



20th AfWA International Congress and Exhibition 2020 Breaking new grounds to accelerate access to water and sanitation for all in Africa

La mise en place des méthodes de recherche de Cryptosporidium et Giardia dans les eaux à L'ONEE-Branche Eau

23rd – 24th February 2020, Kampala, Uganda

EL ALAMI Mohammed [DCE/ONEE-BO]



SOMMAIRE



1

Introduction

2

Généralité sur Cyptosporidium & Giardia

3

Réglementation

4

Méthode de Recherche et dénombrement

INTRODUCTION



- ◆ Les parasites *Cryptosporidium* et *Giardia* ont été reconnus par l'OMS , le Printing Water Inspectorat (Canada) et l'United States Environmental Protection Agency comme un problème majeur de la santé publique.
- ◆ La Giardiase humaine est la parasitose intestinale la plus répandue dans le monde.

PRINCIPALES ÉPIDÉMIES DE CRYPTOSPORIDIOSES RECENSÉES LIÉES À L'EAU



93% des épisodes documentés sont survenus en Amérique du Nord et en Europe

1984 Texas - USA

1^{er} cas documenté d'épidémie liée à *Cryptosporidium*

1993 Milwaukee –USA

840 000 consommateurs exposés, 403 000 malades, 4 400 hospitalisations, **69 décès** (*Mac Kenzie et al., 1994*)

1995 Pays Bas

15 cas, 1^{ère} épidémie détectée aux Pays Bas, aucun malade ne présentait de déficit immunitaire (*Van Asperen et al., 1996*)

1998 France (Sète)

150 enfants au minimum *Cryptosporidium sp.* identifié dans 17% des selles de patients. Point de captage contaminé par une rivière en crue (*Guyonnet et Claudet, 2002*)

L'épidémie de Milwaukee a conduit à une prise de conscience de l'importance des épidémies à Cryptosporidies, de l'inadaptation des moyens de surveillance et de la nécessité de développer une recherche spécifique sur ce parasite et les moyens de l'éliminer

RÉGLEMENTATION



Royaume Unis

Australie - Pas de réglementation mais des recommandations

Crypto ≤ 1 oocyste/10 litres d'eau produite + suivi de la turbidité

Europe

Directive 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

pas de limite de qualité

Canada - Québec

L'article 5 du règlement Québécois prévoit que le traitement des eaux de surface ou souterraines influencé par les eaux de surface doit éliminer ou inactiver **Cryptosporidium 99,0% (2 log)/Giardia 99,9% (3 log)**.

France

- Eau de consommation "ne doit pas contenir un nombre ou une concentration ..., de parasites...constituant un danger potentiel pour la santé..."

- Eau conditionnée : absence de Cryptosporidium et Giardia

USA

Objectifs de résultats

- Recherche systématique dans l'eau potable [depuis le 14 janvier 2002]
- **Ouvrage de traitement doit éliminer ou inactiver Giardia > 3 log / Cryptosporidium > 2**

Maroc

Maroc [NM 03.7.001 relative à la qualité des eaux d'alimentation humaine]

L'eau d'alimentation humaine ne doit contenir en quantités dangereuses ni microorganismes, ni substances chimiques nocifs pour la santé ; on se référera aux Directives de qualité pour l'eau de boisson de l'OMS

Australie

Pas de réglementation mais des recommandations

Pas de seuil d'alerte de contamination

LA PROBLÉMATIQUE SANITAIRE DE LA CONTAMINATION DES EAUX PAR LES OOCYSTES DE CRYPTOSPORIDIUM SPP



Forme infectante	Oocystes (5µm) 1009 Kg/m ³
Source principale	bovins
Pouvoir infectant dans l'environnement	Sol : 4 à 12 mois 18 mois dans les eaux froides 3 mois dans les eaux salées Infection de mammifères marins Risque potentiel de contamination humaine par les coquillages
Dose infestante	Hôte immunodéprimé (ID) : < 10 oocystes Immunocompétent : ~130 oocystes
Caractère infectieux de l'eau	1 à 3 oocyste/10L
Principal symptôme	Diarrhée, mise en jeu du pronostic vital chez les ID, dyspepsie

