimiser la détection et la surveillance épidémiologique de *Cryptosporidium* spp. sur diverses matrices aujourd'hui difficiles à analyser (matrices laitières, végétaux, eaux usées...).

En 2022, le CNR-LE et le laboratoire collaborateur ont continué l'évaluation des performances des techniques commerciales et ces travaux ont abouti à plusieurs communications et publications scientifiques ainsi qu'à des améliorations des protocoles fabricants correspondants. Une technique a été élaborée par le CNR-LE afin d'évaluer l'infectivité des oocystes isolés à partir des échantillons. Cette technique est intéressante dans le cas des investigations des épidémies et permet d'optimiser la limite de détection de l'ADN de *Cryptosporidium* spp. 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 qui permet une caractérisation plus sensible et spécifique des échantillons ainsi que la détection d'associations d'espèces et/ou de génotypes de *C. parvum* et *C. hominis*.

En 2022, le CNR-LE a eu le plaisir d'organiser à Rouen le congrès national conjoint des sociétés Françaises de Parasitologie (SFP) et de Mycologie Médicale (SFMM). Les retours ont été excellents et les échanges scientifiques nombreux permettant la naissance de certains projets de recherche collaboratif.

## EXECUTIVE SUMMARY

### Highlights

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 2022, the CNR-LE and the collaborating laboratory continue to evaluate the performances of several commercial methods and leads to improvements of the corresponding manufacturer protocols.

In 2022, 7 laboratories joined the CNR network (bringing the total number of laboratories in the network to 71) and the CNR's biological collection was enriched by 949 characterized samples out of a total of 1040 samples received. Due to the large number of analyzes carried out in the context of the SARS-CoV-2 pandemic, several laboratories were less reactive in reporting cases of cryptosporidiosis. Outbreak detection may have been indirectly affected but three outbreak alerts were launched during the year.

Several works are in progress to optimize the detection and epidemiological monitoring of *Cryptosporidium* spp. on various matrices which are still difficult to analyze today (dairy, vegetable matrices, waste water, etc.).

In 2022, the CNR-LE and the collaborating laboratory continued to evaluate performances of several commercial methods leading to several scientific communications and publications, as well as improvements to the corresponding manufacturers' protocols. A method was developed by the CNR-LE to assess the infectivity of oocysts isolated from samples. This method is useful for outbreak investigations, and optimize the limit of detection. The collaborating laboratory has developed a NGS genotyping tool based on the study of the polymorphism of the gene encoding GP60 which allows more sensitive and specific characterization of samples as well as the detection of associations of species and/or genotypes of *C. parvum* and *C. hominis* DNA.

In 2022, the CNR-LE had the pleasure of organizing in Rouen the joint national congress of the French societies of Parasitology (SFP) and Medical Mycology (SFMM). The feedback were excellent and scientific exchanges were numerous and allowed the development of collaborative research projects.

# 1. Missions et organisation du CNR

---

VOIR ANNEXE 1 : ORGANIGRAMME

## Mission et Organisation

Au cours de l'année 2022, il n'y a pas eu d'évolution notable du CNR-LE comparativement aux années précédentes (même après le dépôt du dossier de candidature de la nouvelle mandature). Les nouveautés organisationnelles concerneront la nouvelle mandature et donc l'année 2023.

## Démarche Qualité

Concernant les analyses relatives au CNR-LE, le centre de Rouen a été accrédité COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 depuis 2017 sur la ligne de portée PM7 (renommée aujourd'hui BM MG07 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-LE (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 en 2022. Un audit a bien eu lieu en 2022, mais faute d'expert dédié à la parasitologie et du retard accumulé par le COFRAC en raison du contexte sanitaire, les activités en liens avec le CNR n'ont pas été évaluées. Elles le sauront lors du prochain audit. 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 de Dijon 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) 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)). Le laboratoire collaborateur a déposé une demande d'extension pour cette même ligne de portée BM-PM04 pour la méthode de génotypage de *Cryptosporidium* spp. par amplification et séquençage du gène codant la gp60. L'audit COFRAC est prévu en 2023.

## 2. Activités d'expertise

---

1/ Le CNR-LE a mis au point une technique de qPCR sur culture cellulaire afin d'évaluer l'infectivité des oocystes isolés à partir d'échantillons (fécales ou environnementaux). Cette technique permet également d'augmenter la limite de détection de l'ADN de *Cryptosporidium* spp. particulièrement utile en cas de faible contamination et d'investigation des épidémies.

2/ Des travaux sont en cours d'optimisation par le CNR-LE pour la détection et la surveillance épidémiologique de *Cryptosporidium* spp. sur diverses matrices aujourd'hui difficiles à analyser (matrices laitières, végétaux, eaux usées).

3/ Des techniques ont été adaptées et sont en cours d'optimisation pour la détection des mélanges d'espèces à partir d'un même échantillon primaire contaminé, utilisant notamment les technologies de séquençage haut débit (NGS)

4/ L'évaluation des techniques commerciales de diagnostic moléculaire de la cryptosporidiose s'est poursuivie sur l'année 2022. Nous avons rapporté les performances médiocres de certaines trousse commerciales pour les recherches parasitaires dans des échantillons de selles d'origine humaine. Mais ces études nous ont conduit à proposer des améliorations de certains kits commerciaux dont les évaluations complémentaires sont en cours.

5/ En 2022, la collection biologique du CNR a été enrichie de 898 prélèvements caractérisés (529 pour le CNR-LE et 369 pour le centre collaborateur) pour un total de 1040 prélèvements reçus (604 pour le CNR-LE et 434 pour le centre collaborateur).

### 2.1 Evolution des techniques

Depuis, 2022 :

- 1) Suite à la forte suspicion de la survenue d'une épidémie de cryptosporidiose liée à la consommation de fromage au lait cru, les travaux du CNR-LE sur l'optimisation des techniques d'isolement et de détection des oocystes de *Cryptosporidium* spp. sur matrice laitière transformée ont été poursuivis. Plusieurs essais sont en cours sur la

transformation du lait. L'optimisation de ces techniques permettra une meilleure investigation des épidémies potentiellement associées à la contamination de ces matrices le cas échéant.

- 2) De façon similaire, le CNR-LE travaille également à l'amélioration des techniques d'isolement et de détection des oocystes de *Cryptosporidium* spp. sur matrices végétales. L'optimisation de ces techniques permettra une meilleure investigation des épidémies potentiellement associées à la contamination de ces matrices.
- 3) Une technique de PCR quantitative sur culture cellulaire a été mise en place par le CNR-LE pour évaluer l'infectivité des oocystes. *Cryptosporidium* spp. étant un parasite intracellulaire obligatoire, les parasites vivants se multiplient en culture cellulaire, mais non en l'absence de cellules. Ainsi, l'infectivité peut être mesurée par PCR 48h après mise en culture d'oocystes par la différence entre les valeurs de Ct (cycle threshold) obtenues pour des cultures en présence et en absence de cellules hôtes (HCT-8), cette différence reflétant la multiplication des parasites en culture cellulaire.
- 4) Un projet de recherche accepté en lettre d'intention a été déposé par le CNR-LE à l'ANSES pour évaluer l'intérêt d'utiliser des bio-accumulants (végétaux aquatiques...) dans l'eau pour faciliter la détection environnementale des oocystes.
- 5) Le laboratoire collaborateur poursuit ses travaux d'optimisation de l'extraction des ADN de *Cryptosporidium* spp. à partir de différentes matrices, notamment environnementales (selles séchées, boues, terre, eau ...).
- 6) Le CNR-LE travaille depuis environ 1 an sur le suivi épidémiologique des isolats de *Cryptosporidium* spp. obtenus à partir des eaux usées dans le cadre d'un projet financé par la fondation de France.
- 7) Le laboratoire collaborateur a également initié des travaux à partir des eaux usées.
- 8) Afin de pallier à l'identification exclusive des sous-types dominants de *Cryptosporidium* spp. sur échantillons primaires, le CNR-LE a mis en place le génotypage GP60 sur échantillon dilués systématique en cas de suspicion de polyclonalité des souches.
- 9) 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 (gène utilisé actuellement par le CNR-LE et laboratoire collaborateur pour la caractérisation génotypique des souches). Cet outil permet ainsi (i) une caractérisation plus sensible et spécifique des échantillons, (ii) la détection d'associations d'espèces et/ou de génotypes de *C. parvum* et *C. hominis*. L'utilisation de cet outil sera très prochainement étendue aux autres espèces de *Cryptosporidium* spp. pouvant être isolées chez l'homme.
- 10) Le CNR-LE participe au groupe de travail de l'European Study Group for Clinical Parasitology animé par le Dr Titia Kortbeek (RIVM, Institut national de santé publique, Centre de contrôle des maladies infectieuses, Utrecht, Pays Bas) en vue de la rédaction de recommandations consensuelles au niveau européen pour le diagnostic coprologique parasitaire.

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

- Suite aux essais réalisés entre 2021 et 2022 par le CNR-LE sur l'automate ELITech InGenius®, une optimisation du protocole d'extraction et d'amplification a eu lieu par le pôle R&D de la société ELITechGroup. Un contrat est en cours de signature entre la société ELITechGroup et le centre coordinateur de Rouen du CNR cryptosporidioses, microsporidies et autres protozooses digestives (CMAP) et ses centres associés de Dijon et de Clermont Ferrand pour évaluation de la nouvelle procédure et marquage CE /IVD.
- En 2022, le CNR-LE a évalué les PCR d'amplification de la société Biosynex après extractions réalisées avec le kit QIAamp® PowerFecal Pro DNA commercialisé par la société QIAGEN (technique d'extraction manuelle la plus performante parmi celles préalablement testées par le CNR-LE) sur selles positives en microscopie. Les résultats seront soumis à publication.
- En 2022, le CNR-LE a réalisé des essais sur l'extracteur Altostar ALTONA. Plusieurs essais ont été réalisés en gamme de concentration parasitaire et sur selles de collection positives à plusieurs parasites intestinaux (*Cryptosporidium* sp. *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, microsporidies...). Des essais sur selles négatives ont également été réalisés. Après modification des protocoles d'extraction et de pré-traitement en collaboration avec le fabricant, les essais sont satisfaisants pour un automate d'extraction. Les performances de détection restent meilleures avec une extraction en kit manuel.
- En 2022, le laboratoire collaborateur du CNR-LE a réalisé une étude rétrospective sur des échantillons recueillis dans le cadre d'épidémies dans le but d'évaluer une technique de génotypage par NGS basée sur l'étude du polymorphisme du gène codant la GP60. Les résultats ont été publiés (Bailly et al. 2022).
- En 2022, le laboratoire collaborateur du CNR-LE a réalisé une étude visant à évaluer l'ensemble des étapes du diagnostic moléculaire à savoir : le pré-traitement (avec, sans, mécanique, chimique), l'extraction (manuelle, automatisées) et l'amplification génique (simplexe, multiplexe). Les performances de trente protocoles de biologie moléculaire pour la détection de *C. parvum* à partir d'échantillons de selles ont ainsi été testés. Les résultats ont été présentés lors de plusieurs congrès scientifiques et sont en cours de soumission à publication.
- Enfin, des essais comparatifs entre les performances des PCR multiplexes de Seegene et des kits Novodiag ont été initiés en 2022 par le CNR-LE. L'étude reste en cours et les travaux seront publiés ultérieurement.

## 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Depuis la crise sanitaire, il n'y a pas eu de formation sur site pour transfert de techniques aux autres laboratoires.

## 2.4 Collections de matériel biologique

En 2022, le CNR-LE et le laboratoire collaborateur ont reçu un total de 1040 échantillons (606 et 434 respectivement) soit une hausse de 53% par rapport à 2021. Parmi ces échantillons, 29 ont été reçus pour expertises, 5 pour explorations d'épidémies et 1006 pour activité de surveillance. Sur ces 1006 échantillons : 57 n'ont pas pu être confirmés en PCR ; 70 ont été typés au niveau de l'espèce ; 34 isolats d'espèces rares ont été identifiés ; 845 ont été sous-typés en *gp60*. Dans le cadre de la surveillance, les séquences de *gp60* sont établies pour tous les prélèvements reconnus positifs. Ces séquences sont en attente d'attribution de numéro d'accession sur GenBank. Un total de 898 selles ou fecal swabs positifs à *Cryptosporidium* spp. et 987 ADN ont pu être conservés : 351 selles, 178 fecal swabs (+4°/+3° C) et 553 ADN (-20°C) au CNR-LE et 369 selles et 434 ADN au laboratoire collaborateur de Dijon.

