

La cryptosporidiose en France : une cause méconnue de diarrhée aiguë

Dr Gilles Gargala

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,
CHU de Rouen

Microbiologie Clinique
27 septembre 2013

Monsieur Rodolphe L..., 33 ans

- Sur le plan rénal :

Insuffisance rénale chronique sur polykystose rénale autosomique dominante avec insuffisance rénale terminale en septembre 1993 nécessitant une prise en charge en hémodialyse.

Transplantation rénale le 30.04.1995

Traitement : Cellcept[®] - ciclosporine (Néoral[®]),

- Sur le plan gastro-entérologique :

Diarrhée depuis la mise sous Cellcept

En juillet 2010: fibroscopie haute et coloscopie réalisées (biopsies sont normales)

l'origine médicamenteuse de la diarrhée est évoquée

Diarrhée (2 à 3 selles par jour) depuis le 06/10/2013.

L'examen parasitologique des selles, « pâteuses », du 13/10 met en évidence la présence de quelques **cryptosporidies**

L'interrogatoire du patient apprend que sa diarrhée s'est déclarée après celle de son fils Jules âgé de 14 mois (qui fréquente « les bébés nageurs »)

- son épouse (immunocompétente) présentera une diarrhée 3 jours après le début des troubles digestifs de son mari

- le génotypage des 3 isolats (Pr F. Dalle, CHU de Dijon) révélera qu'ils appartiennent à l'espèce

Cryptosporidium hominis

La cryptosporidiose humaine

On peut distinguer 3 entités :

- Dès 1980, elle est reconnue comme responsable d'épidémies ou de cas sporadiques de diarrhées principalement chez l'enfant en zone tropicale ou chez les professionnels exposés
- A partir de 1983, elle émerge avec l'épidémie de SIDA au cours duquel elle met en jeu le pronostic vital des patients immunodéprimés
- A partir de 1993, elle est reconnue comme étant à l'origine d'épidémies transmises par l'eau chez des sujets immunodéprimés et immunocompétents et devient un problème de santé publique

Cryptosporidium : infectiosité

forme infectante

oocyste (5 μ m)

pouvoir infectant dans
l'environnement

sol : 4 à 12 mois
3 mois dans les eaux salées
risque potentiel de contamination
humaine par les coquillages

dose infectante

hôte
immunodéprimé: < 10 oocystes
immunocompétent: DI₅₀ ~ 130

caractère infectieux de
l'eau

1 à 3 oocystes de
Cryptosporidium /10L

Facteurs identifiés comme favorisant la transmission sporadique de la cryptosporidiose humaine

- Bain en eau douce (piscine, lac)
- Contact avec un sujet diarrhéique
- Voyage en pays d'endémie
- Contact animal (bovins et ovins surtout)
- Changement des couches de nourrissons
- Consommation d'eau du robinet

Quand évoquer le diagnostic de cryptosporidiose ?

Chez tous les patients présentant une diarrhée, aiguë ou persistante, surtout s'il existe une immunodépression

Chen, XM *et al.* *New England Journal of Medicine*, 2002

Cryptosporidiose: pathogénicité

- Gastroentérite d'évolution spontanément résolutive (en 1 à 2 semaines) chez les individus immunocompétents
- Chez les patients ayant un nombre de lymphocytes T CD4+ en dessous de $100/\text{mm}^3$: syndrome diarrhéique sévère, mettant en jeu le pronostic vital
- L'atteinte intestinale peut être associée à une atteinte du pancréas, des voies biliaires et des voies respiratoires chez les patients atteints de déficit immunitaire T (primitifs ou acquis)
- C'est une menace pour les patients atteints d'hémopathies malignes, transplantés d'organe ou de moelle osseuse nécessitant une immunosuppression thérapeutique

Signes cliniques de la cryptosporidiose du sujet immunocompétent

- Diarrhée (92 %):
 - temps d'incubation moyen de 9 jours, fréquence journalière de 13 selles non moulées à liquides
 - selles mêlées parfois de mucus mais rarement de sang et de leucocytes
- Spasmes abdominaux (45 %)
- Fièvre modérée (< 39° C) (36 %)
- Nausées et vomissements (51 %)

(Re)connaissance de la cryptosporidiose en France

- En France, la recherche de *Cryptosporidium* n'est pas réalisée en routine dans le cadre de l'examen parasitologique des selles dit standard
(recherche rarement prescrite par les cliniciens)
- Elle est considérée comme une maladie rare
- La cryptosporidiose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire
- Elle demeure sous-diagnostiquée

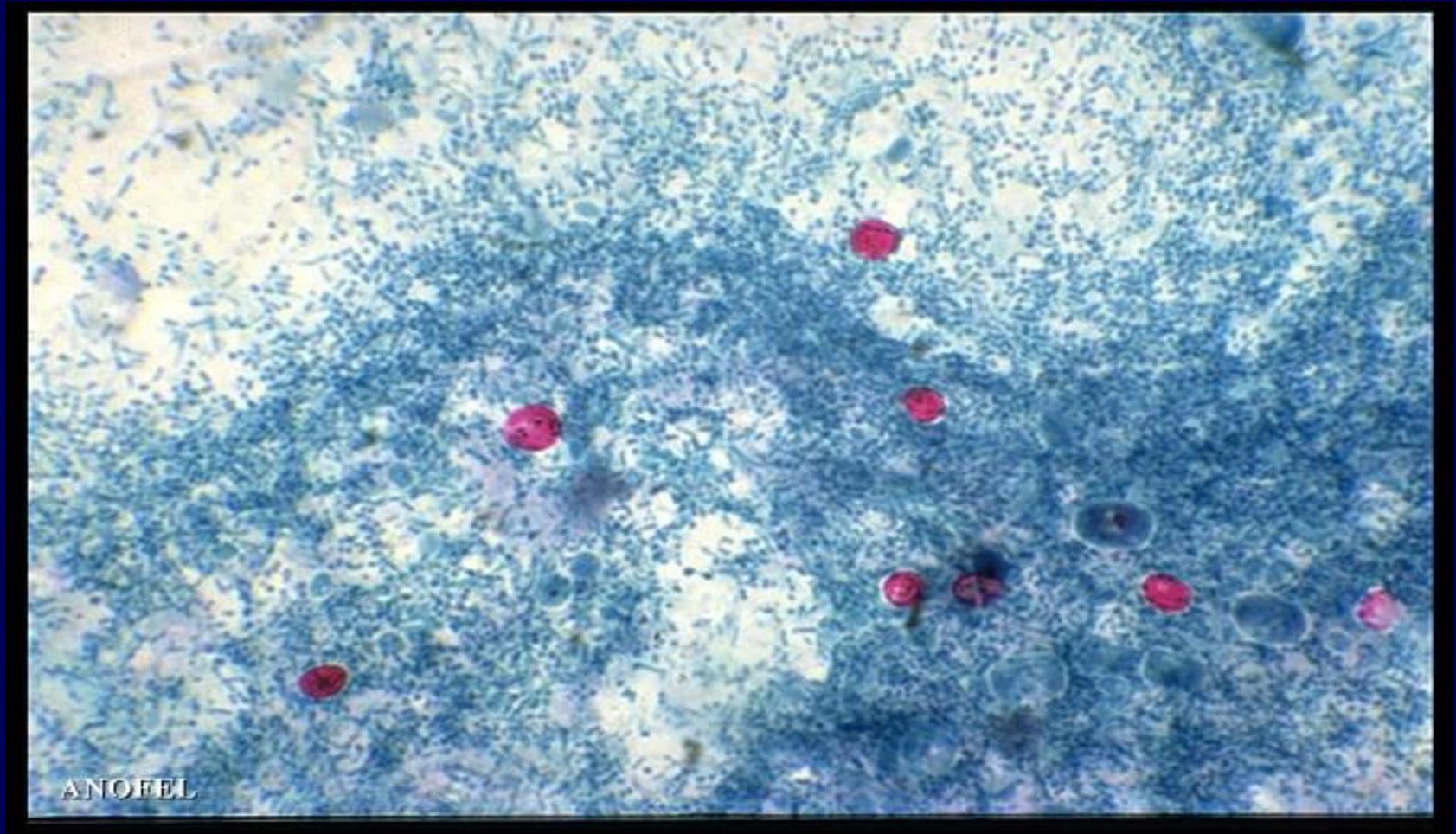
Méthodes de détection des cryptosporidies

« le plus souvent, une seule selle suffit »

Problème: prescription pour une recherche spécifique !