Les rencontres de l'ANSES, 30/11/11

LA PROBLÉMATIQUE SANITAIRE DE LA CONTAMINATION DES EAUX

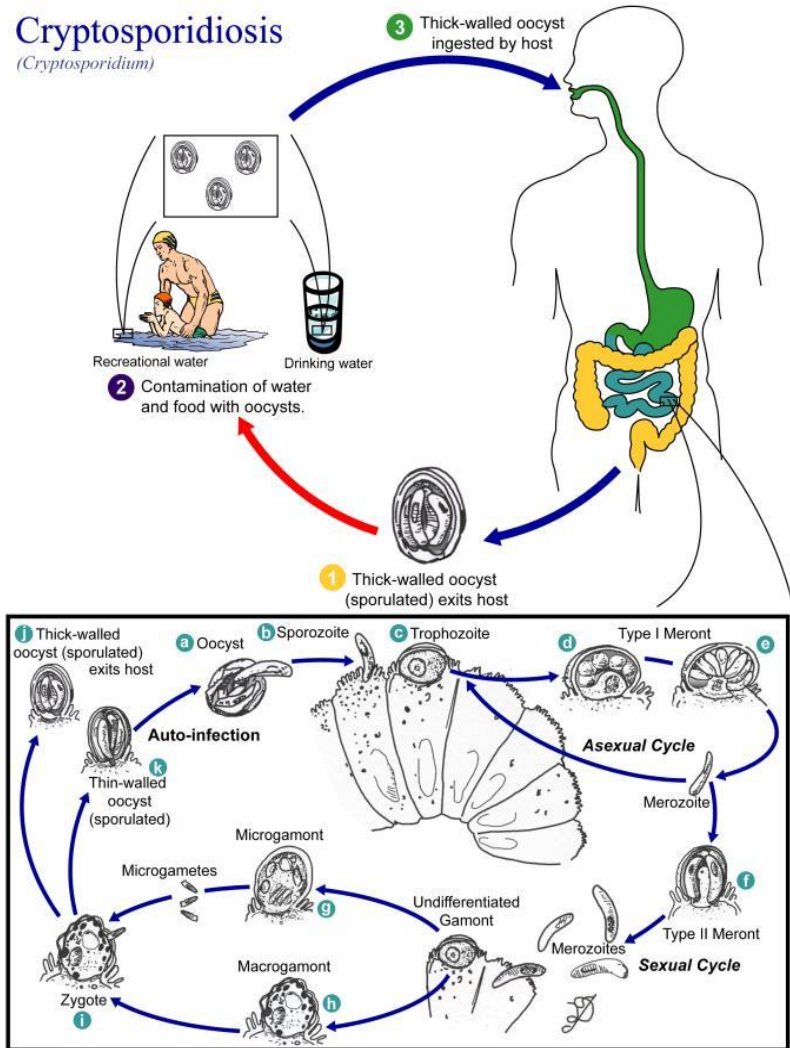


- Monoxènes
- Ubiquitaires
- Pas de multiplication dans l'environnement
- Culture difficile en laboratoire
- Formes infestantes résistantes dans l'environnement
 - *Cryptosporidium* > 6 mois dans de l'eau
 - *Giardia* > 1 à 2 mois
- Dose infectante [Faible]
 - *Cryptosporidium* : 9 oocystes
 - *Giardia* : 25 à 100 kystes
- Formes infestantes largement éliminées par un hôte infecté
 - *Cryptosporidium* : 10^{10} /jour
 - *Giardia* : 10^8 à 10^9 /jour

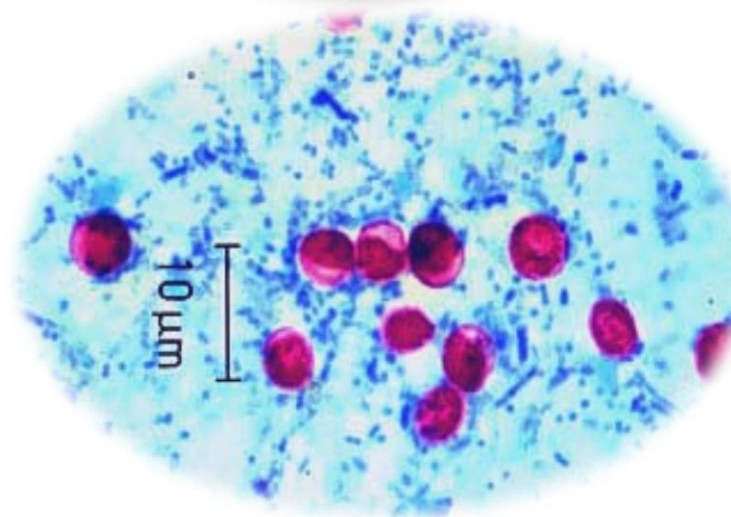
CRYPTOSPORIDIUM



Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium*)