Concernant la précédente mandature 2017-2022 : les collections restent stockées dans chacun des centres associés au CNR-LE : *Cryptosporidium* spp. (Rouen + Dijon).

Concernant la nouvelle mandature mandature 2023-2027 : il s'y ajoute les souches de *Giardia duodenalis* (stockées à Rouen + Dijon), de *Cyclospora cayetanensis* (stockées à Rouen) ; d'*Entamoeba histolytica* (stockées à Dijon), les souches de microsporidies, *Cystoisospora belli* et de *Sarcocystis* species (stockées à Clermont Ferrand).

La collection correspondante est répertoriée au centre coordinateur de Rouen comme collection N°06 de la déclaration n°2008-711 avec jointe l'AC n° 2020-4274. 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, la collection correspondante est conservée par le CRB Ferdinand Cabannes du CHU de Dijon qui est certifié.

## 2.5 Activités d'expertises

### Activités d'expertise

	Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hôpital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
2022 – CNR-LE	22	CH	France	Spéciation et génotypage
2022 Laboratoire collaborateur	7	CHU	France	Discordance entre techniques de diagnostic

### Activités de surveillance

	Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hopital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
2022 – CNR-LE	580	CH/CHU : 115 LABM privé : 465	France	Spéciation et génotypage
2022 – Laboratoire collaborateur	426	CH/CHU : 66 LABM privé : 360	France	Spéciation et génotypage

### Explorations d'épidémie

	Nombre de prélèvements reçus	Provenance (LABM, Hopital)	Origine (France, étranger)	Type de caractérisation
2022 – CNR-LE	2	LABM	France	Spéciation et génotypage
	2	CHU	France	Spéciation et génotypage
2022 – Laboratoire collaborateur	1	CHU	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 à deux semaines.

## 2.6 Activités de séquençage

Au cours de l'année 2022, sur le total de 1040 échantillons reçus et analysés, il a été réalisé un séquençage Sanger sur 823 échantillons reçus dans le cadre de la surveillance épidémiologique, sur 2 échantillons reçus dans le cadre d'expertise et sur 12 échantillons reçus dans le cadre d'une suspicion d'épidémie. L'activité de séquençage Sanger est forte pour notre CNR mais est essentielle pour la surveillance épidémiologique et la détection des épidémies.

Concernant le NGS, en 2022, 106 échantillons positifs à *Cryptosporidium* spp. ont été génotypés par séquençage en NGS. Il s'agissait d'une étude rétrospective réalisée par le laboratoire collaborateur de Dijon, sur des échantillons recueillis dans le cadre d'épidémies. Les résultats ont été publiés (Bailly et al. 2022).

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> <b>NON</b>	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> <b>OUI</b>	Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, précisez quelle(s) plateforme(s)
	Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> <b>NON</b>	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> <b>OUI</b>	Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, précisez quelle(s) plateforme(s)
	Outils utilisés pour l'analyse des séquences : commercial (BioNumerics par exemple), outil open source, outil maison ...

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 (Miseq) et séquenceur MinION Oxford nanopore technologies). 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). Deux des membres du laboratoire collaborateur ayant participé à la formation « FROGS: tools for bioinformatics and statistics analyses with amplicon metagenomics data (Equipe INRA Toulouse (Genotoul)) », Le Laboratoire collaborateur du CNR-LE dispose en interne d'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.

<b>Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?</b>	
<input type="checkbox"/> <b>NON</b>	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
<input checked="" type="checkbox"/> <b>OUI</b>	Si OUI, précisez pour quelles activités. Indiquez s'il s'agit d'investigations d'épidémies ou d'investigations intervenues dans le cadre de la surveillance.

Le CNR-LE et le laboratoire collaborateur utilisent les outils de séquençage à leur disposition à la fois pour les investigations d'épidémies et pour la surveillance épidémiologique (cf détail ci-dessus).

**Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)**

Indiquez ici les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (précisez lesquelles) .

Cf paragraphe ci-dessus

**Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :**

Précisez ici le nombre de souches séquencées dans l'année

Cf paragraphe ci-dessus

**Séquençage utilisé à des fins de surveillance :**

Précisez ici le nombre de souches séquencées dans l'année :

Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées, ...

Cf paragraphe ci-dessus. Pour la surveillance épidémiologique, s'il s'agit d'une espèce identifiée ayant une nomenclature décrite sur le gène *gp60*, le séquençage est réalisé systématiquement. Ce séquençage est indispensable pour l'identification des sous-types qui ne peuvent être distingués autrement. Cette analyse est étroitement liée à l'investigation des épidémies car en cas de regroupement dans le temps et l'espace de sous-types identiques, il est déclenché en relation avec santé publique France pour investigation lors de suspicion d'épidémie.

**Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?**

Dans les bases de données fermées : Précisez

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadatas associées : Précisez

Cf paragraphe ci-dessus

## **2.7 Partage de séquences produites par les CNR**

En 2022, l'intégralité des échantillons reçus provenaient de France métropolitaine ainsi que des départements et régions d'outre-mer et des collectivités d'outre-mer. La nature des échantillons reçus a été décrite dans les paragraphes précédents.

Par ailleurs, en 2022 (comme chaque année depuis 2018), le CNR-LE a reçu 5 extraits d'ADN à analyser dans le cadre d'un échange international avec son homologue de Grande Bretagne (Cryptosporidium reference unit – swansea). Il s'agit à la fois de faciliter les échanges entre les partenaires européens et d'évaluer les techniques et interprétations avec ses paires.

Le laboratoire collaborateur participe également à ce programme depuis 2022.

Comme décrit ci-dessus, les données issues du séquençage sont déposées sur des banques de données publiques. Une réflexion est en cours pour faire remonter au mieux les données sur les épidémies survenues en France au niveau international.

## 3. Activités de surveillance

---

1/ Entre 2021 et 2022, 7 laboratoires ont rejoint le réseau portant désormais à 71 laboratoires, le nombre de laboratoires partenaires du CNR-LE.

2/ En 2021 et 2022, le nombre de déclarations de cas a quasiment doublé du fait de la participation croissante des laboratoires privés au réseau. Cette participation est fondamentale à la couverture nationale du réseau et à la pertinence des données épidémiologique recueillies permettant d'affirmer (contrairement aux idées reçues) que la cryptosporidiose est aussi fréquente si ce n'est plus chez les immunocompétents que chez les immunodéprimés aujourd'hui en France.

3/ En 2022, le CNR-LE a eu le plaisir d'organiser à Rouen le congrès national conjoint des sociétés Françaises de Parasitologie (SFP) et de Mycologie Médicale (SFMM). Les retours ont été excellents et les échanges scientifiques nombreux permettant la naissance de certains projets de recherche collaboratif.

4/ En 2022, comme chaque année, le CNR-LE a organisé à Paris une assemblée générale du CNR à laquelle l'ensemble des centres déclarants étaient conviés. Les retours et échanges ont encore une fois été excellents.

### 3.1 Description du réseau de partenaires

En 2022, le réseau de laboratoires partenaires était constitué de 71 laboratoires contre 64 en 2021. La répartition des laboratoires était la suivante : 17 laboratoires privés de biologie médicale, 40 CHU (10 parisiens, 27 en province et 3 outre-mer) 12 centres hospitaliers public et 2 HIA. En 2022, 130209 recherches de *Cryptosporidium* spp. ont été rapportées pour 1398 positives (1.08%). (Figure 1)

Depuis 2017, les déclarations de cas n'ont cessé d'augmenter chaque année. En 2022, 882 cas ont été déclarés contre 487 en 2021.

Laboratoire s hospitaliers	Examen des selles		Cryptosporidioses			
	Total	Nbre de patients	Total recherches	Nbre de patients	Nbre de cas	Nbre de patients (cas déclarés)
ALES	85	73	35	35	1	1
AMIENS	643	341	563	340	1	1
ANGERS	681	510	238	191	3	3
ANTIBES	95	80	14	13	3	3
AVRANCHES	16	9	16	9	0	0
BESANCON	275	180	177	119	2	1
BREST	404	245	300	186	2	2
CAEN	653	430	248	172	3	3
CLERMONT-FER	991	574	991	574	7	7
TEIL HENRI MON	1762	943	1762	943	3	3
DUJON	1095	824	1152	870	7	7
FORTDEFRANCE	758	413	213	123	0	0
GRENOBLE	1124	682	350	283	3	3
LILLE	2593	1918	977	743	14	13
LIMOGES	564	291	315	162	9	7
LYON	2731	1383	812	464	19	9
MARSEILLE	1101	816	855	630	34	34
MONTPELLIER	701	438	397	302	10	3
NANCY	1086	677	430	251	5	2
NICE	723	371	603	287	10	5
ORLEANS	315	259	134	115	3	2
PARIS BICHAT	989	690	746	674	12	12
PARIS COCHIN	743	538	96	76	2	2
PARIS NECKER	1014	768	777	596	16	8
PARIS St LOUIS	1230	733	965	612	22	10
ARIS StANT/TEN	979	522	979	522	2	2
POINTE A PITRE	326	231	131	97	4	2
POTIERS	579	426	244	175	1	1
REIMS	3503	1910	1752	1189	6	6
RENNES	1325	839	1337	850	4	4
ROUEN	3980	2297	3980	2297	56	17
STRASBOURG	883	645	285	210	1	1
TOULOUSE	1929	1374	1929	1374	31	19
TOURS	851	620	288	251	1	1
VALENCIENNES	764	630	479	406	1	1
<b>TOTAL ND : non déterminé</b>	37491	23680	24570	16141	298	195
Biocéane	3172		3172		38	38
axalab Laboratoire	17186	8764	17186	8764	149	124
LABM Chatelain	16584		16584		125	
up Alsace société	13156	7996	13156	7996	86	61
Biopath	7609	4284	7609	4284	124	76
Biorylis	2969		2969		38	27
ANS BIOGROUP	25651	13688	26159	13665	302	207
SCHUIH	12322	4244	12322	4244	143	143
<b>TOTAL ND:non déterminé</b>	98649	38976	99157	38953	1005	676
	60676					
<b>TOTAL ND:non déterminé</b>	136140	62656	123727	55094	1303	871
aborizon renne	6075		6075		80	
Biomnis			407	363	15	14
Ste Anne To	137	98	30	30	0	
		62656	130209	55457	1398	885
CH + LABM	142352	62754	130239	55487	1398	885
Total LABM	98649	38976	99157	38953	1005	676
Total CH + HIA	37628	23778	25007	16534	313	209

Figure 1 Bilan des analyses et cas de cryptosporidioses diagnostiquées par les membres du Réseau en 2022

La Figure 2 ci-dessous représente la distribution géographique et l'origine (public ou privé) des échantillons reçus par le CNR-LE et son centre collaborateur en 2022 :

