

Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose

K. GUYOT^{1,*}, C. SARFATI^{2, 3,*}, F. DEROUIN^{2, 3,*}

RÉSUMÉ

Cryptosporidium est un protozoaire très largement répandu dans le monde, responsable de diarrhées spontanément résolutives chez les patients immunocompétents, notamment les enfants, et de diarrhées chroniques graves chez les malades immunodéprimés. La cryptosporidiose s'acquiert par ingestion d'oocystes présents sur les aliments ou dans l'eau, mais aussi à la suite de contacts avec des patients ou des animaux infectés, excréteurs d'oocystes directement infectants. Les possibilités de traitement de la cryptosporidiose sont actuellement limitées, en l'absence de médicament capable d'éliminer le parasite. Le diagnostic de la cryptosporidiose repose sur la mise en évidence des oocystes dans les selles ; la recherche de coproantigène ou la mise en évidence d'ADN de *Cryptosporidium* dans les selles peut également être proposée. La prévention de la cryptosporidiose est à la fois individuelle et collective, basée sur l'hygiène alimentaire et individuelle et la protection des ressources d'eau contre une contamination environnementale d'origine humaine ou animale.

MOTS CLÉS : *Cryptosporidium*, cryptosporidiose, diagnostic, épidémiologie, opportuniste.

I. - INTRODUCTION

La cryptosporidiose est une parasitose causée par *Cryptosporidium*, un protozoaire monoxène qui se développe dans l'intestin de divers groupes de vertébrés, y compris l'homme. Son cycle comporte une multiplication asexuée (schizogonie) et une multiplication sexuée (gamogonie) conduisant à la formation d'oocystes éliminés avec les selles dans le milieu extérieur. Ces oocystes sont directement infectants dès leur émission.

Bien que le parasite soit connu depuis le début du XX^{ème} siècle, ce n'est qu'en 1976 que les premiers cas humains ont été diagnostiqués et c'est dans les années 80 que la cryptosporidiose fit une bruyante émergence en pathologie humaine, avec la pandémie du SIDA. *Cryptosporidium* fut alors reconnu comme agent responsable de diarrhée chez l'homme et comme agent opportuniste. Son implication dans de nombreuses épidémies d'origine hydrique au cours des trois dernières décennies (400 000 cas à Milwaukee aux USA en 1993) l'a définitivement propulsé en tête des préoccupations internationales en matière de santé publique et d'environnement. En effet, les désinfectants utilisés habituellement dans l'industrie des eaux potables et de récréation ne sont pas efficaces contre les oocystes infectieux de *Cryptosporidium*, qui sont largement disséminés dans le sol, les eaux de surface et souterraines.

II. - QUELS SONT LES SYMPTÔMES DE LA CRYPTOSPORIDIOSE ET QUELS EN SONT LES RISQUES ÉVOLUTIFS ?

Chez les individus immunocompétents, la cryptosporidiose peut être symptomatique ou non. Dans le premier cas, la symptomatologie s'apparente à une gastroentérite aiguë. Le symptôme le plus remarquable est une diarrhée, volumineuse et aqueuse, consistant en trois à six (parfois plus) selles par jour. Du mucus est parfois présent dans les selles, mais le sang et les leucocytes sont rares. Cette diarrhée s'associe, selon les cas, à des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, une fièvre modérée, une anorexie, une déshydratation, une perte de poids, une asthénie. Les symptômes se manifestent généralement jusqu'à deux semaines après l'exposition au parasite (sept jours en moyenne) et

¹ Biologie et Diversité des Pathogènes Eucaryotes Émergents (BDPEE) – Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille, Inserm U1019, CNRS UMR 8204, Université Lille-Nord-de-France, Lille, France.

² Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3520.

³ Laboratoire de Parasitologie, AP-HP, Hôpital Saint-Louis, F-75475 Paris, France.

* Membres du réseau français sur la cryptosporidiose (Réseau Crypto-ANOFEL).

sont spontanément résolutifs en une dizaine de jours sans traitement (1).

La cryptosporidiose affecte toutes les classes d'âge mais elle est plus fréquente dans la petite enfance (enfants de moins de 4 ans) et chez les personnes âgées dans certaines études. Dans les pays en développement, la malnutrition peut contribuer à augmenter la durée de la diarrhée due à *Cryptosporidium* et, inversement, les cryptosporidies peuvent prolonger la diarrhée chez les enfants malnutris.

Chez les patients qui présentent un déficit immunitaire, le plus souvent secondaire à une infection (VIH), un traitement immunosuppresseur, une chimiothérapie ou une pathologie maligne sous-jacente, la cryptosporidiose est une infection grave, pouvant être mortelle (1). La diarrhée devient alors chronique, pouvant durer plusieurs mois à plusieurs années avec persistance de l'émission d'oocystes. Le risque de passage à la chronicité est corrélé au degré de déficit immunitaire et donc pour une grande partie au taux sanguin de lymphocytes CD4+. La cryptosporidiose, en tant qu'infection opportuniste, est observée chez les patients présentant moins de 100 lymphocytes CD4+/mm³. Si l'immunodépression n'est pas corrigée, la cryptosporidiose peut alors devenir létale à cause des diarrhées profuses, liquides et persistantes, de type cholériforme, résistantes à tout traitement antiparasitaire et conduisant à une déshydratation très sévère. Chez les sujets très profondément immunodéprimés, une dissémination extra-intestinale du parasite est même possible, avec atteinte hépatobiliaire, pulmonaire ou pancréatique. Toutefois, depuis la mise en place des thérapies antirétrovirales, on a observé, dans les pays en bénéficiant, une forte diminution du nombre de cas de cryptosporidiose chez les patients infectés par le VIH, cela grâce à la reconstitution immunitaire.