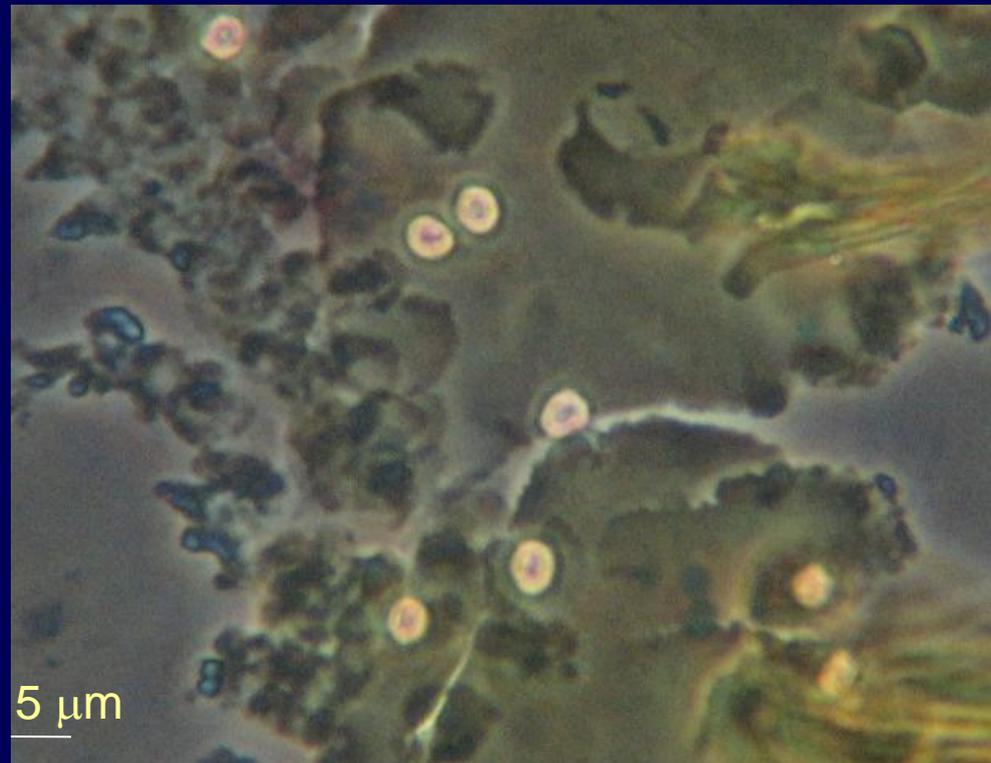
- Coloration de Henricksen-Pohlenz (Ziehl-Neelsen modifié)
- Coloration de Heine (lecture en contraste de phase)
 - corrélation significative entre technique de Heine et détection des antigènes (C. Paraud, INRA de Niort)
 - permet de détecter d'autres coccidies (*Isospora*, *Cyclospora*...)
- Auramine (fluorochrome)
- Immunofluorescence directe
- PCR: le diagnostic est basé sur l'amplification du gène de l'Hsp70 et/ou du gène de l'ARNr 18S suivi d'un séquençage pour l'identification de l'espèce en cause

Oocystes de *Cryptosporidium* dans les selles

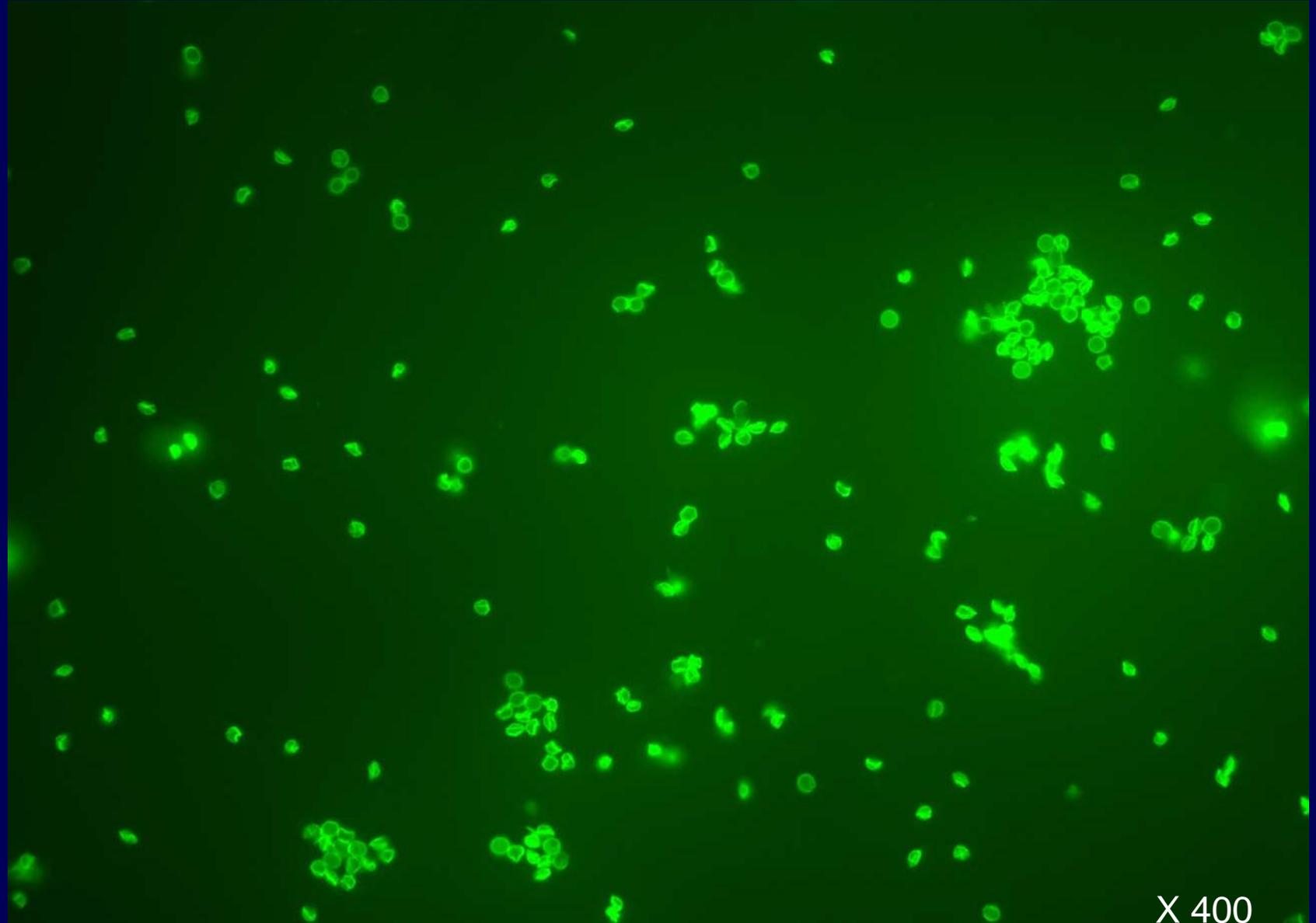


Coloration de Henricksen-Pohlenz (Ziehl Neelsen modifié)

Oocystes de *Cryptosporidium* colorés par la technique de Heine (carbol fuschine) observés en contraste de phase (obj. 40)



Oocystes de *Cryptosporidium parvum* marqués par anticorps spécifiques de la paroi et couplés à la fluorescéine



Evaluation of Four Commercial Rapid Immunochromatographic Assays for Detection of *Cryptosporidium* Antigens in Stool Samples: a Blind Multicenter Trial[∇]

Patrice Agnamey,¹ Claudine Sarfati,² Claudine Pinel,³ Meja Rabodoniriina,⁴ Nathalie Kapel,⁵ Emmanuel Dutoit,⁶ Cécile Garnaud,³ Momar Diouf,⁷ Jean-François Garin,² Anne Totet,¹ and F. Derouin^{2*} for the ANOFEL *Cryptosporidium* National Network

In a multicenter study, potassium dichromate-preserved stools from patients infected with *Cryptosporidium parvum* ($n = 20$), *C. hominis* ($n = 20$), and other *Cryptosporidium* species ($n = 10$) and 60 controls were examined using four immunochromatographic assays. Assay sensitivity ranged between 50.1% and 86.7% for *C. parvum* and *C. hominis* but was <35% for other species.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2011, p. 1605–1607

Vol. 49, No. 4

Détection de coproantigènes par immunochromatographie :

- RidaQUICK[®] *Cryptosporidium* (r-biopharm)
- ImmunoCard STAT[®] *Crypto/Giardia* (Meridian Bioscience)
- Crypto-Strip (Coris BioConcept)
- Remel-Xpect *Cryptosporidium* (Remel Inc.)