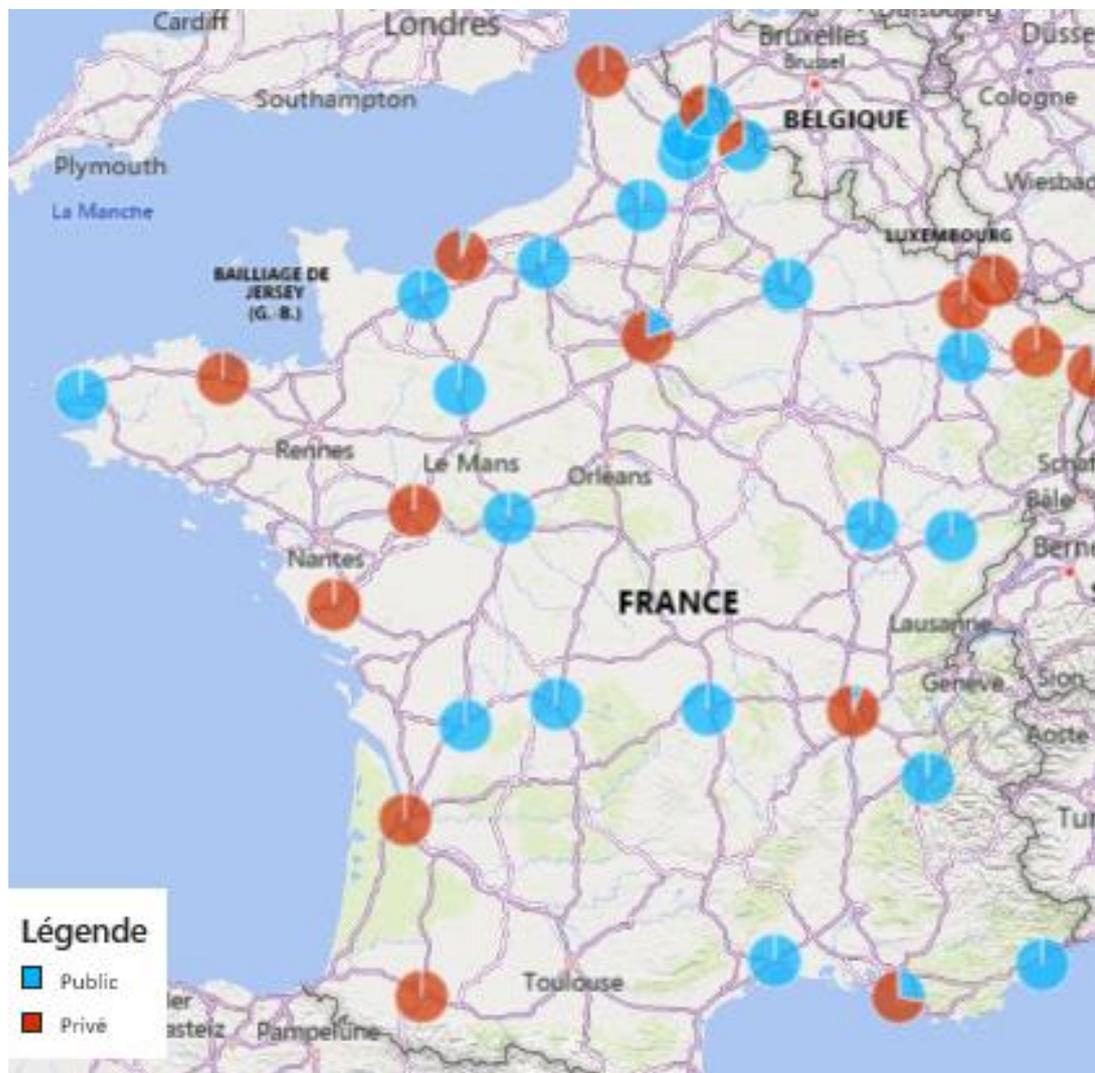
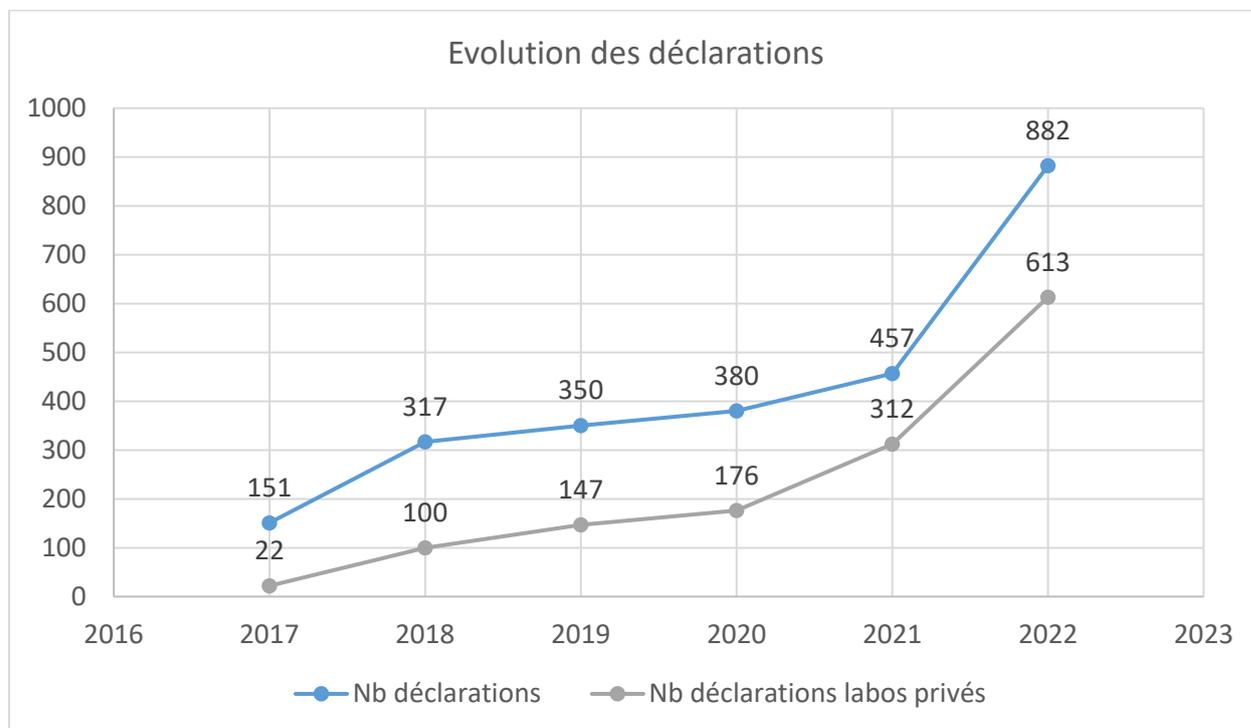


Figure 2 Provenance géographique et provenance des échantillons reçus par le CNR-LE et le centre collaborateur en 2022 (sauf épidémie).

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

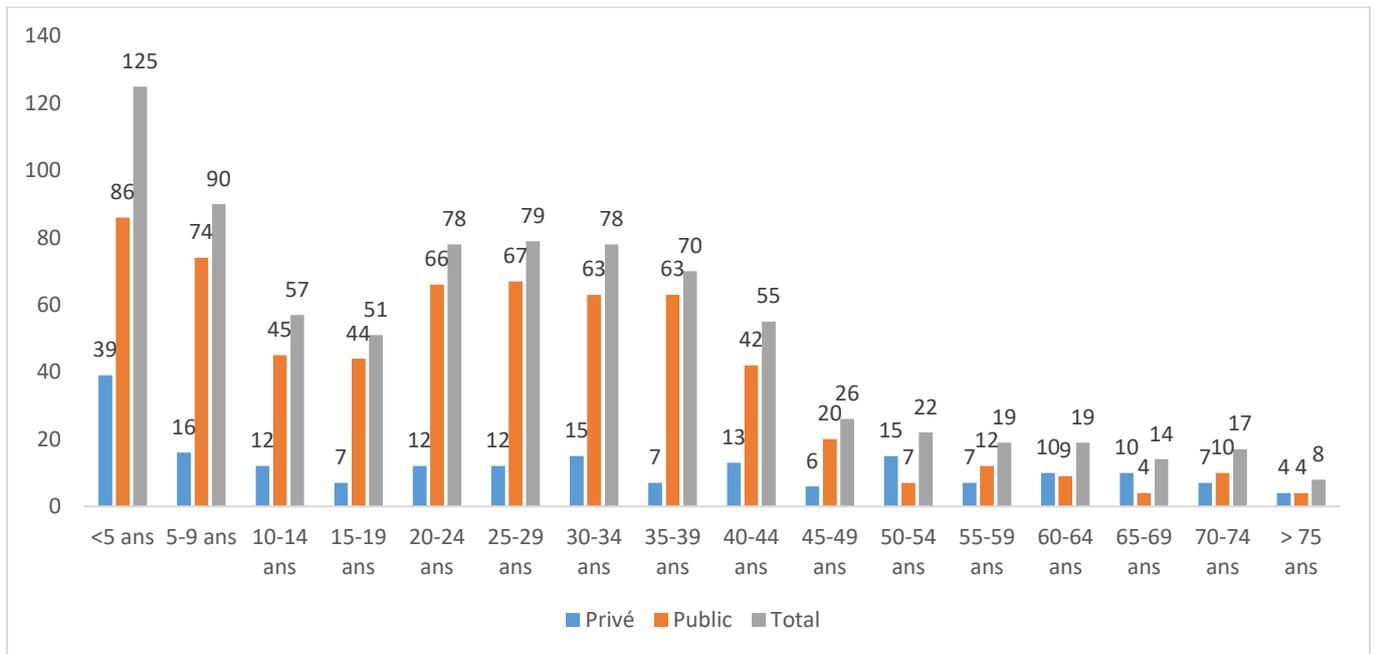
L'évolution des déclarations en ligne des cas depuis 2017 est présentée dans la Figure 3. On note un bond des déclarations en ligne, en particulier en provenance des laboratoires privés se dotant de plus en plus d'outils de biologie moléculaire pour le diagnostic de la cryptosporidiose.



**Figure 3** Évolution des déclarations en ligne des cas de cryptosporidiose en France depuis 2017.

### 1.1.1 Distribution par âge

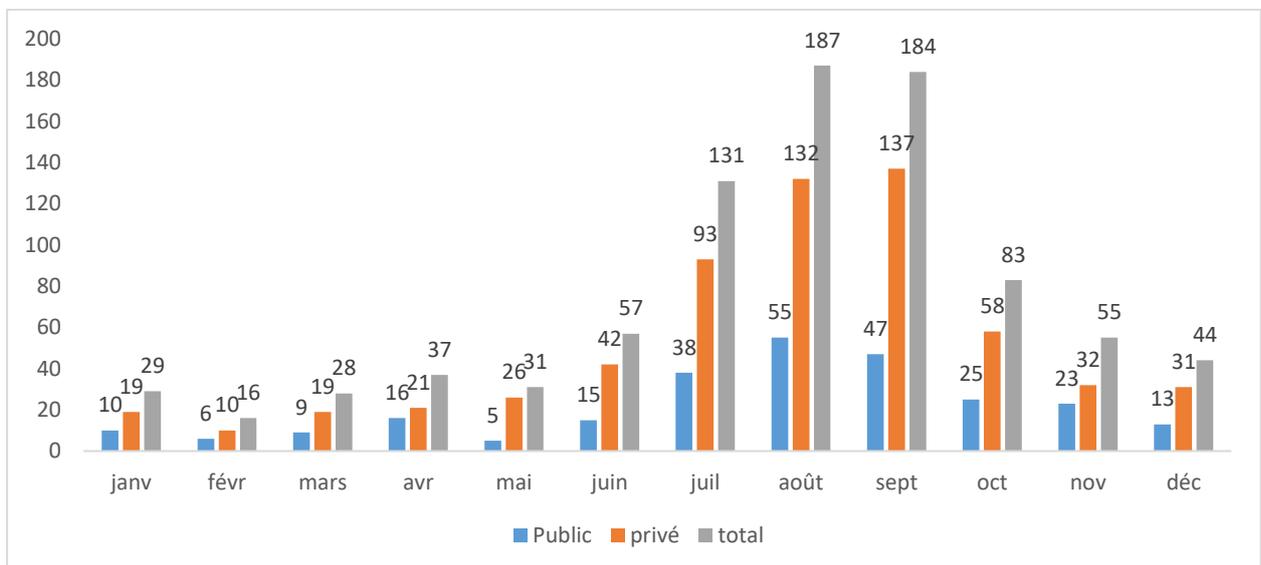
En 2022, comme les années précédentes, les données montrent que les populations les plus touchées par la cryptosporidiose en France sont les jeunes enfants (< 5 ans) et les jeunes adultes (20 à 39 ans) (Figure 4).



**Figure 4 Distribution des cas de cryptosporidiose en France par classe d'âge en 2022.**

Le sex ratio global reste de 1 avec autant d'hommes que de femmes concernés par cette parasitose.

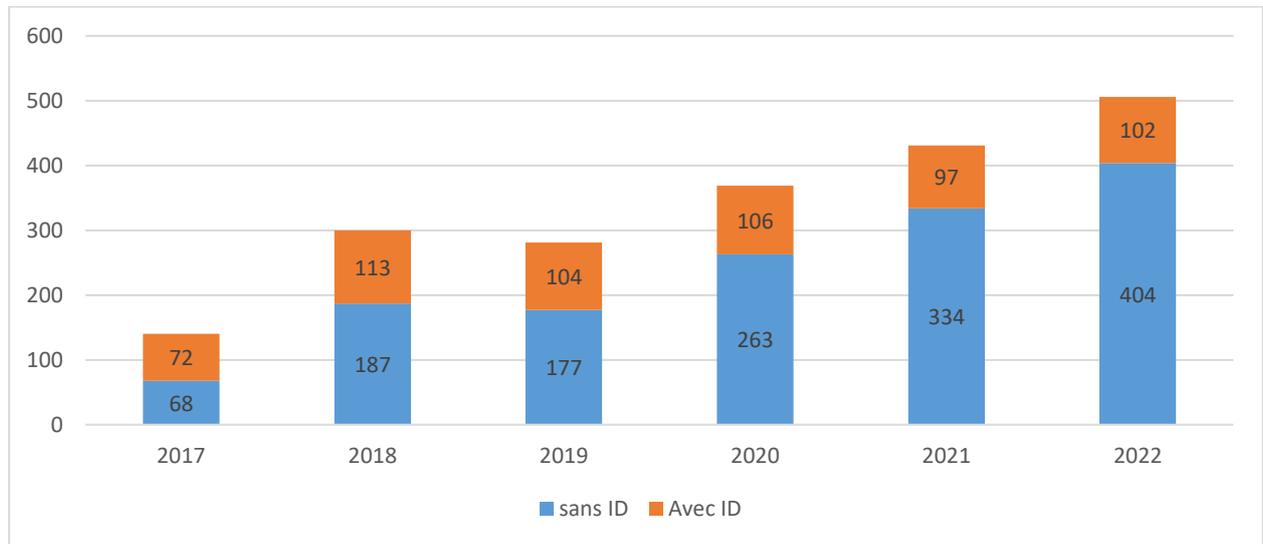
La saisonnalité des cas est en faveur d'un pic estival en 2022 comme c'était le cas les années précédentes (Figure 5).