III. - QUEL TRAITEMENT PRESCRIRE

À l'heure actuelle, aucun traitement n'est pleinement efficace dans la cryptosporidiose, ni capable d'éliminer complètement le parasite. Plusieurs molécules ont une efficacité partielle, mais insuffisamment démontrée par des études contrôlées. Seules la paromomycine et la nitazoxanide ont fait l'objet d'études cliniques plus approfondies. L'efficacité du traitement par la paromomycine est modeste, permettant une réduction de la durée et de l'intensité des symptômes. Chez les patients atteints de SIDA, son bénéfice thérapeutique n'est pas démontré. L'efficacité de la nitazoxanide est plus clairement établie, notamment chez les patients non immunodéprimés : le traitement conduit à l'arrêt de la diarrhée dans 80-90 % des cas (vs 40 % chez les patients recevant un placebo) et à l'élimination des parasites dans plus de 60 % des cas chez les sujets non immunodéprimés. Cette molécule est agréée aux États-Unis pour le traitement de la cryptosporidiose de l'enfant et de l'adulte non immunodéprimé. Son efficacité dans le traitement de la cryptosporidiose du sujet immunodéprimé (SIDA principalement) est plus modeste et liée au degré d'immunodépression (2, 3). Chez les patients atteints de SIDA, la reconstitution immunitaire, via l'administration d'associa-

tion d'antirétroviraux reste encore le meilleur moyen de contrôler l'infection, dont l'incidence en France a considérablement décru depuis l'introduction des multithérapies antirétrovirales, en 1996.

IV. - QUE CONNAÎT-ON DES ESPÈCES QUI COMPOSENT LE GENRE *CRYPTOSPORIDIUM* ?

Cryptosporidium a été détecté chez plus de 150 espèces de mammifères, 30 espèces d'oiseaux, 57 espèces de reptiles, 9 espèces de poissons et 2 espèces d'amphibiens (4). Le genre *Cryptosporidium* est maintenant bien reconnu, mais la définition des espèces à l'intérieur du genre *Cryptosporidium* reste un sujet de discorde et constitue un frein majeur à la compréhension de l'épidémiologie et de la transmission de l'infection. De multiples causes expliquent cette confusion, notamment le manque de critères morphologiques permettant de distinguer les espèces. En effet, les oocystes d'espèces différentes présentent des tailles et des structures similaires. De plus, le concept de spécificité étroite des espèces de *Cryptosporidium*, qu'on sait aujourd'hui erroné, a conduit dans le passé à la dénomination d'une vingtaine d'espèces (différentes de la vingtaine d'espèces décrites et reconnues aujourd'hui). Il a fallu attendre des études de transmissions croisées pour montrer que des isolats provenant d'animaux différents pouvaient se transmettre d'une espèce à une autre, mettant fin à l'application du concept de spécificité stricte. Beaucoup d'espèces furent alors regroupées sous le nom de *C. parvum*, qui sera pendant longtemps utilisé pour désigner les cryptosporidies retrouvées chez de nombreux mammifères, dont l'homme.

Au cours des quinze dernières années, diverses approches de biologie moléculaire ont permis de distinguer chez *C. parvum* de nombreux génotypes, dont plusieurs se sont vus élever au rang d'espèces ces dernières années. C'est le cas, par exemple, pour *C. hominis*, *C. canis*, *C. suis* ou plus récemment *C. cuniculus* qui étaient précédemment apparentés respectivement aux génotypes humain, canin, porcin et cunicole de *C. parvum* (5). La quarantaine de génotypes actuellement décrits au sein du « complexe » *C. parvum* rend très probable le fait que *C. parvum* compte encore dans ses rangs des espèces cryptiques. Au-delà de la caractérisation moléculaire des isolats au niveau spécifique, le génotypage infraspécifique des souches est aussi nécessaire pour comprendre la diversité génétique chez *Cryptosporidium*. C'est un prérequis à la définition des marqueurs moléculaires nécessaires au traçage des souches et à la compréhension de la transmission (réservoirs, sources d'infection) et de la circulation de *Cryptosporidium* dans l'environnement.

V. - QUELLES ESPÈCES PEUVENT INFECTER L'HOMME ?

Cinq espèces de *Cryptosporidium* sont responsables de la plupart des cas de cryptosporidiose humaine : *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, et *C. canis*.

Parmi elles, *C. hominis* et *C. parvum* sont responsables de la majorité des infections humaines (plus de 90 % des cas), principalement dans les pays industrialisés, bien que dans certaines régions (Pérou, Thaïlande), les taux d'infection à *C. meleagridis* soient aussi élevés que ceux à *C. parvum* (6). Quelques autres espèces et génotypes sont aussi occasionnellement retrouvés chez l'homme. C'est le cas de *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. cuniculus* et des génotypes cerf, cheval, mouffette et tamia (6). Les espèces autres que *C. parvum* et *C. hominis* se retrouvent aussi bien chez les hôtes immunocompétents que chez les immunodéprimés, mais les cas d'infection sont plus fréquents chez ces derniers. Enfin, des cas d'infection multiple par deux voire trois espèces de *Cryptosporidium* ont été décrits chez des patients infectés par le VIH (7).

VI. - QUELLES SONT LES MODALITÉS DE TRANSMISSION ?

La cryptosporidiose est une maladie à transmission féco-orale. L'ingestion d'une quantité relativement faible d'oocystes est infectante : la dose minimale infectante (DMI) chez des sujets immunocompétents (volontaires sains) est de 132 oocystes en moyenne et on estime qu'elle est inférieure à 10 oocystes chez les patients immunodéprimés. Ces valeurs ne sont qu'indicatives car on observe des différences de virulence suivant les souches : ainsi, les DMI de trois souches distinctes de *C. parvum* sont respectivement de 9 (souche TAMU), 87 (souche IOWA) et 1 042 oocystes (souche UCP) chez des volontaires sains séronégatifs pour la cryptosporidiose. Le risque de contracter une infection à *Cryptosporidium* varie également selon la réceptivité de l'individu qui est fonction de son âge, de l'état de son système immunitaire, des antécédents d'exposition et d'autres facteurs génétiques et environnementaux.