Assay	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<i>Cryptosporidium</i>		
ProSpecT microplate	70.3	99.5
ImmunoCard STAT!	67.6	99.0
Acid-fast stained smears	78.4	100.0

Le réseau *Crypto*-ANOFEL

Nombre de laboratoires participant:

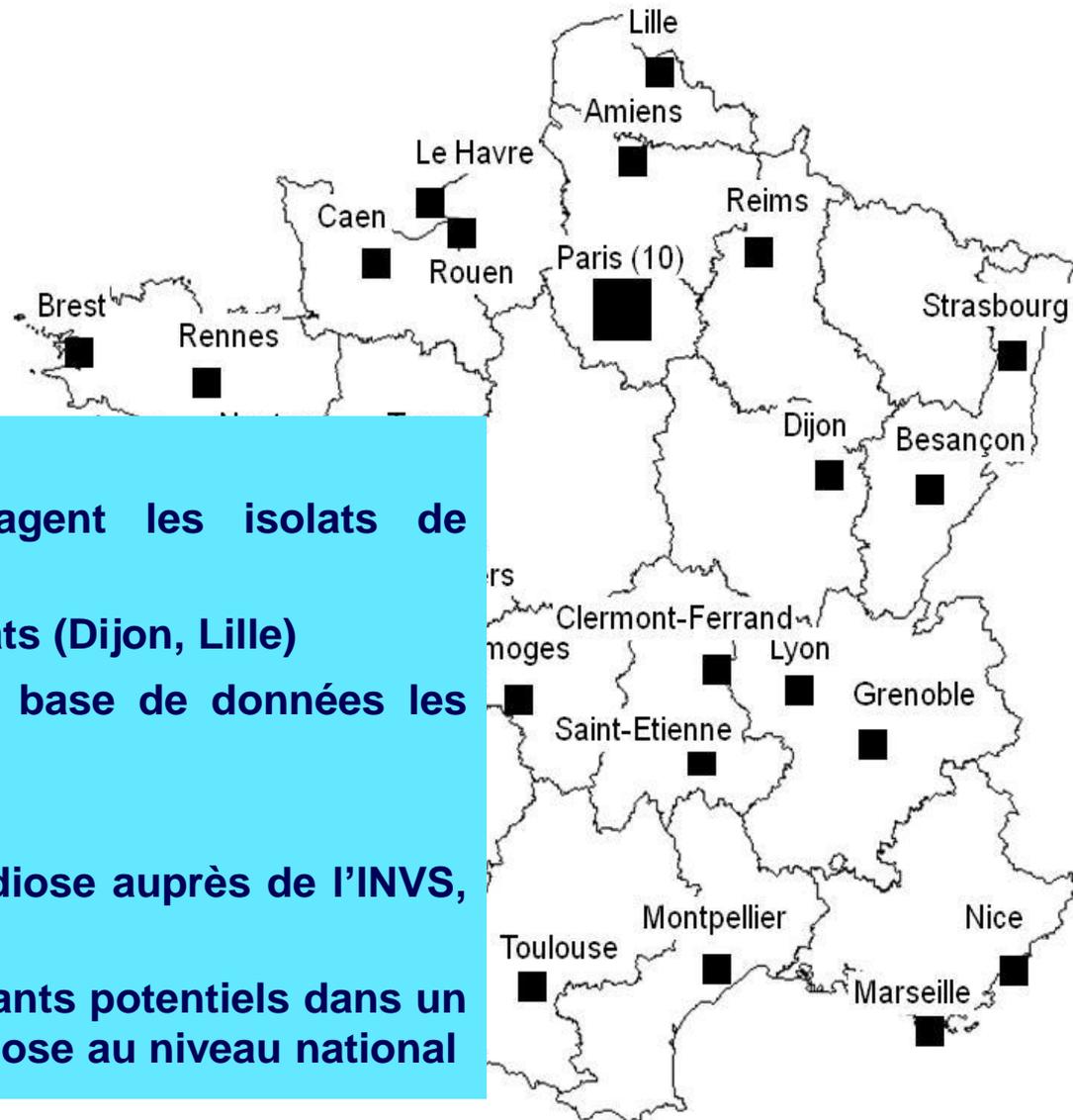
- 31 en 2004
- 39 en 2011
- 42 en 2012

(laboratoires hospitaliers, Biomnis, St Valéry en Caux)

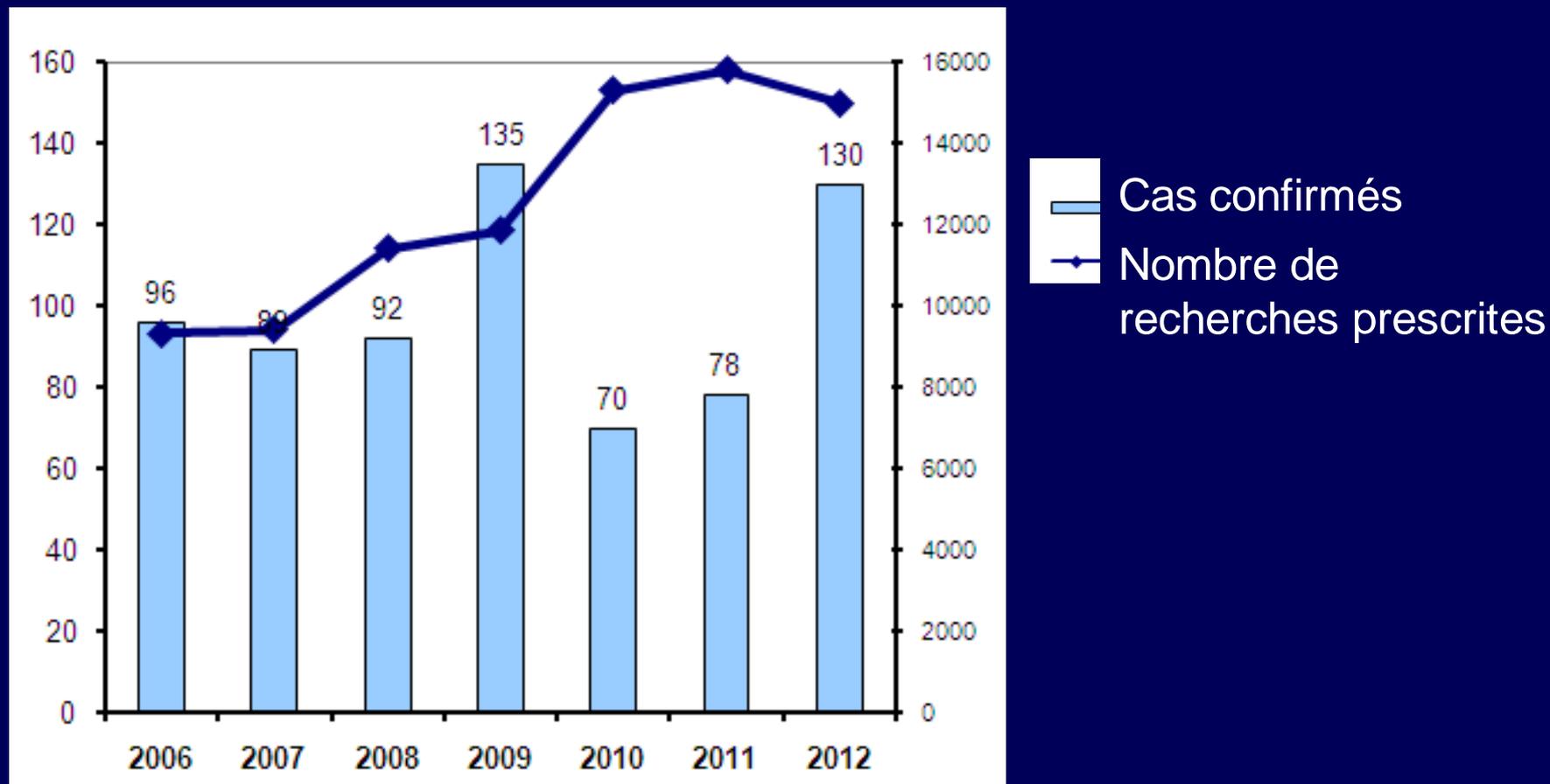
+ Anses (Niort et Paris)

Rôle des centres de collecte:

- ✓ reçoivent, stockent et se partagent les isolats de *Cryptosporidium*
- ✓ identification moléculaire des isolats (Dijon, Lille)
- ✓ reçoivent et enregistrent dans la base de données les renseignements relatifs aux cas
- ✓ réalisent les analyses
- ✓ rapportent les cas de cryptosporidiose auprès de l'INVS, une fois par an
- ✓ procurent des aliquots aux requérants potentiels dans un but de recherche sur la cryptosporidiose au niveau national