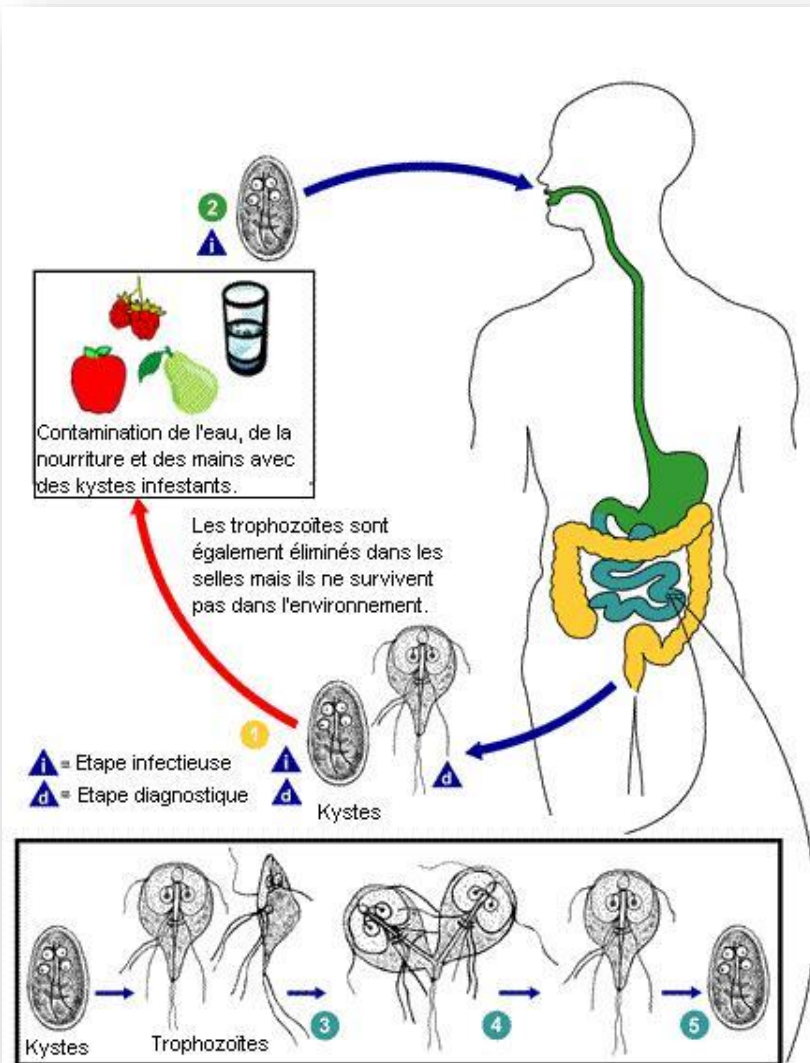


- Chaque oocyste de *Cryptosporidium* contient 4 sporozoïtes.
- Le sporozoïte représente la forme infestante.

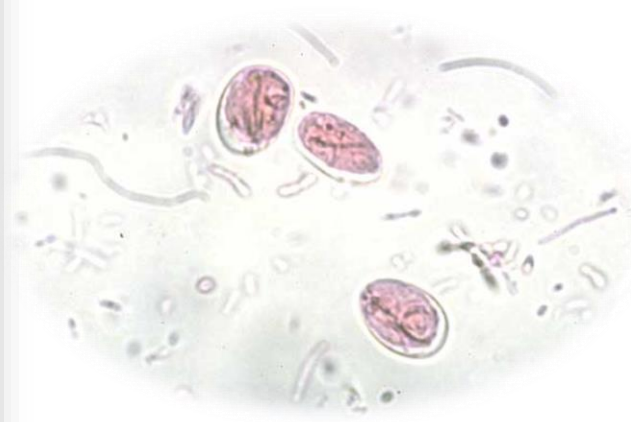


- Forme: ovoïde;
- diamètre : 4-6 µm.