Les oocystes sont directement infectants dès leur émission, et sont extrêmement résistants dans l'environnement (> 1 an). En conséquence, la cryptosporidiose est une parasitose non seulement à transmission directe (contact avec un sujet ou un animal infecté), mais aussi à transmission indirecte, via l'eau et les aliments souillés par des oocystes d'origine humaine ou animale.

Pour l'espèce *C. hominis*, l'homme est le seul réservoir de parasites et la transmission inter-humaine constitue un fort risque de contaminations familiales et de dissémination au sein de collectivités (crèche notamment). Pour *C. parvum* et les autres espèces animales, la contamination de l'homme peut s'effectuer au contact d'un animal infecté, comme cela a été montré dans plusieurs cas de contamination d'enfants à la suite de visites dans des fermes pédagogiques.

Dans le cadre de la contamination indirecte, l'eau est sans conteste le principal véhicule de la contamination, qu'il s'agisse d'eau de surface (lac, rivière), d'eau d'arrosage, d'eau de loisir (piscine) ou d'eau destinée à la consommation humaine. De nombreuses épidémies d'origine hydrique ont été rapportées, dont certaines sont très démonstratives sur le rôle du réservoir animal de cryptosporidies.

Par exemple, en juillet 2008, en Angleterre, *C. cuniculus* a été identifié comme agent étiologique d'une épidémie de cryptosporidiose humaine : un lapin de garenne s'était introduit dans un réservoir d'eau potable qu'il avait contaminé. Cet épisode souligne que les animaux peuvent être porteurs de cryptosporidies, et que le risque de zoonose, liée à l'eau notamment, ne doit pas être négligé (8). L'émergence de cas liés à la fréquentation des piscines (1 000 cas en Suède en 2002) et des baignades en eaux de loisirs a été remarquée ces dernières années, devenant la première cause d'épidémies de cryptosporidiose aux États-Unis et l'une des principales en Angleterre (9).

D'autres sources que l'eau ont été impliquées dans des cas ou des épidémies de cryptosporidiose : cidre brut ou produits laitiers non pasteurisés, légumes frais consommés crus.

Facteurs de risque de cryptosporidiose

Facteurs de risque de contamination

- Consommation d'eau non traitée
- Voyages dans une zone à bas niveau d'hygiène
- Contact avec des animaux pouvant être infectés (jeunes veaux, en particulier)
- Vie en collectivité (enfants en crèche, principalement)
- Diarrhée dans l'entourage
- Baignade dans une eau potentiellement contaminée.

Les facteurs de risque diffèrent entre *C. parvum* et *C. hominis*. Voyager à l'étranger et être en contact avec une personne diarrhéique (changement des couches-culottes chez le jeune enfant) représente un facteur de risque associé à l'infection par *C. hominis*, alors qu'être en contact avec un animal représente un facteur de risque associé à l'infection par *C. parvum*.

Facteurs de risque pour les formes graves

- Infection à VIH/SIDA (taux des CD4 < 200/mm³). La susceptibilité à l'infection par *Cryptosporidium* étant croissante avec la diminution du taux de lymphocytes CD4 sanguins, le risque est multiplié par 2 pour un taux de 500 à 1 000 lymphocytes CD4/mm³, par 3,6 pour un taux de 100 à 200 et par 6 pour un taux < 100 (10).
- Autres déficits immunitaires : hémopathies, transplantation.

VII. - QUELLE EST LA SITUATION DE LA CRYPTOSPORIDIOSE DANS LE MONDE ET EN FRANCE ?

La cryptosporidiose est une parasitose cosmopolite. *Cryptosporidium* a été isolé dans 95 pays parmi tous les continents et sous toutes les latitudes (à l'exception de l'Antarctique). La prévalence mondiale de la cryptosporidiose humaine est estimée entre 0,5 et 2 % dans les pays industrialisés et peut dépasser 10 % dans les pays en développement, notamment en cas de forte prévalence du VIH.

A) Répartition *C. parvum*/*C. hominis*

La proportion relative des cas de cryptosporidiose à *C. parvum* et *C. hominis* varie selon les régions géographiques. En Europe, *C. parvum* est responsable de légèrement plus d'infections que *C. hominis* (Angleterre, France, Irlande du nord, Pays de Galle, Portugal, République Tchèque, Slovaquie, Suisse). C'est l'inverse aux USA, au Canada, en Australie et au Japon (11). Dans certains pays comme l'Inde et le Pérou, on note une forte prédominance de *C. hominis*, traduisant peut être de mauvaises conditions d'hygiène individuelle et donc une forte contamination interhumaine.

B) Variations saisonnières de l'incidence

Dans la plupart des pays, l'incidence de la cryptosporidiose est soumise à des variations saisonnières. L'analyse de la littérature et des rapports sur la surveillance de la cryptosporidiose émanant de plusieurs pays européens montre que l'observation d'un pic annuel (printemps ou automne suivant les pays) est fréquente alors que celle de deux pics (printemps et automne) est inconstante d'une année sur l'autre (12). Au nord-ouest de l'Angleterre, par exemple, les cas observés sur une période de 17 ans ont eu lieu principalement au printemps et à l'automne (13). Toutefois depuis 2001, suite à des changements dans la réglementation relative à l'eau de distribution, il a été observé une réduction du nombre de cas pour la première partie de l'année, diminution non observée en automne (14). Au Royaume-Uni et en Nouvelle Zélande, il a été montré que le pic de printemps était principalement dû à *C. parvum* alors que celui d'automne est essentiellement dû à *C. hominis*. Cela met en lumière des différences saisonnières spécifiques dans les voies de transmission des deux espèces.

C) Situation française

Jusqu'à récemment, peu de données épidémiologiques étaient disponibles car la cryptosporidiose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en France (contrairement à l'Angleterre). Quelques données historiques sont issues d'études ponctuelles :

Une étude multicentrique réalisée en 1995 chez des sujets sans symptômes digestifs montrait une prévalence de 0,32 % chez 932 enfants de crèches hospitalières, de 0,36 % chez 831 adultes non immunodéprimés et de 3,1 % chez 618 patients infectés par le VIH, sans distinction de stade.