**Figure 5 Distribution des cas de cryptosporidiose selon la saisonnalité en 2022.**

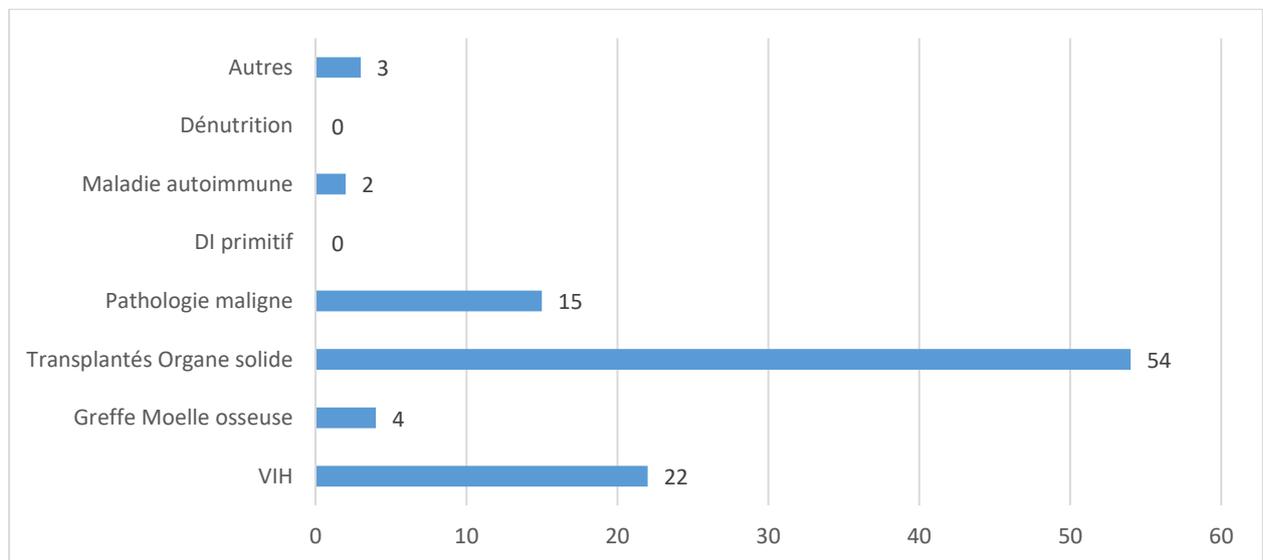
Concernant le statut immunitaire, depuis 2017, une augmentation progressive des cas chez les immunocompétents a été observée (Figure 6). Cependant, il s'agit d'un biais de déclaration car de plus en plus de déclarations sont faites par les laboratoires privés ayant une franche dominance de patients immunocompétents. Cependant, nous pouvons donc affirmer

qu'aujourd'hui la cryptosporidiose en France concerne d'avantage les immunocompétents que les immunodéprimés (la cryptosporidiose des sujets immunocompétents restant néanmoins encore largement sous-estimée).



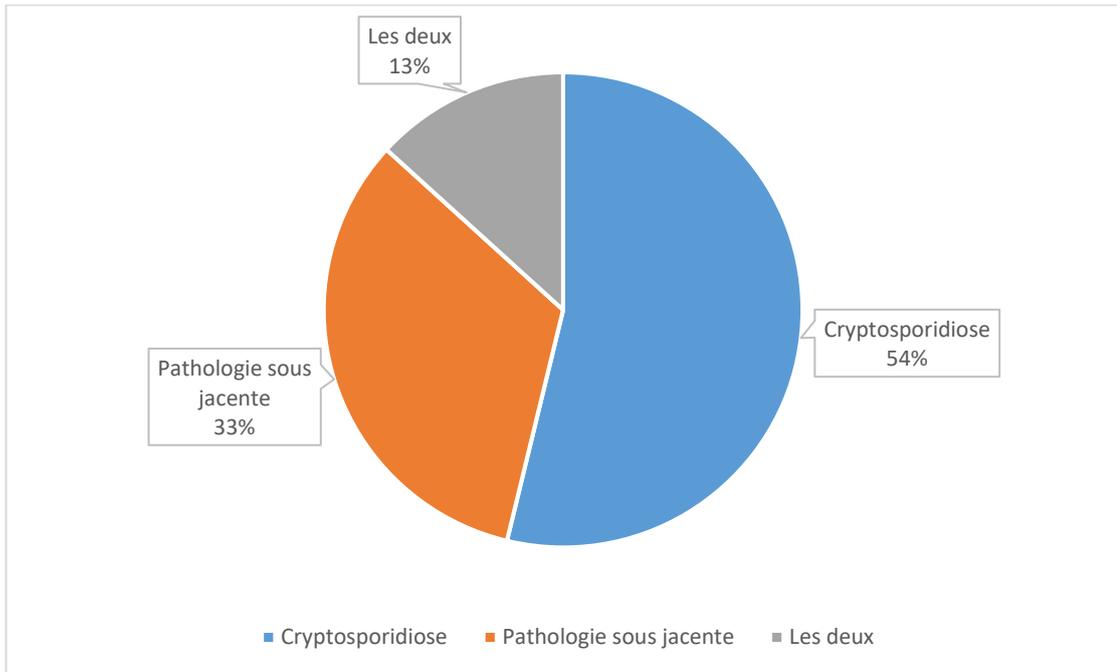
**Figure 6 Répartition des cas de cryptosporidiose depuis 2017 selon le statut immunitaire. (ID : Immunodépression)**

En 2022, comme les années précédentes, les causes d'immunodépression des patients atteints de cryptosporidiose restaient par ordre de fréquence : la transplantation d'organes solides, l'infection par le VIH, les pathologies malignes et la greffe de moelle osseuse (Figure 7).



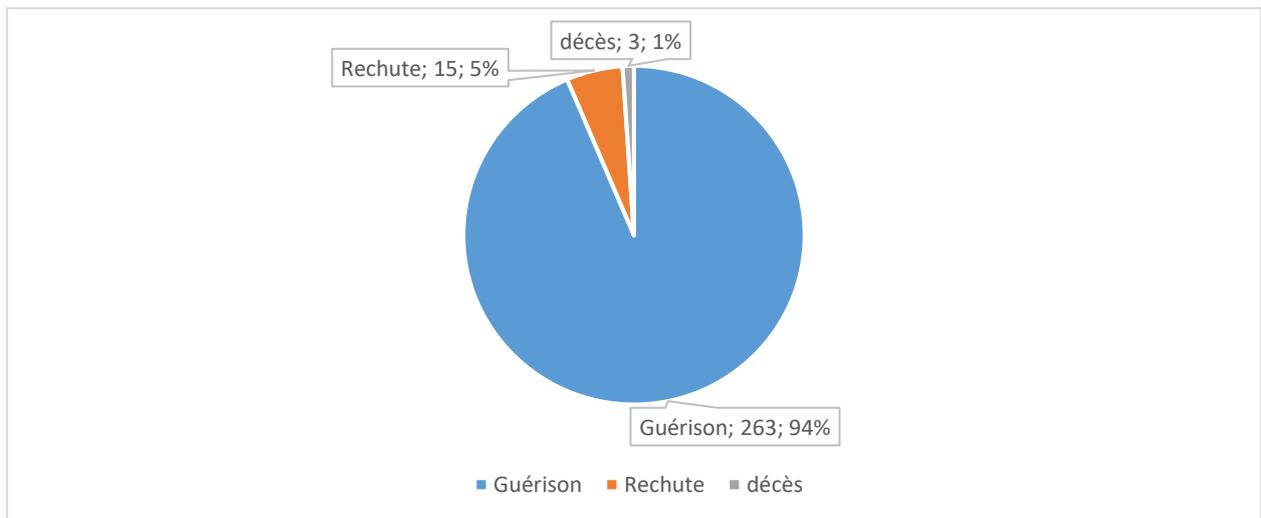
**Figure 7 Pathologie expliquant l'immunodépression des patients atteints de cryptosporidiose en 2022.**

En 2022, les données relatives à l'hospitalisation ont révélé que 73 % des patients atteints de cryptosporidiose n'étaient pas hospitalisés contre 27 % d'hospitalisation. Les motifs sont présentés en Figure 8.



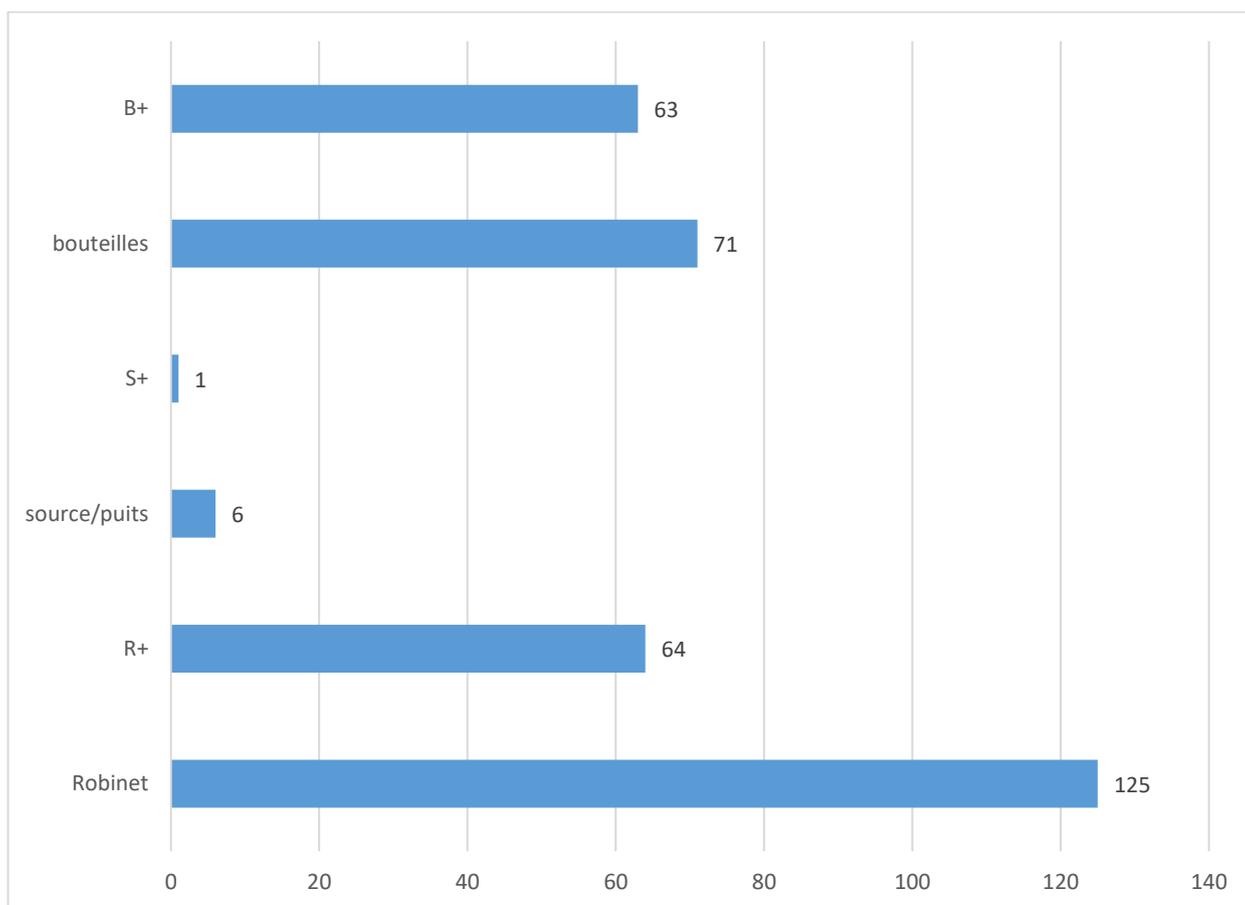
**Figure 8 Motif d'hospitalisation des patients atteints de cryptosporidiose en 2022.**

Concernant l'évolution des cas, les données en 2022 ont rapporté 3 décès soit 1% des cas déclarés (Figure 9).