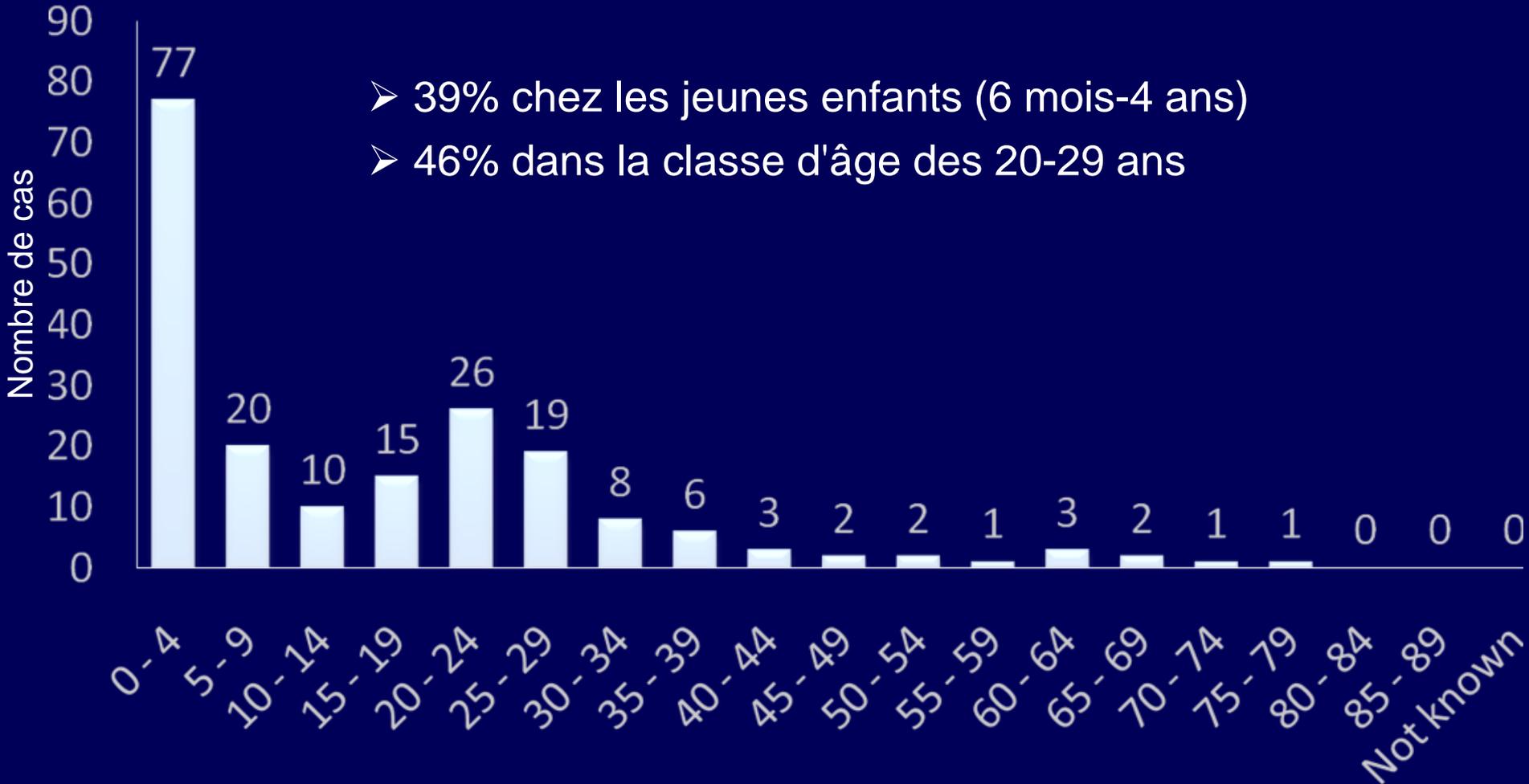
Nombre de cas de cryptosporidiose rapportés annuellement, sur 7 ans de 2000 à 2012 (n = 669)



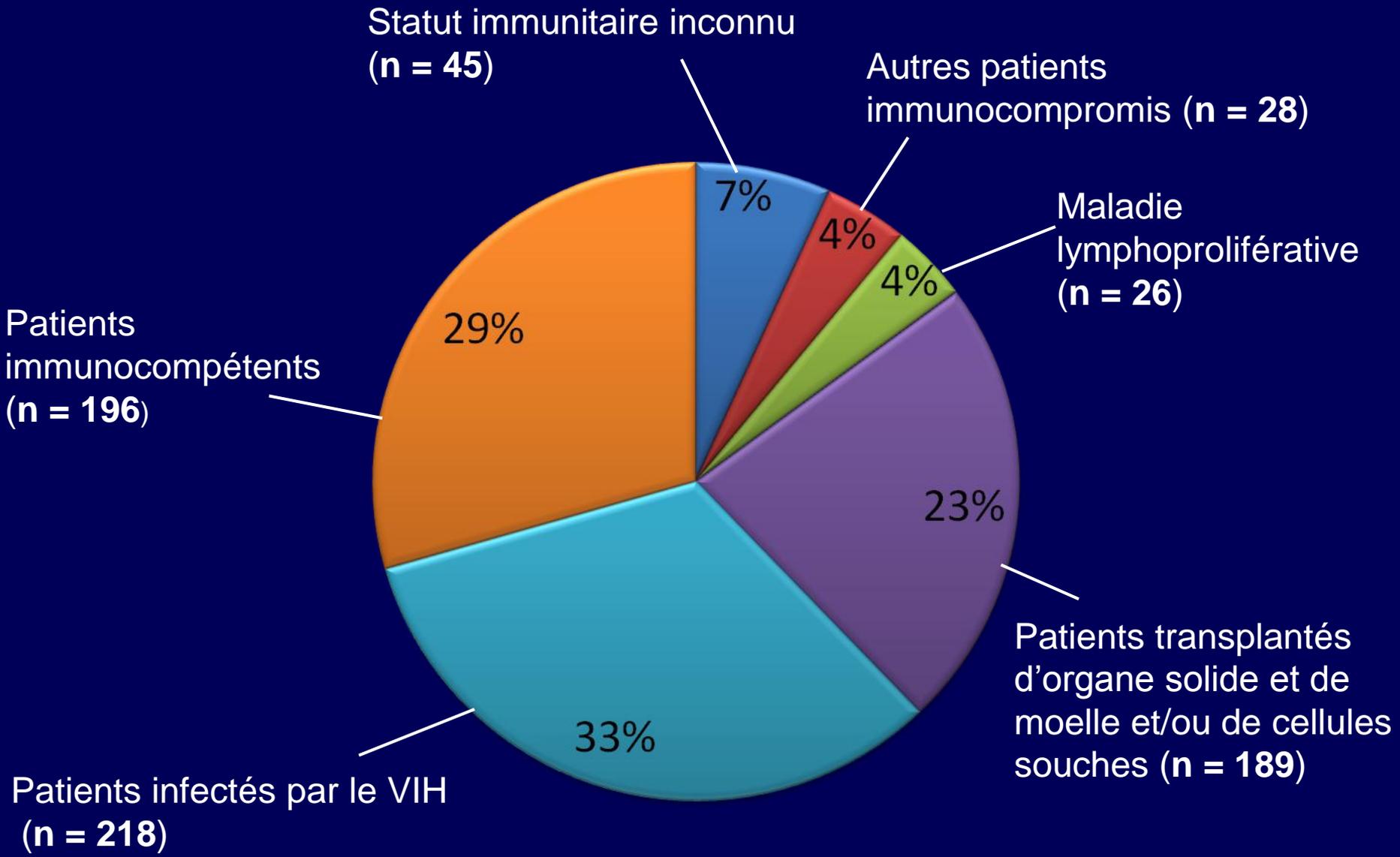
En 2012, 28 laboratoires ont signalé des cas, la détection de *Cryptosporidium* a été réalisée :

- par la coloration de Ziehl Neelsen modifiée pour 26 des 28 (5/26 avec test immunochromatographique)
- par la coloration Heine pour 2/28

Nombre de cas rapportés de cryptosporidiose, par groupe d'âge de patients immunocompétents de 2006 à 2012 (n = 196)