En 2001, une analyse génotypique réalisée sur 57 échantillons de selles de patients immunocompétents et immunodéprimés montrait que *C. parvum* et *C. hominis* sont les espèces majoritairement retrouvées en France et révélait que *C. meleagridis*, *C. felis*, et un nouveau génotype de *C. muris* sont aussi identifiés chez des sujets immunodéprimés.

En dehors de ces études, trois épidémies liées à la contamination de l'eau de distribution par *Cryptosporidium* ont été identifiées et investiguées en France :

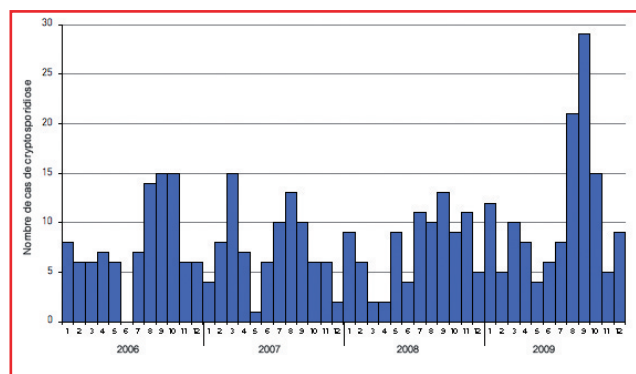


Fig. 1 - Saisonnalité de la cryptosporidiose en France (2006-2009).
Adapté de « The ANOFEL *Cryptosporidium* National Network, 2010 », (17)

- la première est survenue à Sète en 1998, touchant 150 personnes ; elle a été reliée à la contamination d'une ressource à la suite d'intempéries ;
- la deuxième est survenue à Dracy-le-Fort en Saône-et-Loire en 2001, touchant 480 personnes ; la cause était une contamination accidentelle du réseau de distribution ;
- la dernière est survenue à Divonne-les-Bains en 2003, touchant 800 personnes ; elle était consécutive à la contamination du réseau de distribution d'eau.

Les rapports d'investigation de ces épidémies ainsi que les conclusions du rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (15) ont clairement mis l'accent sur la nécessité d'améliorer les conditions de diagnostic, d'analyse épidémiologique et d'estimation du risque lié à la cryptosporidiose en France.

C'est dans ce contexte qu'en 2004, un réseau français de laboratoires hospitaliers de Parasitologie s'est constitué sous l'égide de l'Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicale (ANOFEL) et en partenariat avec l'AFSSA (devenue depuis l'ANSES) et l'Institut de Veille sanitaire (InVS) autour de la thématique *Cryptosporidium* (16). Parmi ses objectifs figurent l'évaluation de la prévalence de la cryptosporidiose humaine et la constitution d'une collection nationale d'isolats pour permettre la caractérisation génotypique des échantillons. Ce réseau compte aujourd'hui 39 laboratoires membres répartis sur l'ensemble du territoire.

De janvier 2006 à décembre 2009, 407 cas de cryptosporidiose ont été notifiés au réseau et 364 spécimens ont été collectés. Parmi les cas déclarés, 74 étaient des enfants de moins de quatre ans (18,2 %), 157 des patients infectés par le VIH (38,6 %) et 114 des patients immunocompétents (28 %). Un profil saisonnier marqué a été observé chaque année, avec augmentation du nombre de cas du milieu à la fin de l'été et le début de l'automne (Figure 1). Le génotypage de 345 isolats provenant de 310 patients a identifié *C. parvum* dans 168 cas (54,2 %), *C. hominis* dans 113 cas (36,4 %) et d'autres espèces dans 29 cas (9,4 %) (Tableau I).

Tableau I - Espèces ou génotypes de *Cryptosporidium* identifiés en France entre 2006 et 2009 chez 310 patients. Source : The ANOFEL *Cryptosporidium* National Network, 2010 (17).

Espèce ou génotype	Nombre de patients				
	2006	2007	2008	2009	Total
<i>C. parvum</i>	32	33	51	52	168
<i>C. hominis</i>	30	22	14	47	113
<i>C. felis</i>	7	2	3	3	15
<i>C. meleagridis</i>	2	0	1	1	4
<i>C. canis</i>	1	0	1	2	4
<i>C. cuniculus</i>	0	0	0	1	1
Génotype tamia	0	0	1	0	1
Autres génotypes	1	0	2	1	4
Total	73	57	73	107	310

Une analyse des facteurs de risque a pu être réalisée sur 281 cas pour lesquels des informations cliniques et épidémiologiques étaient disponibles (17). Elle a montré que, par rapport à *C. hominis*, *C. parvum* a été plus fréquemment isolé chez les patients âgés de plus de 60 ans ($p = 0.01$) et chez les patients avec maladie lympho-proliférative ($p < 0.001$). Cette espèce est aussi plus souvent associée à une perte de poids ($p < 0.03$). *C. hominis* est plus fréquemment rapporté chez les patients ayant voyagé à l'étranger ($p < 0.001$), ayant eu des cas de diarrhées dans leur entourage ($p = 0.001$) ou ayant consommé de l'eau non traitée ($p < 0.02$).

VIII. - COMMENT FAIRE LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE CRYPTOSPORIDIOSE CHEZ L'HOMME ?

A) Le prélèvement

Le diagnostic de la cryptosporidiose est avant tout microscopique, par la mise en évidence des oocystes dans les selles. On peut également les rechercher sur des biopsies duodénales (apposition), dans le liquide biliaire (culot de centrifugation), voire dans les expectorations induites et les lavages broncho-alvéolaires (cyto-centrifugation) en cas de suspicion de localisation broncho-pulmonaire (localisation exceptionnelle et en principe associée à une cryptosporidiose intestinale).

Dans ce qui suit, nous n'évoquerons que les spécificités du diagnostic coprologique, sachant que les techniques appliquées sur les selles peuvent être appliquées aux autres types de prélèvements. Précisons cependant que la coloration au Giemsa, couramment utilisée sur des échantillons pulmonaires ou digestifs colore les oocystes en bleu violacé et les noyaux des sporozoïtes en rouge.