**Figure 9 Évolution des cas de cryptosporidiose en France en 2022.**

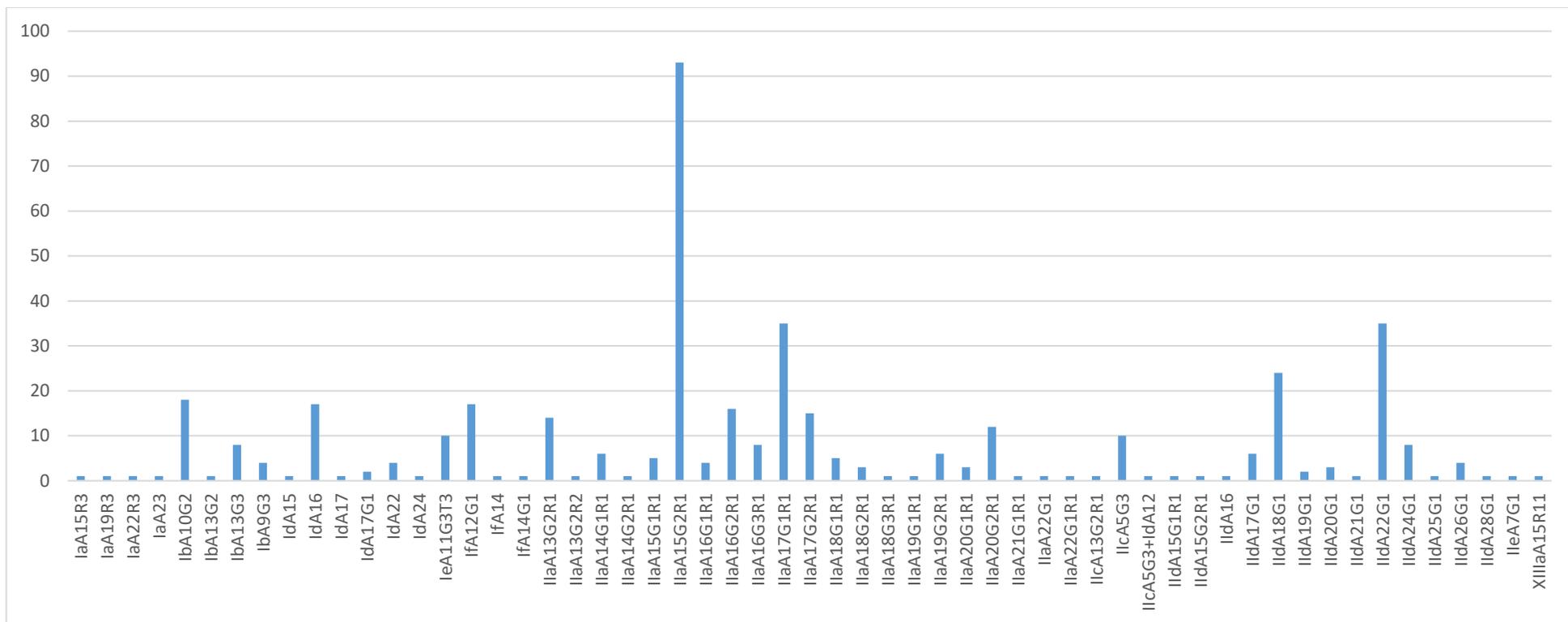
Concernant les causes potentielles de l'infection en 2022 : 26% des patients étaient en contact avec une personne souffrant de troubles digestifs (dont 89% au sein de la famille). La consommation d'eau parmi les cas notifiés est présentée en figure 10. L'exposition à l'eau de baignade a été retrouvée dans 45% des cas notifiés (principalement en piscines >41% des cas). Le contact direct avec des animaux potentiellement contaminés a été retrouvé dans 62% des cas. Et concernant l'exposition alimentaire, la consommation de cidre a été rapportée dans 3% des cas, la consommation de coquillages dans 18% et la consommation de lait cru dans 17%.



**Figure 10** Consommation d'eau parmi les cas notifiés de cryptosporidiose en 2022. (N=266) (B : Baignade, S : Source, R : Robinet, + : en combinaison avec au moins une autre origine).

Concernant les espèces isolées des échantillons reçus : *C. parvum* a été observé en 2022 dans 79% des cas, suivi de *C. hominis* (21% des cas) et des espèces rares (<1% des cas).

Concernant les sous-types de *Cryptosporidium* spp., le génotype IIaA15G2R1 reste de loin le sous-type majoritairement détecté chez *C. parvum*, suivi des sous-types IIaA17G1R1 et IIaA22G1. Pour l'espèce *C. hominis*, les sous-types IbA10G2 et IdA16 étaient majoritaires (Figure 11).



**Figure 11** Génotypes gp60 des isolats de *Cryptosporidium* adressés et déclarés au CNR-LE en 2022.

### 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

Depuis 2017, les échanges avec Santé publique France sont pluriannuels selon les investigations à réaliser en cas de suspicion d'épidémie de cryptosporidiose. Ils ont d'ores et déjà permis d'investiguer plus d'une douzaine d'épidémies en France. Toujours dans le cadre des investigations d'épidémies éventuelles, le CNR-LE assure depuis 2017, une veille hebdomadaire des cas de diarrhées aiguës grâce aux données du réseau sentinelles.

Depuis 2017, une collaboration étroite a été entreprise avec le LNR de Maison Alfort (Dr Vallée, Dr Polack) à l'occasion de réunions multiples 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 de plusieurs épidémies avec échanges d'isolats et avec des collaborations à l'occasion de divers projets de recherche.

Depuis 2018, chaque année, des contrôles de qualité inter-laboratoire pour la caractérisation génétique des isolats sont réalisés au niveau national et très appréciés par les membres du réseau.

En 2022, la collaboration étroite avec le laboratoire de référence européen de Swansea a continué avec échange de 5 isolats pour investigation.

En 2022, le congrès national conjoint des sociétés Françaises de Parasitologie (SFP) et de Mycologie Médicale (SFMM) a été organisé à Rouen par les membres du CNR-LE. Le congrès a bénéficié d'un taux de participation record depuis la pandémie et les échanges ont été très appréciés, de grande qualité scientifique et vecteurs de nombreuses collaborations.

### 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, le CNR-LE a mis en évidence une fréquence élevée de portage asymptomatique de *Cryptosporidium spp.* à potentiel zoonotique dont de nombreux isolats de *C. hominis*.

Suite à un transfert de technologie avec un chercheur d'origine Ethiopienne venu se former au sein du CNR-LE (avant la période de pandémie), une étude sur la diversité des sous-types de *Cryptosporidium* species isolés chez des primates en Ethiopie et le risque de transmission anthro-zoonotique a été publiée en 2022. (Hailu et al.)

Afin de documenter la circulation anthro-zoonotique des souches de *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement hydrique en contexte karstique et selon les épisodes climatiques, une enquête a été réalisée par le CNR-LE dans le bassin Grassois en collaboration avec des hydrogéologues. Les données sont en cours de rédaction pour publication.

Dans le cadre d'un projet collaboratif transdisciplinaire visant entre autres à caractériser la prévalence de certaines infections bovines, le CNR-LE a participé à la détermination de la prévalence de la cryptosporidiose chez les animaux de l'étude. Il a ainsi été démontré qu'avec une prévalence de 77% chez les animaux symptomatiques et de 53% chez les asymptomatiques, la cryptosporidiose était la plus prévalente des pathologies infectieuses investiguées dans l'étude. Il en résulte une contamination environnementale forte pouvant être à risque pour la santé humaine. Il a également pu être démontré que la transmission n'était pas verticale entre vaches et veaux. Ces résultats ont été présentés oralement au congrès des 3 R en 2022 et sont en cours de rédaction pour publication.

En 2022, le CNR-LE a débuté des travaux visant à évaluer le risque de contamination par *Cryptosporidium* spp. de la matrice laitière en élevages lorsque les animaux sont infectés. Le projet consiste à confronter les données des pratiques d'élevage avec les données parasitaires obtenues à partir des selles des animaux malades et des laits prélevés dans les exploitations correspondantes. Ces travaux donneront lieu à publication à la fin de l'étude (3 ans).

## 4. Alertes

---

- 1) En Août 2022, grâce au génotypage Sanger systématique des isolats, le CNR-LE a détecté une petite épidémie familiale (2 cas) à *C. parvum* IlaA15G2R1 dans la région de Metz.
- 2) Également en Août 2022, 2 selles ont été reçues en provenance du CHU d'Amiens pour investigation d'épidémie ayant été infirmée par la détection d'une selle négative et d'une selle positive à *C. parvum* IlaA18G1R1.
- 3) En mars 2022, 3 enfants emmenés par leurs grands-parents visiter une chèvrerie dans le département de l'Ain ont déclarés des diarrhées et l'un des petits enfants de la fermière a également eu la diarrhée. Parmi ces enfants, un a été hospitalisé. Le CNR-LE laboratoire collaborateur n'a malheureusement reçu qu'un seul échantillon pour cette épidémie. Le génotype identifié correspondant était un *C. parvum* Ila A15 G2 R1). L'enfant s'est vraisemblablement contaminée en faisant des calins aux petits cabris ou en buvant du lait de chèvre cru. L'information remontée à Santé Publique France a été transmise à la MUS et à la ddpp de l'Ain, département où était l'exploitation.

## 5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

---

### 5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

En raison du contexte sanitaire, les formations des professionnels de santé sur site n'ont pas été reprises en 2022.

En 2022, comme chaque année depuis 2017, lors de l'assemblée générale du CNR, les présentations orales scientifiques ayant été données ont permis de nombreux échanges et formation/information des participants.

*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 de l'association Anofel (Association Française des Enseignants & Praticiens Hospitaliers titulaires de Parasitologie & Mycologie Médicale) Masson éditeur, pour les chapitres suivants :
  - o Examen parasitologique des selles : examen direct, concentration des parasites, examen parasitologique standard des selles (D. Leméteil)
  - o Coccidioses intestinales (G. Gargala – S. Valot)
  - o Autres protozooses intestinales (S. Valot)

Le Pr L. Favennec et le Dr D. Costa ont été sollicités pour la révision d'un chapitre du REMIC sur les protozooses intestinales et microsporidioses paru en 2022.

Enfin, le Dr D. Costa pour la rédaction d'un Chapitre Cryptosporidiose dans Molecular Detection of Foodborne Pathogens 2nd edition.

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.

En 2022, chaque année depuis 2017, le CNR-LE a proposé un contrôle de qualité inter-laboratoire (CIL) aux laboratoires participants. Cinq échantillons ont été adressés à chaque laboratoire pour analyse : 3 destinés à l'examen microscopique et/ou à la recherche d'antigène et/ou à la recherche par PCR et 2 à la détection par PCR uniquement. Les résultats ont été présentés en assemblée générale du CNR-LE aux membres du réseau et ont permis d'aboutir à des recommandations techniques.

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.

Le site internet du CNR-LE a permis 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.

Grâce à la communication aux professionnels de Santé du numéro de téléphone, d'une adresse mail générique 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

En cas de suspicion d'épidémie ou d'investigations d'épidémies avérées, de nombreux échanges ont lieu chaque année entre les membres du CNR-LE et les autorités de santé (SpF, ARS...).

En 2022, plusieurs échanges ont eu lieu avec Santé publique France pour les suspicions d'épidémies et la gestion des épidémies familiales.

## 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.

En parallèle, en 2022, D. Costa du CNR-LE a été responsable d'un stand à la fête de la Science de Rouen ayant permis de nombreux échanges avec le grand public.

De plus, D. Costa est en étroite collaboration avec un ancien interne rouennais s'étant spécialisé dans la communication au grand public sur les réseaux sociaux et désormais sur France 5. D. Costa assure la validation scientifique du script de cet ancien interne avant diffusion sur les thématiques de sa spécialité.

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

---

### 6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

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

L'étude sur la circulation des oocystes de *Cryptosporidium* spp. dans l'environnement hydrique dans le bassin Grassois est terminée et une publication est en cours de rédaction par le CNR-LE. L'objectif du projet était 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.

#### 2/ Étude 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 de réalisation par le CNR-LE 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.