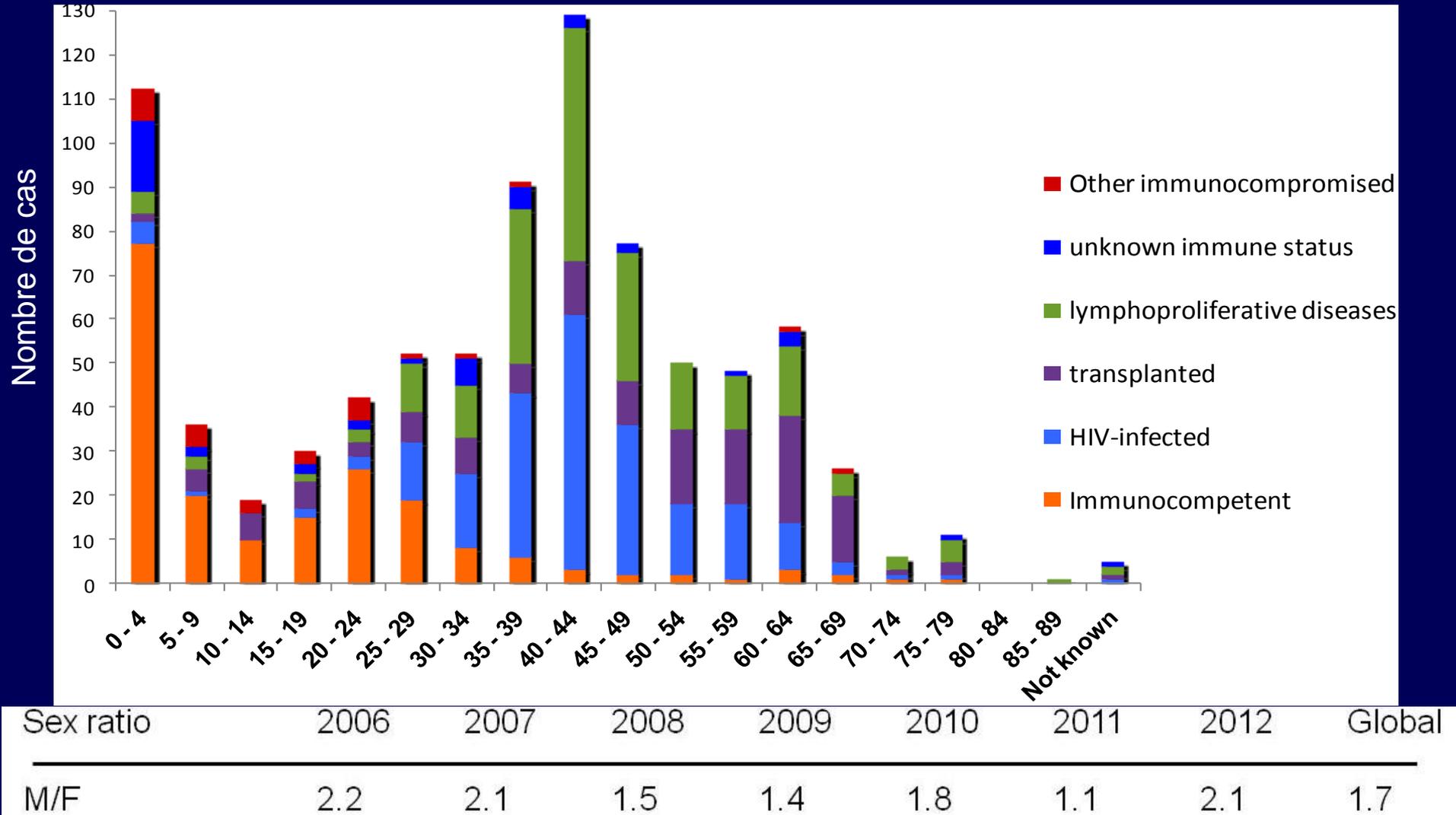


Nombre et pourcentage de cas de cryptosporidiose en fonction de la pathologie sous-jacente des patients de 2006 à 2012



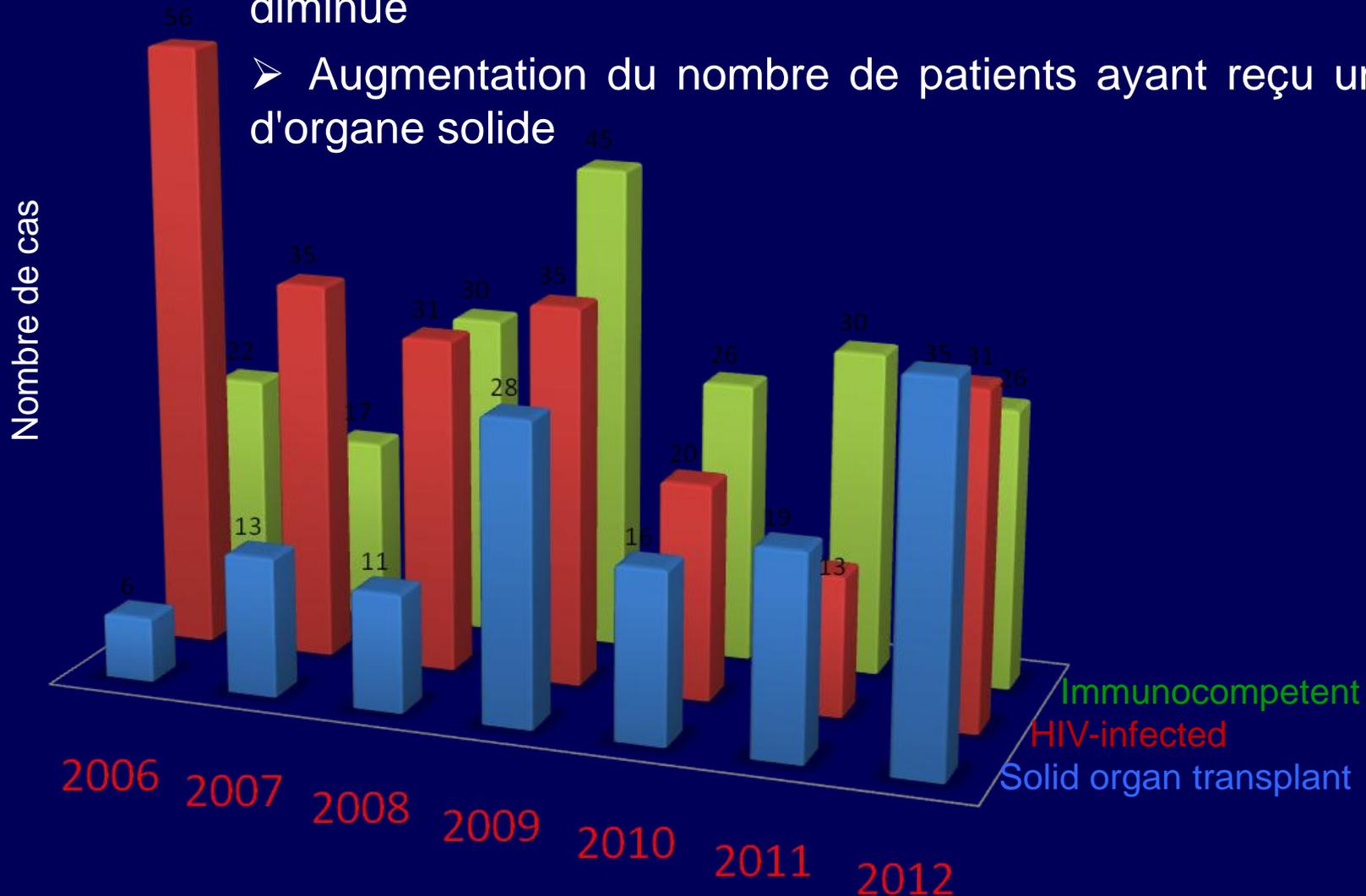
Nombre de cas de cryptosporidiose, par groupe d'âge et selon la pathologie sous-jacente, le sex-ratio de 2006 à 2012

- Enfants et adultes jeunes (< 24 ans) : essentiellement immunocompétents
- patients > 25 ans: essentiellement immunocompromis



Evolution du nombre de cas chez les patients transplantés d'organe solide, infectés par le VIH et immunocompétents de 2006 à 2012

- 2006-2011: le nombre de patients infectés par le VIH a diminué
- Augmentation du nombre de patients ayant reçu une greffe d'organe solide



La cryptosporidiose chez les patients après transplantation d'organe solide

- 42 cas entre 2006 et 2010 ont été rapportés par Lanternier *et al.* (ICAAC 2011) avec un taux de mortalité de 7 %
- 18% des épisodes de diarrhée infectieuse chez les greffés rénaux en Pédiatrie (Bandin *et al.*, 2009)

En 2012:

- 35 cas chez les patients transplantés (foie: 5 , poumon: 1, reins: 21, non précisé: 8)
 - **Transplantés de rein:**
 - âge moyen: 46,8 années [9-68], tous diarrhéiques, douleurs abdominales (10/21), perte de poids (11/21)
 - voyages à l'étranger rapporté: 1; baignade dans de l'eau récréationnelle: 5; diarrhée dans la famille : 5

Espèces de *Cryptosporidium* identifiées (2006-2012)

Actuellement, environ 22 espèces de *Cryptosporidium* sont validées, 13 ayant été retrouvées chez l'Homme

Caractérisation moléculaire par séquençage de l'ADNr18S :

C. parvum (espèce zoonotique) identifié chez 253 patients (54%)

C. hominis (espèce anthroponotique) identifié chez 173 patients (37%)

9 % des patients infectés par une autre espèce ou génotypes

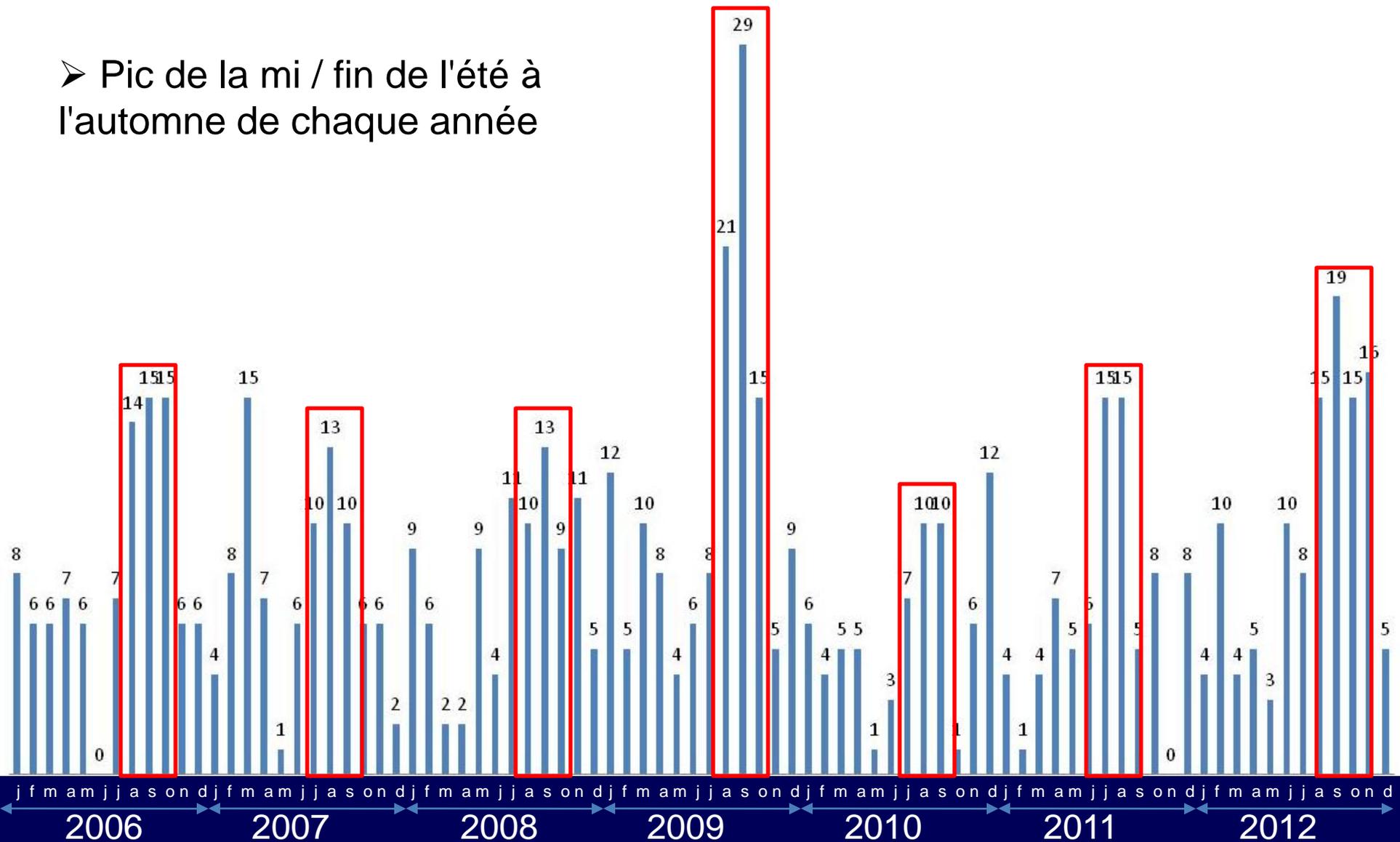
species or genotype	2006	2007	2007	2008	2008	2009	2010	2011	2012	Total
<i>C. parvum</i>	32	33	33	51	51	52	28	19	38	253
<i>C. hominis</i>	30	32	30	14	14	17	18	13	29	173
<i>C. felis</i>	7	2	2	3	3	3		2	3	20
<i>C. meleagridis</i>	2			1	1	1	1	3	1	9
<i>C. canis</i>				1	3	2	1			5
<i>C. cuniculus</i>					3	1	1	1		3
chipmunk genotype					1					1
Other genotypes	1	1			2	1				4
Total	73	73	57	57	73	107	49	38	71	469

Espèces autres que *C. parvum* et *C. hominis* identifiées chez des patients immunocompétents

- *C. felis* 3 cas
- *C. meleagridis* 3 cas
- *C. canis* 1 cas

Répartition mensuelle des cas de cryptosporidiose en France, 2006-2012

➤ Pic de la mi / fin de l'été à l'automne de chaque année



Place de la cryptosporidiose dans les diarrhées de l'enfant immunocompétent en Haute-Normandie: protocole de l'étude

La prévalence de la cryptosporidiose chez les enfants est inconnue en France

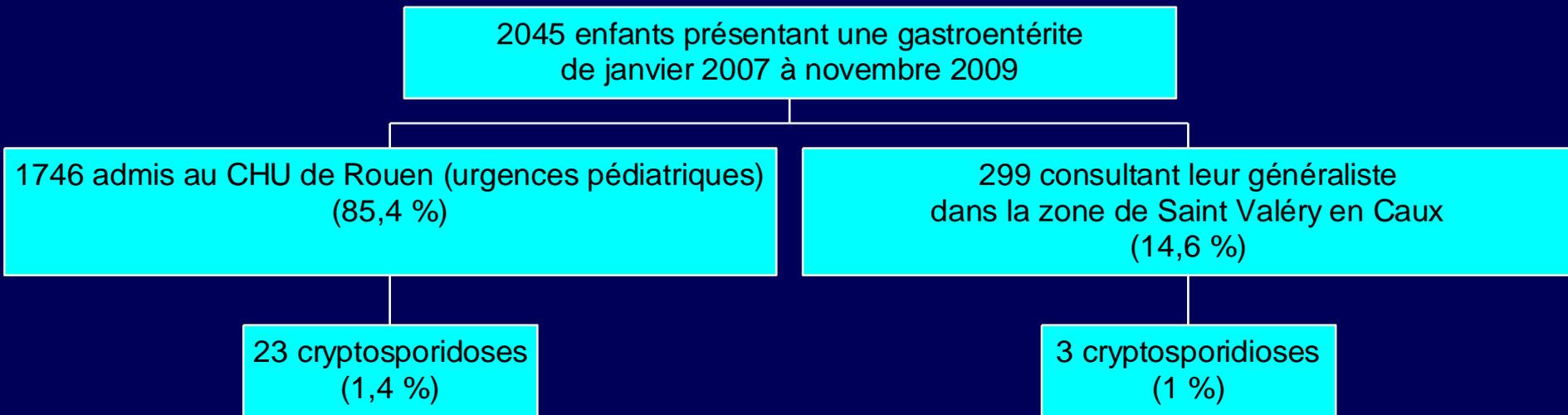
But de l'étude : évaluer la fréquence de *Cryptosporidium* comme agent causal de diarrhée aiguë chez les enfants immunocompétents

Sur une période de 34 mois (entre janvier 2007 et novembre 2009), la recherche de *Cryptosporidium* a été effectuée sur des échantillons de selles d'enfants (âgés de 6 mois à 16 ans) ayant une gastroentérite aiguë.