B) Nécessité d'une prescription spécifique

Les oocystes ne sont pas identifiables lors d'un examen parasitologique classique car ils sont très difficiles à voir à

l'état frais ou par les colorations habituellement utilisées en coprologie parasitaire (MIF, Lugol). Ils doivent être recherchés après coloration plus spécifique ou par des techniques complémentaires, détaillées ci-après.

Il est donc nécessaire que la recherche de cryptosporidies soit clairement spécifiée sur la prescription du clinicien, pour que le laboratoire ne se limite pas à un examen parasitologique classique, source de sous-diagnostic, et puisse mettre en œuvre une ou plusieurs techniques appropriées.

L'initiative de réaliser cette recherche peut aussi revenir au biologiste, au vu d'informations cliniques ou épidémiologiques indiquant des facteurs de risque élevés pour la cryptosporidiose.

C) Diagnostic par microscopie (Tableau II)

1) Technique de Ziehl-Neelsen modifiée (coloration modifiée par Henriksen et Poblentz)

Parmi les techniques permettant la coloration des oocystes, c'est la plus utilisée en France (30/33 laboratoires du réseau français sur la cryptosporidiose).

Les selles doivent être concentrées par une technique de routine habituelle du type Ritchie ou Bailanger. Une lame témoin est systématiquement colorée en parallèle. Certains laboratoires ne concentrent pas au préalable les selles et réalisent la coloration sur un simple frottis de selles ; cela expose au risque d'une lecture plus difficile en raison des nombreux artefacts et d'une méconnaissance d'une pauci-infection.

Une goutte du culot de concentration est déposée sur une lame, séchée ou non sur platine chauffante, fixée à l'éthanol 90° pendant 5 minutes. La coloration par la fuchsine de Ziehl s'effectue à froid à l'aide d'une solution prête à l'emploi (Réactifs RAL code 320493) durant 1 heure. La lame est ensuite lavée à l'eau courante, puis différenciée à l'acide sulfurique à 2 % de 20 secondes à 2 minutes en agitant la lame jusqu'à disparition du colorant rouge (le temps de différenciation est fonction de la date de la

préparation de l'acide sulfurique), rincée à l'eau courante, contre-colorée au bleu de méthylène à 3 % ou au vert malachite à 5 % puis lavée à l'eau du robinet.

Toutes ces étapes doivent être réalisées dans des bacs à coloration sous hotte. Les colorants doivent être changés tous les mois, l'acide sulfurique à 2 % tous les 15 jours et évacués en tant que déchet dans des containers spécifiques.

Coloration Ziehl-Neelsen modifiée

- Fixation alcool éthylique 90° : 5 minutes
- Séchage sur platine chauffante
- Solution fuchsine RAL : 1 heure (peut rester une nuit)
- Lavage à l'eau courante
- Acide sulfurique 2 % : 20 secondes à 2 minutes en agitant la lame
- Lavage à l'eau courante
- Vert malachite 5 % ou bleu méthylène 3 % : 5 minutes
- Lavage à l'eau courante
- Séchage puis lecture (x 400 et confirmation x 1 000)

La lecture de la lame **montée ou recouverte d'huile avec lamelle**, s'effectue à l'objectif 40 ; le diagnostic est confirmé à l'objectif 100.

Les oocystes de cryptosporidies apparaissent en rouge sur fond vert ou bleu (Figure 2). Ils mesurent 5 à 6 µm de diamètre, contiennent des granulations noires et présentent souvent une vacuole qui apparaît comme une zone plus claire. Lorsque les oocystes contiennent des sporozoïtes, les oocystes n'ont plus de vacuole visible, sont plus faiblement colorés et sont ainsi moins repérables, d'où la nécessité d'effectuer la lecture à l'objectif 40. Lorsque les selles sont au préalable concentrées par une technique utilisant de l'éther, les oocystes sont plus fréquemment retrouvés en périphérie du dépôt sur la lame.

Cette technique permet aussi de diagnostiquer les oocystes de *Cyclospora sp* et d'*Isospora belli*.

Le diagnostic différentiel est avant tout celui de taches de colorants (irrégulières en taille et en forme), certaines spores végétales, et les oocystes de *Cyclospora sp* ; initialement pris pour des formes atypiques de cryptosporidies, ces derniers mesurent de 8 à 10 µm de diamètre et prennent de façon inconstante le colorant sur une même lame.

À noter que la technique de Ziehl-Neelsen utilisée pour la recherche de bacilles alcool-acido-résistants (BAAR) et comportant une coloration à chaud à l'aide de fuchsine phéniquée, ne permet pas la mise en évidence des oocystes de cryptosporidies.

2) Coloration par l'auramine

La lecture des lames s'effectue en microscopie à fluorescence. Cette technique est sensible, non spécifique, mais elle permet de mieux dénombrer les oocystes contenant des sporozoïtes ou des oocystes vides. La fluorescence aspécifique peut être vérifiée en recolorant la même lame

avec la technique de Ziehl-Neelsen. À noter que cette technique requiert l'utilisation de produits toxiques (auramine, phénol) et qu'elle présente l'inconvénient de nécessiter un microscope à fluorescence.

3) Autres techniques

Les techniques en coloration négative qui colorent tous les éléments (y compris les levures) sauf les oocystes, ne sont pas habituellement pratiquées pour le diagnostic de cryptosporidiose humaine. Par exemple, la technique de Heine, qui consiste à mélanger sur une lame 3 µl de selles à 3 µl de fuchsine de Ziehl, réaliser un frottis, le laisser sécher à l'air, mettre de l'huile à immersion puis une lamelle et regarder au contraste de phase à l'objectif 40. Par cette coloration, les oocystes apparaissent alors réfringents. Cette technique est plus souvent réservée au domaine vétérinaire. Évaluée par un laboratoire lors d'une enquête du réseau français sur la cryptosporidiose, elle apparaît très facile à réaliser et sensible pour un microscopiste expérimenté. Elle permet le diagnostic de *Cyclospora sp* et d'*Isospora belli*. Cependant, elle est réalisée sur un étalement de selles fraîches non concentrées et ne permet pas l'archivage des lames ou la relecture de la lame au-delà de 15 minutes à frais et 30 minutes en présence de formol.