#### 3/ 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.

#### 4/ Étude des protocoles de biologie moléculaire pour la détection de *Cryptosporidium parvum* dans des échantillons de selles

Dans des études antérieures réalisées par le laboratoire collaborateur du CNR-LE, il a été montré que les performances de détection des espèces de *Cryptosporidium* spp. par biologie moléculaire dans des échantillons de selles variaient en fonction des protocoles utilisés à chaque étape du processus, notamment : (i) l'étape de prétraitement (c'est-à-dire la lyse chimique et/ou mécanique), (ii) l'étape d'extraction (manuelle ou automatisée) et (iii) l'étape d'amplification (interne ou commerciale, simplex ou multiplex). En 2022, le laboratoire collaborateur a complété ces travaux par l'évaluation des performances de ces nouveaux outils moléculaires en considérant les 3 étapes du processus en même temps. Ainsi, 30 combinaisons de protocoles ont été testées, y compris : (i) 3 techniques de prétraitement différentes, (ii) quatre méthodes d'extraction (dont deux manuelles et deux automatisées) et (iii) six méthodes d'amplification (dont une PCR simplexe maison et cinq PCR multiplexes commerciales de PCR multiplex). Les performances des combinaisons de protocoles ont été évaluées en termes de limite de détection (c'est-à-dire le nombre d'oocystes de *Cryptosporidium parvum*/mL détectés). Ces données ont permis de montrer l'importance de considérer toutes les étapes des outils moléculaires pour le diagnostic de la cryptosporidiose. (Bailly et al. 2024, en preparation).

5/ Etude PPG3 : Ce projet, financé par la région Bourgogne-Franche Comté, est réalisé par le centre collaborateur de Dijon en collaboration avec l'UMR 6249 Chrono-Environnement (Besançon). Ce projet vise au développement et à la systématisation des analyses paléogénétiques appliquées à la paléoparasitologie et plus précisément à *Cryptosporidium* spp. Notre implication dans ce projet vise à optimiser des protocoles d'extraction d'ADN de *Cryptosporidium* sp. potentiellement présent dans des matrices complexes humaines et environnementales (Terre, boues, eau, selles anciennes ...). L'objectif est d'extraire des ADNs d'une qualité suffisante pour permettre des investigations moléculaire par NGS. Ces travaux font ainsi partie des objectifs du laboratoire collaborateur de développement d'outils de caractérisation moléculaire des protozooses digestives par NGS.

## 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

### *Publications nationales*

#### Chapitre d'ouvrage

D. Costa et L. Favennec

Protozooses intestinales et microsporidioses – Rémic 2022

### *Publications internationales*

PI 1 Cryptosporidiosis outbreaks linked to the public water supply in a military camp, France. Watier-Grillot S, **Costa D**, Petit C, **Razakandrainibe R**, Larréché S, Tong C, Demont G, Biletorte D, Mouly D, Fontan D, Velut G, Le Corre A, Beauvir JC, Mérens A, **Favennec L**, Pommier de Santi V. PLoS Negl Trop Dis. 2022

PI 2 Evaluation of Next-Generation Sequencing Applied to *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. **Bailey E**, **Valot S**, Vincent A, Duffourd Y, Grangier N, Chevarin M, **Costa D**, **Razakandrainibe R**, **Favennec L**, **Basmaciyan L**, **Dalle F**. Pathogens. 2022.

PI 3 A summary of cryptosporidiosis outbreaks reported in France and overseas departments, 2017-2020. **Costa D**, **Razakandrainibe R**, **Basmaciyan L**, Raibaut J, Delaunay P, Morio F, **Gargala G**, Villier V, Mouhajir A, Levy B, Rieder C, Larreche S, Lesthelle S, Coron N, Menu E, Demar M, de Santi VP, Blanc V, **Valot S**, **Dalle F**, **Favennec L**. Food Waterborne Parasitol. 2022.

PI 4 Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in non-human primates in rural and urban areas of Ethiopia. Hailu AW, Degarege A, Petros B, **Costa D**, Ayene YY, Villier VC, Mouhajir A, **Favennec L**, **Razakandrainibe R**, Adamu H. PLoS One. 2022.

PI 5 Cryptosporidiosis outbreak in Amazonia, French Guiana, 2018. Menu E, Mosnier E, Cotrel A, **Favennec L**, **Razakandrainibe R**, **Valot S**, Blanchet D, **Dalle F**, **Costa D**, Gaillet M, Demar M, de Laval F. PLoS Negl Trop Dis. 2022.

PI 6 'Seven shades of *Cryptosporidium*'. Crestia J, **Razakandrainibe R**, **Costa D**, Damiani C, Totet A, **Le Govic Y**. Clin Microbiol Infect. 2022.

PI 7 Selecting a multiplex PCR panel for accurate molecular diagnosis of intestinal protists: a comparative study of Allplex<sup>®</sup> (Seegene<sup>®</sup>), G-DiaParaTrio (Diagenode<sup>®</sup>), and RIDA<sup>®</sup>GENE (R-Biopharm<sup>®</sup>) assays and microscopic examination. **Argy N**, **Nourrisson C**, Aboubacar A, **Poirier P**, **Valot S**, Laude A, **Desoubieux G**, Pomares C, Machouart M, **Le Govic Y**, **Dalle F**, **Botterel F**, Bourgeois N, **Cateau E**, Leterrier M, **Le Pape P**, **Morio F**, **Houze S**. Parasite. 2022.

PI 8 Evaluation of real-time qPCR-based methods to detect the DNA of the three protozoan parasites *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii* in the tissue and hemolymph of blue mussels (*M. edulis*). Cazeaux C, Lalle M, Durand L, **Aubert D**, **Favennec L**, Dubey JP, Geffard A, **Villena I**, La Carbona S. Food Microbiol. 2022.

PI 9 The Novodiag® Stool parasites assay, an innovative high-plex technique for fast detection of protozoa, helminths and microsporidia in stool samples: a retrospective and prospective study. **Hartuis S**, Lavergne RA, **Nourrisson C**, Verweij J, **Desoubeaux G**, Lussac-Sorton F, Lemoine JP, **Cateau E**, Jeddi F, **Poirier P**, **Le Pape P**, **Morio F**. Parasite. 2022;29:27.

#### *Communications internationales*

CI 1 Evaluation of Next-Generation Sequencing Applied to *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* Epidemiological Study. **E Bailly**, **S Valot**, A Vincent, Y Duffourd, N Grangier, M Chevarin, **D Costa**, **R Razakandrainibe**, **L Favennec**, **L Basmaciyan**, **F Dalle**. ICOPA 2022, Copenhagen, Août, 2022. Communication orale

#### *Communications nationales*

CN 1 Interactions amibes libres et *C. parvum*. Séminaire de la société française de microbiologie. Lefebvre M, **Razakandrainibe R**, Schapman D, François A, Genty D, Galas L, **Villena I**, **Favennec L**, **Costa D**. Webinar de la section des jeunes microbiologistes. 2022.

CN 2 Interactions entre *C. parvum* et amibes libres. Lefebvre M, **Razakandrainibe R**, Schapman D, François A, Genty D, Galas L, **Villena I**, **Favennec L**, **Costa D**. SFP-SFMM 2022. Rouen.

CN 3 Interactions between free living amoebae and *Cryptosporidium parvum* oocysts in both planktonic and biofilm conditions. Lefebvre M, **Razakandrainibe R**, Schapman D, François A, Genty D, Galas L, **Villena I**, **Favennec L**, **Costa D**. JNRB. 2022. Rouen

CN 4 Evaluation des performances de couples de méthodes extraction/Amplification pour la détection de *Cryptosporidium parvum* dans des échantillons de selles). **Basmaciyan L**. AG CNR Cryptosporidioses, Paris, 2022. Communication orale

CN 5 Evaluation of the performance of 30 Extraction/Amplification combinations for the detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. **E Bailly**, C Baranton, **S Valot**, **A Vincent**, C Béclère, **D Costa**, **R Razakandrainibe**, **L Favennec**, **L Basmaciyan** and **F Dalle**. SFP-SFMM, Rouen, Juin 2022. Communication écrite

CN 6 Présentation des résultats de coprologie parasitaire des membres du réseau du CNR de l'année 2022. **Favennec L**. AG CNR Cryptosporidioses, Paris, 2022. Communication orale

CN 7 Bilan épidémiologique des cryptosporidioses pour la mandature 2017-2021 du CNR-LE. **Costa D**. AG CNR Cryptosporidioses, Paris, 2022. Communication orale

CN 8 Bilan des contrôles inter-laboratoires pour la recherche de *Cryptosporidium* spp. depuis 2018. **Costa D.** AG CNR Cryptosporidioses, Paris, 2022. Communication orale

*Publications des laboratoires participant au réseau*

Putative SET-domain methyltransferases in *Cryptosporidium parvum* and histone methylation during infection. SAWANT M, BENAMROUZ-VANNESTE S, MELONI D, GANTOIS N, EVEN G, GUYOT K, CREUSY C, DUVAL E, WINTJENS R, WEITZMAN JB, CHABE M, VISCOGLIOSI E, CERTAD G. Virulence. 2022.

Protozoan Parasites and Leafy Greens in Marrakech: Study of Occurrence Using a Molecular Method. Berrouch S, Escotte-Binet S, Madline A, Aubert D, Nast E, La Carbona S, Hoummadi L, Hafid J, Villena I. Acta Parasitol. 2022.

Blue mussel (*Mytilus edulis*)-A bioindicator of marine water contamination by protozoa: Laboratory and in situ approaches. Bigot-Clivot A, La Carbona S, Cazeaux C, Durand L, Géba E, Le Foll F, Xuereb B, Chalghmi H, Dubey JP, Bastien F, Bonnard I, Palos Ladeiro M, Escotte-Binet S, Aubert D, Villena I, Geffard A. J Appl Microbiol. 2022 Jan.

**Conférences sur invitation**

**FAVENNEC L**

Examen parasitologique des selles par PCR.

Actualités en microbiologie clinique, Paris, mai 2022.

La cryptosporidiose humaine : épidémiologie, diagnostic et traitement.

Académie vétérinaire, maison Alfort, décembre 2022.

## 7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, 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* dans les environnements et comparaison des souches humaines, animales et environnementales.

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

---

De nombreux changements et projets seront développés du fait de l'évolution du CNR-LE sur la mandature 2023-2027 en CNR Cryptosporidioses, microsporidies et autres protozooses digestives (CMAP) incluant le centre coordinateur de Rouen et les centres associés de Clermont Ferrand et de Dijon.

En raison du contexte sanitaire exceptionnel, la réactivité de certains membres du réseau a diminué depuis 2020. Dans le cadre de l'évolution du CNR-LE sur la mandature 2023-2027, l'un des objectifs du CNR CMAP visera à retrouver une participation dynamique, active et prospective de l'ensemble des membres du réseau voire d'augmenter le nombre de laboratoires partenaires du réseau.

La structuration du CNR CMAP sera définie pour répondre aux nouveaux parasites du champ du CNR pour la mandature 2023-2027.

Les travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees seront poursuivis en particulier via la création d'un groupe de travail dédié dans la nouvelle mandature du CNR CMAP.

Il est envisagé d'améliorer les prestations de conseils via le développement d'un groupe de travail dédié.

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 CMAP, en lien avec ses missions :

Dans le cadre de la mandature 2023-2027 de nombreux changements impacteront le CNR-LE devenant CNR CMAP regroupant le centre coordonnateur de Rouen et les centres associés de Dijon et de Clermont-Ferrand.

Plusieurs groupes de travail seront développés comme celui sur l'évaluation des méthodes diagnostic pour lequel plusieurs travaux d'évaluation des kits commerciaux impliquant l'ensemble des parasites du champ du CNR CMAP sont prévus ou encore un groupe de travail sur *Giardia duodenalis* et un autre sur les conseils thérapeutiques.

- 1/ Evaluation marquage CE-IVD ELITE InGenius®

L'évaluation de la nouvelle procédure et marquage CE/IVD pour l'automate ELITE InGenius® de la société ELITechGroup est initiée et sera réalisée par les trois centres du CNR CMAP. Cette évaluation donnera lieu à différentes communications scientifiques.

- Evaluation de nouveaux kits de biologie moléculaire pour la détection de parasites digestifs dans des échantillons de selles.

Le CNR CMAP a d'ores et déjà été sollicité par la société Biomérieux en tant qu'expert pour le développement d'un nouvel automate pour la détection de parasites digestifs dans des échantillons de selles. S'en suivra l'évaluation de ces nouveaux kits Biomérieux par le CNR CMAP. En parallèle, la société Biocentric c'est rapproché du CNR CMAP pour l'évaluation de son automate FluoroCycler® XT pour évaluer son panel gastro-intestinal utilisant une technologie Liquid Array. Ces travaux d'expertises donneront lieu à différentes communications scientifiques.