GIARDIA



- Forme végétative ou trophozoïte;
- Corps en « cerf volant »;
- Dimensions: 10 μm x 6 à 10 μm ;
- Très mobile grâce à 8 flagelles.



- Kyste : ovoïde à paroi épaisse assurant la résistance dans le milieu extérieur;
- Dimensions: 8-18 μm de diamètre;
- Immobile.

DURÉE D'INCUBATION DES AGENTS INFECTIEUX LES PLUS SOUVENT IMPLIQUÉS DANS LES ÉPIDÉMIES D'ORIGINE HYDRIQUE

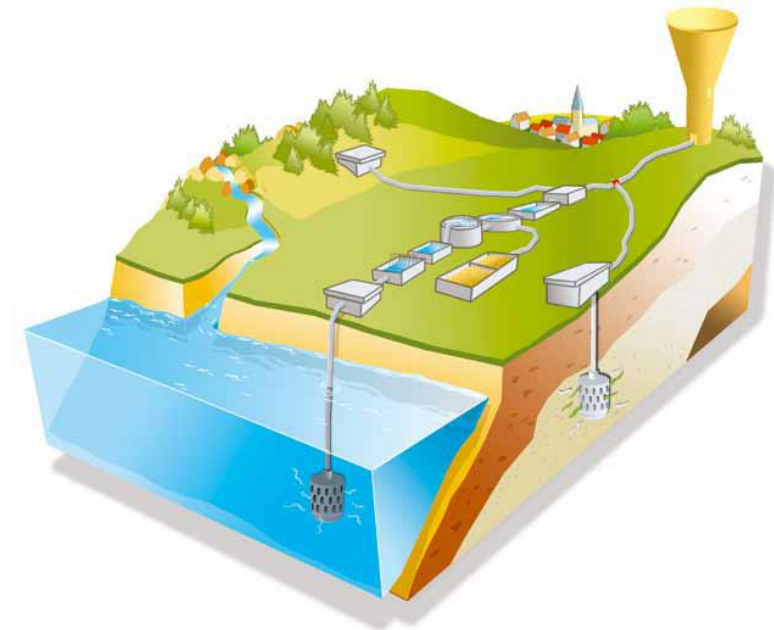


Agent infectieux	Durée d'incubation Min, max (le plus souvent)
Parasites	
-Cryptosporidium	1 à 12 jours (7 jours)
-Giardia	3 à 25 jours (7-10 jours)
Bactéries	
-Campylobacter	1 à 10 jours (2-5 jours)
-E. coli entérotoxigène (ETEC)	2 à 10 (3 - 4 jours)
-E. coli producteur de shigatoxine (STEC)	2 à 10 jours (3-4 jours)
-Salmonella non Typhi	6 à 72 heures (12-36 heures)
-Shigella	12 heures à 4 jours (1-3 jours)
-Yersinia	3 à 10 jours (7 jours)
Virus	
-Adenovirus	3 à 10 jours
-Astrovirus	1 à 4 jours
-E Virus de l'hépatite A	15 à 50 jours (28-30 jours)
-Virus de l'hépatite	15 à 64 jours (26 à 42 jours)
-Norovirus	10 à 50 heures
-Rotavirus	24 à 72 heures
-Sapovirus	24 à 48 heures

LES SIGNAUX ENVIRONNEMENTAUX DE DÉGRADATION DE LA QUALITÉ DE L'EAU



- Les pollutions accidentelles de la ressource ou du bassin d'alimentation
- Événements météorologiques (ruissellements, inondations, tempêtes), dont inondation du captage
- Augmentation importante de la demande en chlore
- Les défaillances de la clarification entraînant un risque d'exposition significative de la population à une eau contaminée
- Variation importante de pH
- Les pannes de désinfection (durant plus de 2h)



INACTIVATION DES DEUX PARASITES



Chloration

Il est efficace contre les kystes de *Giardia* mais pas contre les oocystes de *Cryptosporidium*, les concentrations nécessaires pour obtenir une inactivation complète des oocystes sont de 1600 mg / L pendant 24 h.

Ozonation

Des études ont rapporté qu'une dose de 2.27 mg / L pendant 8 minutes était suffisante pour obtenir une inactivation complète d'une suspension de 5.10^5 oocystes / ml dans l'eau.