4) Immunofluorescence

Les tests d'immunofluorescence (Merifluor® de Meridian Bioscience, Crypto ou Crypto/Giardia CEL® de Cellabs) reposent sur l'identification des oocystes par un anticorps monoclonal et une révélation par la fluorescence. Ils sont pratiqués sur lame, sur un dépôt de matières fécales ou après concentration. Les oocystes apparaissent marqués avec une fluorescence verte périphérique (paroi de l'oocyste). Ces techniques spécifiques et sensibles présentent un intérêt pour le diagnostic des pauci-infestations et pour les enquêtes épidémiologiques. Elles présentent l'inconvénient de nécessiter un microscope à fluorescence.

D) La recherche de coproantigènes (Tableau II)

Différentes trousse de diagnostic sont commercialisées pour la recherche d'antigènes de *Cryptosporidium* dans les selles, utilisant des anticorps monoclonaux et des principes de capture et de révélation différents.

Les tests immunochromatographiques sont très simples d'utilisation et ne nécessitent pas de compétence en microscopie. Quatre trousse commercialisées en France ont été récemment évaluées par le réseau français sur la cryptosporidiose. La spécificité est excellente, mais la sensibilité des tests étudiés est de 70 à 90 % pour les espèces *C. parvum* et *C. hominis*, et seulement de 15 à 30 % pour les autres espèces (18). Les prix unitaires sont compris entre 4 et 17 euros par test.

Les tests ELISA reposent sur un principe d'immuno-capture. Ils sont surtout utilisés pour les enquêtes de masse et très peu dans les laboratoires d'analyse, qui traitent habituellement de petites séries d'échantillons. Les données

de la littérature indiquent une bonne sensibilité et une bonne spécificité (19).

E) Le diagnostic moléculaire

La recherche d'ADN de *Cryptosporidium* peut être réalisée par PCR. Cette technique est d'une grande sensibilité mais n'est pratiquée à ce jour que dans des laboratoires spécialisés ou de référence. L'amplification moléculaire permet également d'identifier les espèces et sous-espèces de *Cryptosporidium* par analyse de fragments de restriction ou par PCR spécifique.

Dans une étude très récente, Hadfield *et al.* obtiennent une sensibilité de 99 % avec une spécificité de 100 % en utilisant des PCR quantitatives en duplex, ciblant le genre *Cryptosporidium* et les espèces *C. hominis* et *C. parvum* (20).

On attend dans les années à venir le développement de trousses commerciales, simples à utiliser, et permettant à la fois le diagnostic, la quantification de la charge parasitaire et l'identification moléculaire de l'espèce.

IX. - DE QUELLES FAÇONS PRÉVENIR LA CRYPTOSPORIDIOSE ?

A) La prévention individuelle

La prévention individuelle repose avant tout sur le respect des règles d'hygiène de base, notamment le lavage soigneux des mains, le lavage des aliments en contact avec des eaux souillées. Ces mesures permettent de réduire le risque de contamination à partir d'une source environnementale ou animale et de réduire le risque de transmission interhumaine.

Dans les collectivités, et en particulier dans les crèches, ces mesures doivent être appliquées avec une grande rigueur. Le personnel doit être informé du risque de contamination lors du change des couches ou de linge ou d'objets souillés par des selles, et il faut recommander l'utilisation de gants.

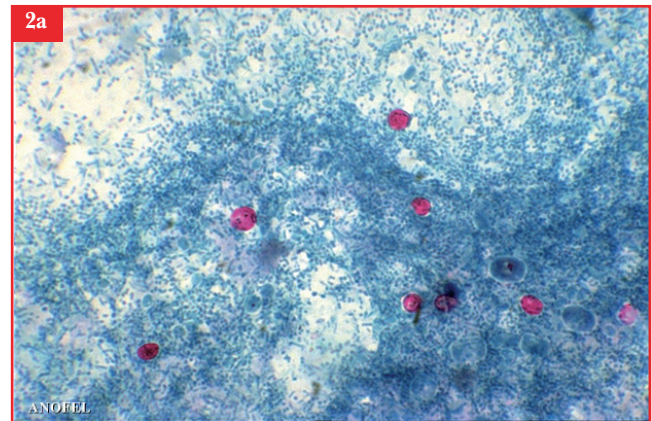
Lors de la visite de fermes pédagogiques, il faut recommander d'éviter de toucher les animaux et d'exiger un lavage soigneux des mains ; les risques sont particulièrement élevés en cas de contact avec les veaux de moins de deux semaines.

Certaines personnes sont également exposées dans le cadre de leurs activités professionnelles : le personnel de santé médical ou paramédical, les vétérinaires, les éleveurs, le personnel d'abattoirs. Ils doivent être bien informés de ce risque et de l'importance des mesures d'hygiène (lavage des mains, nettoyage soigneux des plans de travail et des outils ou instruments pouvant avoir été souillés).

Lors de conseils aux voyageurs, il faut informer du risque accru de diarrhées liées à la consommation d'eau non encapsulée ou recommander l'usage de filtres.

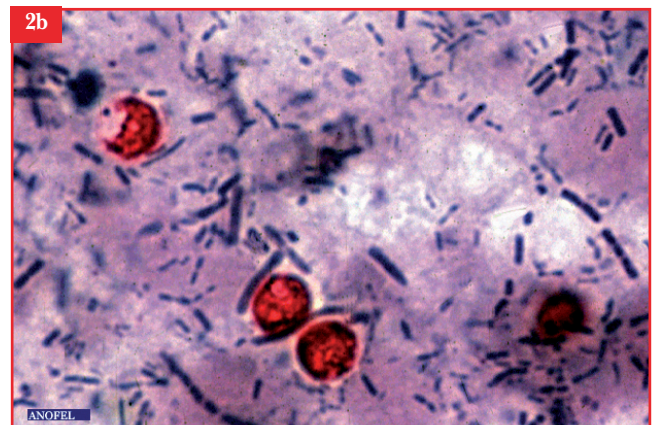
Les patients immunodéprimés devront respecter scrupuleusement les mesures d'hygiène individuelle, consom-

Fig 2 - Oocystes de *Cryptosporidium*. Coloration Ziehl-Neelsen modifiée. Source : CD-ROM ANOFEL 4, avec la permission de l'Association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers Titulaires de Parasitologie et de Mycologie Médicale (ANOFEL).