- Travaux en lien avec les groupes de travail

Le CNR CMAP propose différents groupes de travail, constitués de membres du CNR et de membres du réseau de déclaration. Ces groupes de travail auront pour mission de réaliser différents travaux de recherche pour l'optimisation des matrices d'extractions (swab, selles natives), l'optimisation des méthodes de pré-traitement sur matrices et l'évaluation des couples extractions/amplifications, appliqué à l'ensemble des parasites digestifs entrant dans le champ d'expertise du CNR CMAP.

# 1. 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 évènement inhabituel (épidémies...). Enfin, il doit gérer la collection d'échantillon biologique et la base de données.

## 1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

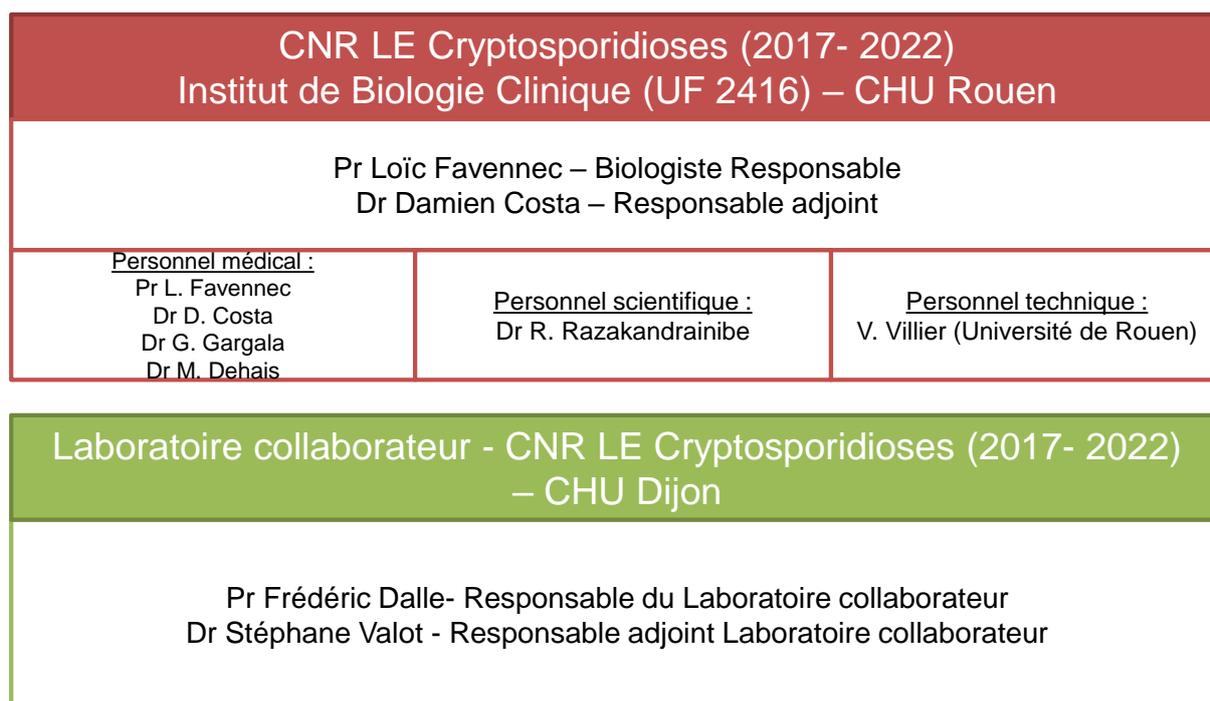


Figure 12 Organigramme du CNR-LE mandature 2017-2022.

### **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, 0.2 ETP*

*Responsable adjoint du laboratoire collaborateur : Dr. S Valot 0.5 ETP*

*Biologistes : Dr L. Basmaciyani, 0.2 ETP Dr M. Sautour, 0.1 ETP*

## **1.3 Locaux et équipements**

### 1. Les locaux

#### **Locaux et équipements du Laboratoire collaborateur du CNR-LE de Dijon**

Le Laboratoire collaborateur du CNR - LE Cryptosporidioses est intégré dans les locaux du service de Microbiologie – Agents transmissibles, au sein du laboratoire de parasitologie et mycologie, situés au 1er étage du Plateau Technique de Biologie, bâtiment unique regroupant l'ensemble des laboratoires de biologie et pathologie du CHU de Dijon ainsi que l'EFS Bourgogne-Franche Comté.

La surface totale dédiée à l'activité du laboratoire de Parasitologie et Mycologie est d'environ 380 m<sup>2</sup>. La réception des prélèvements est centralisée pour tous les laboratoires du PTB et se situent au rez-de-chaussée, de même que les salles de réunion.

Les surfaces dédiées au laboratoire de parasitologie et mycologie sont représentées en rouge sur le plan de la figure 2 et se décomposent ainsi : (Les pièces techniques sont en pression négative) :

- Bureaux biologistes : 5 bureaux soit 50 m<sup>2</sup>.
- Pièce pour la réception et l'enregistrement des prélèvements : 11 m<sup>2</sup>.
- Espace dédié aux techniques de parasitologie : 1 pièce de 47 m<sup>2</sup>.
- Espace technique dédié à la mycologie : 2 pièces soit 104 m<sup>2</sup>.
- Espace technique dédié aux techniques de sérologies parasitaires et fongiques : 2 pièces soit 53 m<sup>2</sup>.
- Locaux dédiés aux techniques de biologie moléculaire dont certaines pièces sont communes aux laboratoires du service de Microbiologie – Agents transmissibles :
  - Pièces Pré PCR : préparation des mélanges réactionnels (20 m<sup>2</sup>), extraction (40 m<sup>2</sup>).
  - Pièces pour thermocycleurs (13 m<sup>2</sup>).
  - Pièces post-PCR (18 m<sup>2</sup>).
- Deux pièces dédiées aux protocoles de recherche et aux développements : 25 m<sup>2</sup>.

Les pièces qui seront dédiées à l'activité du Laboratoire collaborateur sont indiquées en rouge sur le plan du laboratoire.

- Autres locaux disponibles :
  - Laboratoire L3 : 30 m<sup>2</sup>
  - Une pièce de préparation et une pièce d'analyse environ 30 m<sup>2</sup>.
  - Secrétariat et espaces techniques (laverie, stockages, chambre froide) communs aux laboratoires du service de Microbiologie – Agents Transmissibles.

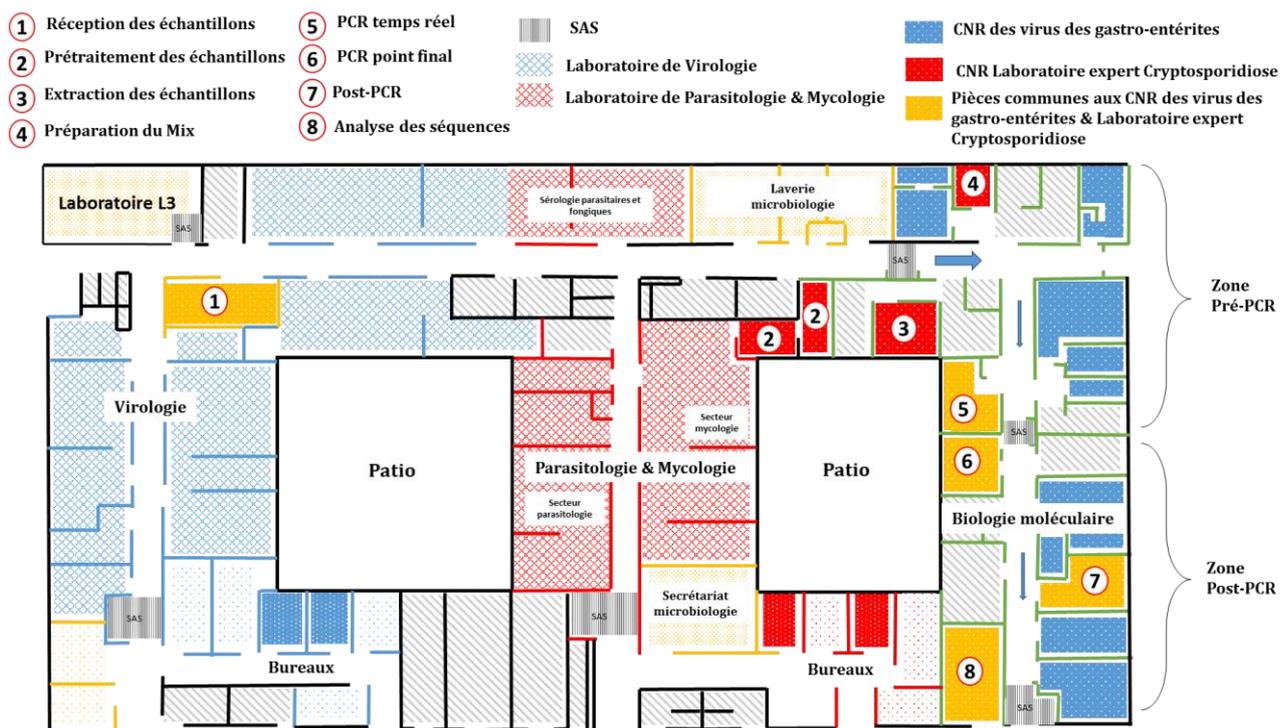


Figure 13: Plan du laboratoire de parasitologie et mycologie et place des activités liées au Laboratoire Collaborateur du CNR Laboratoire expert « Cryptosporidioses » et au CNR des virus des gastro-entérites.

Dans la zone biologie moléculaire microbiologie, le laboratoire collaborateur disposera de pièces communes avec les autres activités du laboratoire de Parasitologie et Mycologie : les pièces pré-PCR (3 et 4), les pièces des thermocycleurs (5,6) et les pièces post-PCR (7,8). Le CNR- Laboratoire expert Cryptosporidioses disposera également de deux pièces dédiées aux protocoles de recherches et aux développements (2). Les pièces 1, 5, 6, 7 et 8 sont communes au laboratoire collaborateur du CNR-LE cryptosporidioses et au CNR des virus des gastro-entérites.

Dans la zone biologie moléculaire microbiologie, le laboratoire collaborateur disposera de pièces communes avec les autres activités du laboratoire de Parasitologie et Mycologie : les pièces pré-PCR (3 et 4), les pièces des thermocycleurs (5,6) et les pièces post-PCR (7,8). Le CNR- Laboratoire expert Cryptosporidioses disposera également de deux pièces dédiées aux protocoles de recherches et aux développements (2). Les pièces 1, 5, 6, 7 et 8 sont communes au laboratoire collaborateur du CNR-LE cryptosporidioses et au CNR des virus des gastro-entérites.

Principaux équipements du laboratoire associé du CHU de Dijon:

Le Laboratoire associé du CHU de Dijon dispose de tout l'équipement nécessaire à la réalisation des examens parasitologiques par techniques conventionnelles (PSM, microscopes, hotte chimique, centrifugeuses, vortex). Pour l'activité de sérologie, le laboratoire bénéficie des équipements de la plate-forme de sérologie infectieuses, à savoir des automates d'immunoassays et le matériels nécessaires à la réalisation des techniques de confirmation (Immuno-électrophorèse et immunoblot).

Pour ses techniques de biologie moléculaire, le laboratoire de Dijon dispose : de thermocycleurs pour PCR en point final et en temps réel (un LC 2.0 (Roche), un CFX-96 (Biorad); un LC480 II (Roche) et 5 QS5 (Applied Biosystems - Thermo), d'appareils d'électrophorèse et lecteurs de gel, de salles pré et post PCR. Des extracteurs automatiques d'acides nucléiques : NucliSENS EasyMAG® (BioMérieux) et Qiacube® (Qiagen) sont également disponibles ; d'équipements pour le clonage (inoculation,

centrifugeuses basse et moyenne vitesse ...) ; d'un Laboratoire de type L3 et son équipement ; de services communs dans le plateau technique de Biologie ou sur le campus « CHU-Université-INRA » :

- o Séquenceurs Sanger (Plateau Technique de Biologie).
- o Deux Séquenceurs haut débit (Plateau Technique de Biologie) : MiSeq, NextSeq 250.
- o Animalerie (Campus).
- o Accès aux plateformes de protéomique (Campus)
- o Accès au service de Microscopie Electronique (Campus)

Le laboratoire a par ailleurs accès au Centre de Ressources Biologiques du C.H.U. de Dijon (CRB Ferdinand Cabanne).L'ensemble du matériel utilisé sur le site de la PBHU bénéficie de contrats de maintenance assurés par les fournisseurs ou par le service biomédical du CHU, ainsi que d'une surveillance métrologique assurée transversalement par la cellule qualité du laboratoire.