Les enfants étaient vus:

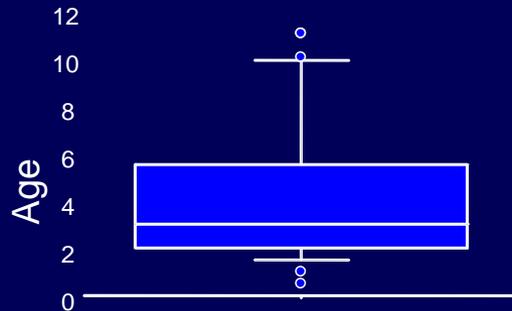
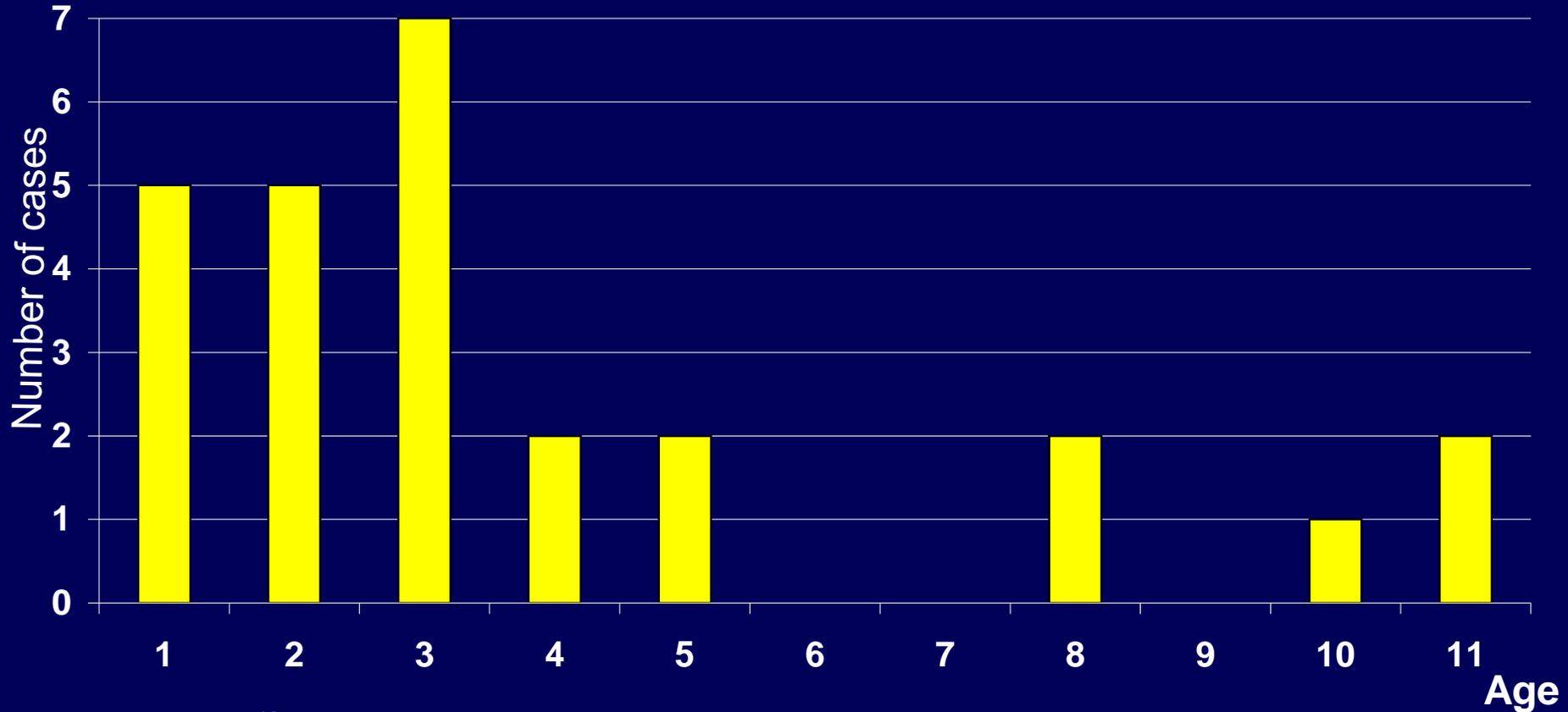
- soit au service des urgences pédiatriques du CHU de Rouen (Pr JC Marguet), selles testées au laboratoire de Parasitologie du CHU de Rouen (Pr L. Favennec)
- soit par des médecins généralistes de la région de Saint Valéry en Caux (60 km de Rouen), selles testées dans un laboratoire privé de Saint Valéry (Dr D. Leméteil)

Place de la cryptosporidiose dans les diarrhées de l'enfant immunocompétent en Haute-Normandie: résultats



- Aucun des enfants ayant une cryptosporidiose n'avait d'immunodéficience (primitive ou induite par des immunosuppresseurs)
- Un enfant était co-infecté par un adénovirus
- L'hospitalisation a été nécessaire pour 20/23 patients vus au CHU de Rouen

Répartition selon l'âge (années) des cas (26) de cryptosporidiose chez l'enfant immunocompétent (Rouen 2007-2009)



81 % entre 6 mois et 6 ans

Expression clinique de la cryptosporidiose de l'enfant immunocompétent (Rouen, 2007-2009)

Chez tous les enfants:

- diarrhée (selles surtout liquides): 23/26 (88,5%)

pendant 6,1 jours [3-20] avant le diagnostic

- vomissements: 20/26 (77%)

- fièvre: 12/26 (46%)

Chez les enfants hospitalisés:

- vomissements: 19/20 (95%)

- douleurs abdominales: 5/20 (25%)

- déshydratation (modérée à sévère): 8/20 (40%)

Aucun n'a reçu de traitement spécifique mais, dans tous les cas, la diarrhée a guéri en une semaine

Epidémiologie de la cryptosporidiose de l'enfant (2007-2009)

Espèce	Lieu de résidence	Contact avec des animaux de ferme (bovins)	Contact avec eau récréatives	Voyage à l'étranger dans les 15 jours précédant les troubles
<i>C. parvum</i> : 18/26 (69%)	rural : 7/20 semi-rural: 3/20	7/26 (27%)	1/26	6/26 (23%)
<i>C. hominis</i> : 8/26 (31%)	urbain : 10/20			

4 des 8 infections par *C. hominis* concernaient des enfants ayant voyagé hors de France avant le début des troubles contre 2 sur 18 pour l'infection par *C. parvum*

Le syndrome de l'intestin irritable (SII)

Le SII est l'un des troubles gastro-intestinaux les plus fréquemment diagnostiqués

la gastro-entérite aiguë infectieuse est un facteur de risque de d'installation d'un SII (= SII-PI, 7-31% des patients ayant fait une gastroentérite)

Les critères diagnostiques dits Critères de ROME III¹ doivent comporter les éléments suivants:

1) Inconfort ou douleurs abdominales associées à au moins 2 des éléments suivants:

- a. une amélioration avec la défécation
- b. apparition associée à un changement de la fréquence des selles
- c. apparition associée à un changement d'aspect des selles

2) Absence d'anomalie anatomique, de processus inflammatoire, métabolique ou néoplasique

Les critères doivent être présents au moins une fois par semaine pendant au moins deux mois avant le diagnostic

Dans notre petite cohorte, des enfants ont-ils développé un SII-post infectieux?

- Au moins 2 ans après leur épisode de cryptosporidiose aiguë
- Sur les 19 enfants dont les parents ont été joints par téléphone et soumis à un questionnaire à la fin de l'année 2011
- 16 n'avaient pas de critères de SII selon les critères de Rome III
- 3 (15,7%) répondaient aux critères de Rome III pour IBS

Au moment de la survenue de la diarrhée aiguë, ils étaient:

- âgés de 13, 17 et 24 mois (2 filles, 1 garçon)
- non déshydratés
- infectés par *C. parvum*

La cryptosporidiose de l'enfant

- La prévalence observée est comparable aux données publiées pour les autres pays :

0-3% en Europe (Guarino et al. 2008); 1,4% en Angleterre (Baxby et Hart, 1986); 1,6% en Allemagne de l'Ouest (Freidank & Kist, 1987); 0,4-1% aux Etats-Unis (Rose & Slifko, 1999)

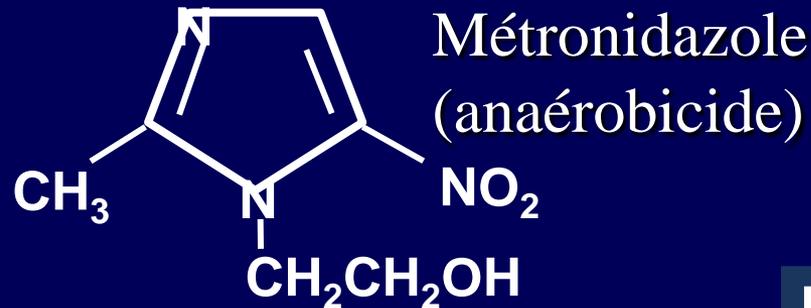
- La cryptosporidiose ne diffère pas en cela des autres causes de gastroentérite aiguë
- L'absence de prescription de recherche spécifique et probablement de traitement facilement disponible sont les facteurs conduisant à une méconnaissance de l'épidémiologie de la cryptosporidiose en France
- L'absence de diagnostic conduit à un manque de mesures spécifiques de prévention pour limiter son impact global sur la santé
- Comprendre la relation entre la cryptosporidiose et les troubles fonctionnels intestinaux serait important afin de prendre les mesures préventives efficaces