2a : Frottis de selle, au grossissement 400 : les oocystes de cryptosporidies sont colorés en rouge et se détachent bien du fond bleu-vert de la préparation. Noter, dans le quadrant inférieur droit, des spores de *Geotrichum* sp. qui ne prennent pas le Ziehl.

(Photo : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU de Dijon).



2b : À plus fort grossissement (x 1 000), les oocystes de cryptosporidies sont colorés en rouge de façon non homogène et irrégulière.

(Photo : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU d'Angers).

mer de l'eau de boisson filtrée ou encapsulée. Il sera prudent de leur déconseiller la consommation de certains coquillages crus (huîtres, moules), tout particulièrement si ces coquillages ne proviennent pas d'une zone d'élevage surveillée sur le plan microbiologique (par exemple, récoltés individuellement par la pêche à pied).

Il faut également donner une information sur le risque de contamination oro-fécale lors de certaines pratiques sexuelles.

B) La prévention collective

Compte tenu de la grande résistance des oocystes, la prévention collective repose avant tout sur le contrôle de la contamination environnementale et la protection des ressources d'eau destinée à la consommation humaine. Ceci s'appuie sur un traitement efficace des effluents d'origine humaine ou animale et une surveillance microbiolo-

gique et parasitologique des ressources. En France, la réglementation n'impose la recherche de *Cryptosporidium* dans l'eau des ressources et l'eau distribuée que lorsque les indicateurs bactériologiques (bactéries sulfito-réductrices) indiquent une contamination fécale ou lorsque survient une épidémie de gastroentérite d'étiologie inconnue. Ceci conduit à une sous-estimation du risque car la corrélation entre les indicateurs de contamination fécale et la contamination par *Cryptosporidium* est faible. En Angleterre, cette recherche est pratiquée de façon systématique, avec un seuil maximal (1 oocyste pour 10 L) de contamination acceptable.

L'augmentation du nombre de cas liés à la fréquentation des piscines et des baignades dans les eaux de loisirs qui a été observée dans plusieurs pays européens et aux États-Unis (mais pas en France), doivent aussi nous conduire à une grande vigilance sur les traitements des eaux de baignades.

Prévention de la cryptosporidiose

Prévenir en amont la contamination de l'eau et des aliments.

Suivre les recommandations individuelles d'hygiène, en particulier pour les patients immunodéprimés et les personnes les plus exposées :

- Lavage des mains et des aliments
- Éviter le contact avec des selles humaines (couches), objets et linges souillés par des selles
- Éviter le contact avec des animaux susceptibles d'être contaminés (jeunes veaux)
- Être averti du risque de baignade en eaux non contrôlées (lacs, rivières, bases de loisirs qui peuvent être contaminées)
- Éviter de boire de l'eau provenant d'une source douteuse, pouvant avoir été contaminée en amont
- En cas de doute sur l'eau potable, boire de l'eau encapsulée, des jus pasteurisés (éviter les jus de fruits frais, les glaces)
- Recommander une hygiène renforcée aux voyageurs séjournant dans des pays à faible niveau d'hygiène.

X. - CONCLUSION

La fréquence de la cryptosporidiose humaine reste mal évaluée et probablement sous-estimée en France. Au Royaume-Uni, pays de climat et de niveau socio-économique proche du nôtre, une politique très volontariste de diagnostic, de déclaration et de génotypage parasitaire mise en place depuis plus de 10 ans a permis de montrer que la cryptosporidiose était l'une des principales causes de gastroentérite dans la population générale, avec 4 000 à 6 000 cas par an.

Il est possible que la France bénéficie de meilleures conditions d'exploitation de l'eau destinée à la consommation, mais il est certain que les facteurs de risque de la cryptosporidiose existent en France : importance de la cryptosporidiose animale, faible protection de certaines ressources d'eau, existence de populations sensibles. Il est également probable que la cryptosporidiose soit mal connue par la communauté médicale et que les particularités du diagnostic (et de sa prescription) conduisent à ce que la recherche d'oocystes ne soit pas faite en cas de diarrhée. Quelques exemples au sein du réseau français sur la cryptosporidiose montrent que si la recherche de *Cryptosporidium* est pratiquée de façon plus systématique en cas de diarrhée chez des patients à risque (jeunes enfants, patients immunodéprimés), le diagnostic de cryptosporidiose est loin d'être exceptionnel dans notre pays.

En pratique, l'examen des selles après coloration de Ziehl-Neelsen modifiée reste la technique la plus simple à réaliser, pour un faible coût et de bonnes performances. L'utilisation complémentaire d'un test immunochromatographique peut être suggérée en cas de doute, mais au prix d'un coût supplémentaire. Dans les deux cas, le résultat est acquis dans la journée et permet d'apporter une réponse rapide au clinicien qui, en dehors du traitement du patient, devra recommander les mesures nécessaires pour éviter la survenue de cas collatéraux.

Précisons enfin que le réseau français sur la cryptosporidiose peut apporter son aide et son expertise auprès des praticiens et des biologistes, sachant que le maillage constitué par les 39 laboratoires supports du réseau couvre l'ensemble de la métropole, les Antilles et la Guyane françaises (16, 17).

Tableau II - Avantages et inconvénients des principales techniques de diagnostic coprologique de la cryptosporidiose.