## **Locaux et équipements du CNR-LE**

### **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 m<sup>2</sup> dont une surface dédiée au CNR de 95 m<sup>2</sup>.

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 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 m<sup>2</sup> 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 m <sup>2</sup>	Biologiste responsable
04B002	3	12 m <sup>2</sup>	Biologiste
03B003	3	14 m <sup>2</sup>	Biologiste
03B004	3	18 m <sup>2</sup>	Biologiste
2/ secteur Biologie moléculaire			
03A011	3	13 m <sup>2</sup>	Préparation et stockage des souches,
03A012	3	10 m <sup>2</sup>	Extraction
03A013	3	10 m <sup>2</sup>	Pièce technique mix PCR
03A019	3	62 m <sup>2</sup>	Pièce technique Amplification et post amplification (PCR temps réel)
04	4	58 m <sup>2</sup>	Plateau technique de séquençage
3/ secteur Diagnostic microscopique			
03A014	3	34 m <sup>2</sup>	Pièce microscopie à contraste de phase
03A023	3	5 m <sup>2</sup>	Pièce microscopie à fluorescence
4/ secteur Sérologie			
03A015	3	54 m <sup>2</sup>	Pièce technique (réception, enregistrement), pièce sérologie automatisé (ELISA, WB)

Animalerie Zone A2 avec SAS, hébergement et zone laboratoire

zone A2 RDC Faculté 15 m<sup>2</sup>

### 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 Malditof (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 natives ou 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 parasitaire est conservé à -20°C +/- 5°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, et pourront être accessibles aux sociétés moyennant un coût permettant de couvrir les frais encourus par leur préparation et leur conservation.

Volume des collections sur le mandat 2017-2022 : au CNR-LE, la collection s'élève depuis 2017 à 881 selles, 777 fecal swabs (donc des extraits d'ADN ont été réalisés) et 184 ADN

supplémentaires. De nombreux autres échantillons sont conservés dans le cadre des projets de recherche associés au laboratoire de recherche du CNR-LE depuis plus de 20 ans.

### Collection du laboratoire associé

Toutes les selles reçues des différents laboratoires du réseau ainsi que tous les acides nucléiques extraits de ces selles sont conservés au CHU de Dijon. De plus, une partie de la collection d'échantillons fécaux collectée par le réseau depuis 2006 a été transférée au CHU de Dijon. Au total, la collection comprend plus de 1500 selles positives pour la présence de *Cryptosporidium* sp. et plus de 1500 ADNs extraits de selles positives à *Cryptosporidium*, dont les espèces/génotypes sont représentatifs des souches circulant chez l'homme en France depuis 2006. Cette collection comprend également les ADN des selles qui ont permis de caractériser plusieurs épidémies de gastro-entérites impliquant *Cryptosporidium* sp. en 2001 (Dracy le Fort), 2003 (Vesoul, Divonne les bains), 2019 (Grasse). L'ensemble des caractéristiques des isolats de la collection (2006 - 2017) est inclus dans une banque de données interne (identification moléculaire, séquences génomiques si disponibles, localisation de l'épidémie, origine de la contamination ...). A partir de 2017, ces données sont disponibles sur le site de déclaration de cas du CNR-LE cryptosporidioses..

L'ensemble des caractéristiques des isolats de notre collection est inclus dans une **banque de données interne** (identification moléculaire, séquences génomiques si disponibles, localisation de l'épidémie, origine de la contamination ...).

#### i. Collection d'anticorps monoclonaux

**Anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium*** : Nous disposons d'une collection d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface de *Cryptosporidium* sp. Ces anticorps monoclonaux sont régulièrement sollicités par certains industriels pour le développement de réactifs de diagnostic.

#### **Conditions de stockage**

Depuis 2016, les collections sont intégrées au sein de la filière « Microbiologie » du **Centre de Ressources Biologique Ferdinand-Cabanne** du CHU de Dijon (CRB n°BB-0033-00044) (<http://www.crbferdinandcabanne.fr/catalogue.php?page=205>).

Le Centre de Ressources Biologiques Ferdinand-Cabanne (CRB FC) a été créé en 2006 afin d'intégrer les collections biologiques du CHU Dijon Bourgogne. Sa mise en place répond à la volonté du CHU Dijon Bourgogne de veiller au respect des lois de bioéthique, à l'information et au recueil des consentements des donneurs et à l'utilisation éthique de leurs échantillons. Ainsi, le CRB FC garantit des conditions optimales de préparation et de conservation des échantillons,

en suivant la norme **NF S 96 900**. Cette organisation favorise donc l'exploitation des collections biologiques, leur partage et les collaborations entre équipes de Recherche.

Le CRB FC s'est intégré à une dynamique de mutualisation des secteurs d'activités en Biologie (biochimie, immunologie, hématologie, cytogénétique, génétique moléculaire, virologie, mycologie-parasitologie, anatomie pathologique) ce qui a permis de réunir les laboratoires du CHU autrefois répartis sur 4 sites. Aussi, le plateau Technique de Biologie (PTB) a pu voir le jour en 2008. Ce PTB abrite également l'EFS-BFC dans une zone indépendante.

Le CRB FC est fortement positionné dans le paysage régional de la recherche en biologie-santé. Il est support d'une **recherche pluridisciplinaire** dans les domaines du cancer et des hémopathies, du risque vasculaire, des maladies inflammatoires et dys-immunitaires, des maladies infectieuses et des maladies génétiques, et favorise des **interfaces ambitieuses entre recherche clinique, recherche fondamentale et recherche épidémiologique**.

Le CRB FC est également au carrefour de **recherches interdisciplinaires associant biologie-santé et physico-chimie**, en particulier dans le cadre du programme **NANO2BIO** qui associe le Centre de Recherche INSERM (UMR 866) et l'Institut Carnot de Bourgogne (UMR 6303) pour développer des applications des nanotechnologies dans le domaine de la santé.

Le CRB FC s'ouvre à la communauté scientifique et médicale de Franche Comté à travers une **convention de partenariat** entre le CHU de Besançon et le CHU Dijon Bourgogne. Le CRB-FC est le partenaire de nombreux chercheurs de la région BFC en assurant la gestion totale de leur collection dans le cadre de projets multicentriques inter-régionaux, ou programmes de Recherche collaboratifs nationaux ou européens.

Actuellement, l'activité principale du CRB-FC concerne la gestion de collections de ressources biologiques humaines structurée au sein de la filière **«Liquides»** (comprenant du plasma, sérum, urine majoritairement mais aussi du liquide céphalo-rachidien (LCR) et **« Tissus »** (comprenant du poumon, foie, colon, pancréas etc...). L'objectif est de réceptionner, préparer, conserver et mettre à disposition des ressources biologiques de nature différente dans un souci de maîtrise de la qualité et de la traçabilité des échantillons biologiques.

Plusieurs cohortes importantes sont actuellement suivies par le CRB FC dans différents domaines. Le périmètre de l'actuel CRB a été récemment élargit grâce à l'inclusion dans la filière microbiologique (1) des collections de virus entériques du Centre National de Référence (CNR-VGE) (Responsable des collections : Professeur Pierre POTHIER) et (2) deux collections de selles et d'ADN extraits de selles positives à *Cryptosporidium* (Responsable des collections : Professeur Frédéric DALLE).

La mise en place opérationnelle de la filière microbiologie du CRB est effective depuis fin 2016.

## 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.

Concernant les analyses relatives au CNR-LE, le centre de Rouen a été accrédité COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 depuis 2017 sur la ligne de portée PM7 (renommée aujourd'hui BM MG07 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-LE (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 en 2022. Un audit a bien eu lieu en 2022, mais faute d'expert dédié à la parasitologie et du retard accumulé par le COFRAC en raison du contexte sanitaire, les activités en liens avec le CNR n'ont pas été évaluées. Elles le sauront lors du prochain audit. 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 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.

Le laboratoire associé de Biologie et Pathologie du CHU de Dijon Bourgogne, dont fait partie le laboratoire de Parasitologie et Mycologie, est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 (numéro d'accréditation 8-3125). À ce jour, toutes les lignes de portées des sous familles microbiologie générale (MICROBIOM ou MG) et parasitologie et mycologie spécialisée (PARASITOMYCO ou PM) et pour lesquelles les techniques de diagnostic des parasitoses digestives sont utilisées sont couvertes par l'accréditation : MG01 (méthodes sérologiques), MG03 (Tests unitaires simples), PM04 (Recherche et identification et/ou quantification d'acides nucléiques parasitaires). Le laboratoire collaborateur a déposé une demande d'extension pour la ligne de portée BM-PM04 pour la méthode de génotypage de *Cryptosporidium* par amplification et séquençage du gène codant la gp60. L'audit COFRAC est prévu en 2023.

## 2. 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 avant de répondre son interprétation :

1. L'examen microscopique des selles après coloration de Heine sur selle native ou après concentration de Baillenger. (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.

De plus, le CNR-LE dispose :

- d'une technique alliant culture cellulaire et qPCR permettant d'évaluer l'infectiosité des souches isolées. Cet outil présente un avantage majeur dans l'investigation des épidémies de cryptosporidiose.
- D'une technique de clonage associée au génotypage permettant d'identifier les mélanges d'espèces.

La technique d'extraction d'ADN de référence repose sur l'utilisation du kit PowerFecal DNA pro de Qiagen : il s'agit d'une technique déjà évaluée par le CNR-LE aux performances supérieures aux automates d'extraction (Valeix et al. 2020). Cette technique est partiellement automatisée sur le QIASymphony de Qiagen permettant d'assurer des délais d'analyses optimums et efficaces dans le cadre des investigations épidémiques.

Le Laboratoire Collaborateur dispose de toutes les techniques de biologie moléculaire (PCR conventionnelle, PCR en temps réel et séquençage) permettant le diagnostic et la caractérisation génotypique de *Cryptosporidium* sp. mais aussi d'outils permettant le diagnostic d'autres parasitoses digestives (Microsporidiose, giardiase, entamoebiose). Les analyses des séquences parasitaires sont réalisées à l'aide de bases de données publiques (GenBank) et internes à notre structure :

- Techniques de PCR en temps réel pour identifier les différentes espèces de *Cryptosporidium* sp. (y compris *C. cuniculus*, espèce très proche phylogénétiquement de *C. hominis*, et qui pose des problèmes d'identification par les techniques conventionnelles).
- Techniques de génotypage par clonage d'ADN extrait à partir d'échantillons fécaux qui permettent d'identifier les associations d'espèces de *Cryptosporidium* sp. au sein d'un même échantillon.

Pour l'extraction de l'ADN de *Cryptosporidium*, le Laboratoire collaborateur dispose d'une technique d'extraction automatisée des AN de *Cryptosporidium* et des virus responsables de gastroentérites, présentant d'excellentes performances en termes de sensibilité (seuil de détection = 50 oocystes/g de selles). Cette méthode, adaptée à l'extraction des AN en série permet (1) de répondre dans des délais rapides à la demande des laboratoires pour l'expertise des échantillons fécaux mais aussi (2) de répondre dans des délais rapides aux besoins des autorités de santé en cas d'alerte de cas groupés de gastroentérites impliquant potentiellement des virus et des parasites.

Le Laboratoire Collaborateur dispose également de techniques microscopiques et immunologiques permettant l'identification de *Cryptosporidium* sp. dans les échantillons fécaux. Enfin le laboratoire collaborateur dispose également d'un outil de génotypage par séquençage haut débit permettant la caractérisation de mélanges éventuels d'espèces et génotypes de *Cryptosporidium* sp.

## 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 baillenger ; coloration possible : Henricksen, Heine, Auramine.

### Technique utilisable pour la biologie moléculaire :

Extraction manuelle de l'ADN à partir des selles par le kit PowerFecal DNA pro de Qiagen ou le kit Quick DNA Fecal Soil Microbe Microprep kit de Zymo research ;

Extraction automatisée par le kit DNA Nuclisens EasyMag (Biomérieux) ;

Amplifications maison selon les publications de Hadfield et al. 2011 ou Valeix et al. 2020 ou par le kit commercial FTD stool parasites.

Technique utilisable pour le typage :

Génotypage du gène gp60 pour les principales espèces impliquées en pathologies humaines selon Sulaiman et al. 2005.