Traitement de la cryptosporidiose: chimie du nitazoxanide

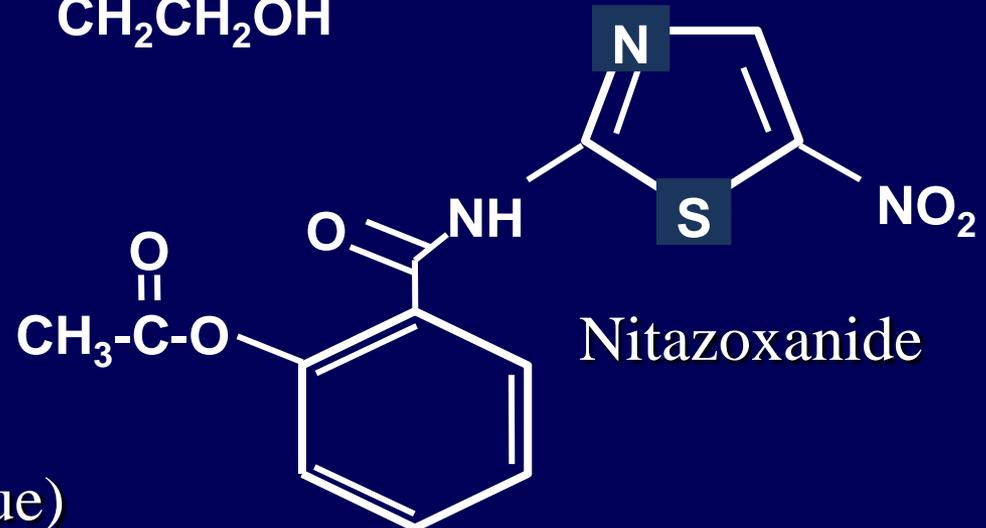
- Premier thiazolide [2-acétyloxy-*N*-(5-nitro 2-thiazolyl) benzamide] développé dans les années 80 comme traitement des infections intestinales à protozoaires et à helminthes, actif contre bactéries anaérobies, protozoaires, helminthes et virus.



Niclosamide (anti-helminthique)

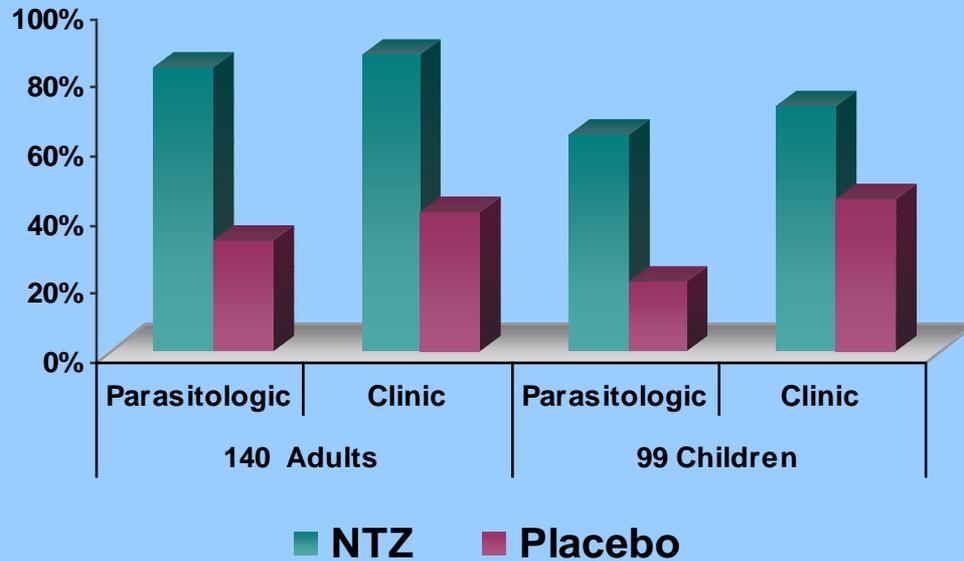


Métronidazole
(anaérobicide)



Nitazoxanide

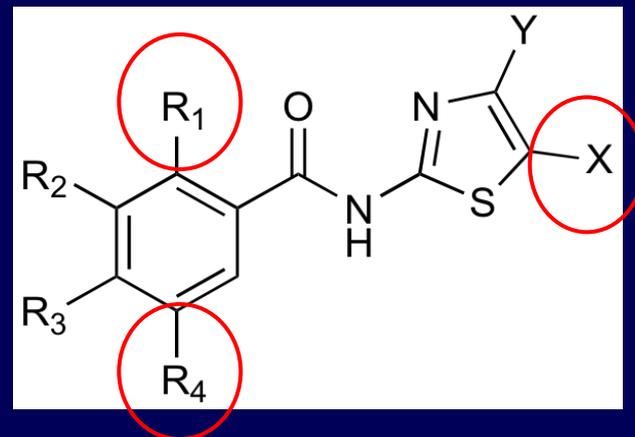
Traitement de la cryptosporidiose par le nitazoxanide étude chez 239 patients immunocompétents



- Rossignol *et al. J Inf Dis.* 2001
- Rossignol *et al. Clin Gastroenterol Hepatol.*
- Amadi *et al. Lancet* 2002

- Le nitazoxanide est efficace dans le traitement de la cryptosporidiose du sujet immunocompétent
- Les données chez les patients immunocompromis sont controversées et une activité insuffisante est décrite chez les patients ayant des lymphocytes T CD4+ < 50 /mm³

Les dérivés chlorothiazolides sont de puissants inhibiteurs de *C. parvum* développement dans les cellules HCT-8 (inhibition maximale > 95%)



Thiazole Ring
Substituents

Benzene Ring
Substituents

Agent	MWt	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (mg/L)	IC ₉₀ (mg/L)	IC ₅₀ (μM)	IC ₉₀ (μM)
NTZ	307.3	NO ₂	H	OAc	H	H	H	1.2	10	3.9	32.6
TIZ	265.3	NO ₂	H	OH	H	H	H	0.55	3.1	2.3	11.7
RM5038	296.7	Cl	H	OAc	H	H	H	1	4.5	3.3	11.1
RM4848	254.7	Cl	H	OH	H	H	H	1.6	4.4	10.2	17.2
RM4865	310.8	Cl	H	OAc	H	H	CH ₃	0.45	3.8	0.3	12.2
RM4850	268.7	Cl	H	OH	H	H	CH ₃	0.6	6.7	2,2	24.9

Un grand merci à

**UPRES-EA3800
FACULTE DE MEDECINE ET
PHARMACIE
ROUEN
L. Favennec
L. Le Goff
D. Lemeteil
A. François
C. Dumant**

**Les membres du réseau Crypto-
ANOFEL**

*I Accoceberry, P Agnamey, A Angoulvant, D
Aubert, C Aznar, D Basset, P Bastien, G Belkadi,
A Berry, J Bonhomme, A Bonnin, F Botterel, M-E
Bougnoux, P Bourée, P Buffet, M Cambon, B
Carme, G Certad, B Couprie, F Dalle, E
Dannaoui, M-L Darde, A Datry, L de Gentile, E
Dei-Cas, B Degeilh, F. Derouin, N Desbois, JM
Dewitte, TH Duong, J Dupouy-Camet, A
Faussart, P Flori, N Gantois, F Genouillet, M-L
Grillot, D Haouchine, S Houzé, D Jamet, N
Kapel,, M-D Linas, D Magne, P Marty, C-J Mary, J
Menotti, M Miegeville, G Nevez, M Nicolas, C
Pinel, P Poirier, C Pomares-Estran, M
Rabodonirina, C Raccurt, M-H Rodier, C Sarfati,
M Thellier, A Totet, F Touafek, O Villard, I
Villena, H Yera.*

**ROMARK CENTER FOR DRUG
DISCOVERY**

**JF Rossignol (Tampa, Florida)
A. Stachulsky**

**UNITE DE PATHOLOGIE AVIAIRE
ET DE PARASITOLOGIE
INRA, NOUZILLY**

**M. Naciri
R. Mancassola
G. Fort**