Techniques	Avantages	Inconvénients
Ziehl-Neelsen modifiée à froid (Réactifs RAL)	Facile et assez rapide à réaliser (90 min) La moins chère. Conservation illimitée Diagnostic : cryptosporidies, <i>Isospora belli</i> , <i>Cyclospora</i>	Nécessite un microscopiste expérimenté Artefacts Lecture objectif 40 (confirmation à l'objectif 100)
Auramine phénol : Kit Fluo-RAL pour mycobactéries Auramine (technique BAAR)	Facile et rapide (35 min) Lecture en IF	Microscope à fluorescence Conservation limitée Risque de faux positifs Toxicité des produits Ne permet pas le diagnostic de <i>Isospora belli</i> et <i>Cyclospora</i>
Immunofluorescence directe Merifluor C/G	Assez rapide à réaliser : 30 min de coloration et 30 min de séchage Dépecte cryptosporidies (Acs monoclonal anti-oocystes) et <i>Giardia</i>	Microscope à fluorescence (FITC) Ne convient pas pour des selles conservées en PVA ou MF/MIF Risque de faux positifs Ne permet pas le diagnostic d' <i>Isospora</i> et de <i>Cyclospora</i>
Tests immunochromatographiques - ImmunoCard STAT <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i> Meridian Bioscience - RIDA Quick <i>Cryptosporidium</i> , R-Biopharm - Remel Xpect <i>Cryptosporidium</i> - Crypto-strip Coris Bioconcept (Belgique, distribué en France par Neprotek)	Facile et rapide : 10 à 20 min Bonne spécificité (98-100 %) Bonne sensibilité (74-85 %) pour la majorité des trousse, sur des selles contenant <i>C. hominis</i> ou <i>C. parvum</i> (18, 21)	Faible sensibilité (10-33 %) pour le diagnostic des infections dues à d'autres espèces que <i>C. parvum</i> et <i>C. hominis</i> (18) Coût élevé
Test ELISA - Remel ProSpecT <i>Giardia/Cryptosporidium</i> , Microplate assay - IVD Research <i>Giardia/Crypto Combo</i> ELA - <i>Giardia/Cryptosporidium</i> CHEK	Simple à réaliser, automatisable Bonne spécificité (96,5-100 %) Bonne sensibilité (91-93 %) pour la majorité des trousse, sur des selles contenant <i>C. hominis</i> ou <i>C. parvum</i> (21)	Équipement nécessaire Coût élevé

Abréviations : MF : merthiolate/formol ; MIF : merthiolate/iode/formol ; PVA : alcool polyvinyle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol* 2010 ; **124** : 138-46.
- Gargala G. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. *Parasite*. 2008 ; **15** : 275-81.
- Rossignol JF. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Exp Parasitol* 2010 ; **124** : 45-53.
- Ripert C. et Guyot K. Cryptosporidiosis. C. Ripert (Ed), "Épidémiologie des maladies parasitaires" - Vol III.- "Opportunistes": Editions Médicales Internationales. Cachan : 2003 ; 269-97.
- Fayer R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol* 2010 ; **124** : 90-7.
- Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol* 2010 ; **124** : 80-9.
- Cama V, Gilman RH, Vitar A, Ticona E, Ortega Y, Bern C, Xiao L. Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg Infect Dis* 2006 ; **12** : 1025-8.
- Robinson G, Chalmers RM. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. *Zoonoses Public Health* 2010 ; **57**:e1-13.
- Yoder JS, Harral C, Beach MJ. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cryptosporidiosis surveillance - United States, 2006-2008. *MMWR Surveill Summ* 2010 ; **59** : 1-14.
- Pozio E., G. Rezza, A. Boschini, P. Pezzotti, A. Tamburrini, P. Rossi, M. Di Fine, C. Smacchia, A. Schiesari, E. Gattei, R. Zucconi, P. Ballarini. Clinical cryptosporidiosis and human immunodeficiency virus (HIV)-induced immunosuppression: findings from a longitudinal study of HIV-positive and HIV-negative former injection drug users. *J Infect Dis* 1997 ; **176** : 969-75.
- Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med Microbiol* 2008 ; **52** : 309-23.
- Chalmers RM, Elwin K, Thomas AL, Guy EC, Mason B. Long term *Cryptosporidium* typing reveals the etiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. *Euro Surveill* 2009 ; **14**. pii: 19086.
- Nichols G, Chalmers R, Lake I, Sopwith W, Regan M, Hunter P, et al. Cryptosporidiosis: a report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. Drinking water Directorate Contract Number DWI 70/2/201. Drinking Water Inspectorate 2006. Available from: http://www.dwi.gov.uk/research/completed-research/reports/DWI70_2_201.pdf
- Lake IR, Harrison FC, Chalmers RM, Bentham G, Nichols G, Hunter PR, Kovats RS, Grundy C. Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *Eur J Epidemiol* 2007 ; **22** : 805-11.
- Agence Française de sécurité sanitaire des aliments. Rapport sur "Les infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau : évaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium* sp." Maisons-Alfort : Afssa, 2002 ; 185 p.
- Réseau Cryptosporidie-ANOFEL. Épidémiologie de la cryptosporidiose humaine en France en 2006 et 2007 : Rapport du réseau "Cryptosporidies ANOFEL". *BEH* 2009 ; **1** : 8-11.
- The ANOFEL *Cryptosporidium* National Network*: Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. *Euro Surveill* 2010 ; **15** : pii=19642.
- Agnamey P, Sarfati C, Pinel C, Rabodonirina M, Kapel N, Dutoit E, Garnaud C, Diouf M, Garin JF, Totet A, Derouin F. ANOFEL *Cryptosporidium* National Network. Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: a blind multicenter trial. *J Clin Microbiol* 2011 ; **49** : 1605-7.
- Garcia, L. S., and R. Y. Shimizu. 1997. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for the detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* ; **35** :1526-9.
- Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2011 ; **49** : 918-24.
- Chalmers RM, Campbell BM, Crouch N, Charlett A, Davies AP. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J. Med. Microbiol.* 2011 ; **60** : 1598-1604.