Radiation ultra violette

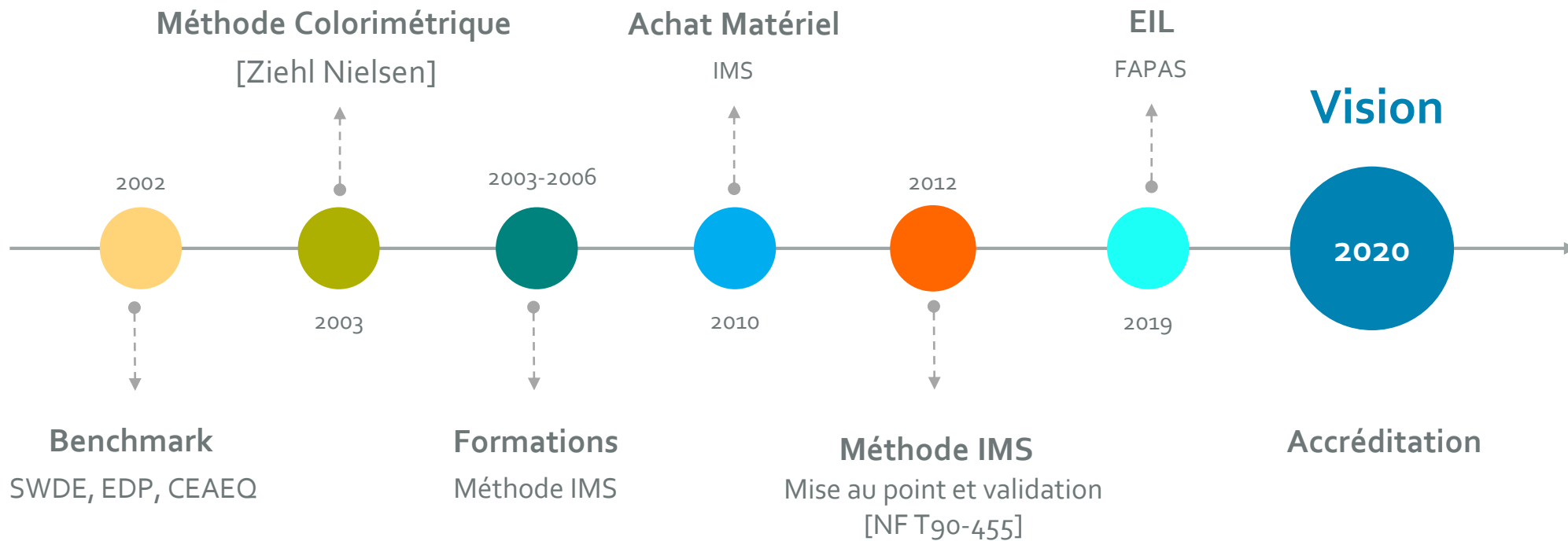
Les radiations UV sont capables d'inactiver les oocystes de *Cryptosporidium* et les kystes de *Giardia*.

Ainsi, il apparaît que les doses nécessaires pour inactiver 90 à 99 % des oocystes et des kystes sont très élevées allant de 80 à 120mw.s.cm⁻² ; sachant que les doses utilisés classiquement dans le traitement des eaux sont environ 30 mw.s.cm²

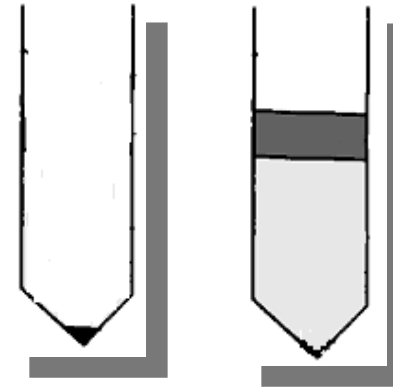
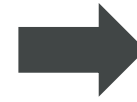
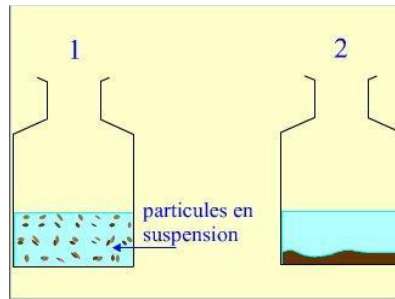
Filtration

Elle permet de retirer de l'eau les particules en suspension comme *Giardia* et *Cryptosporidium*.

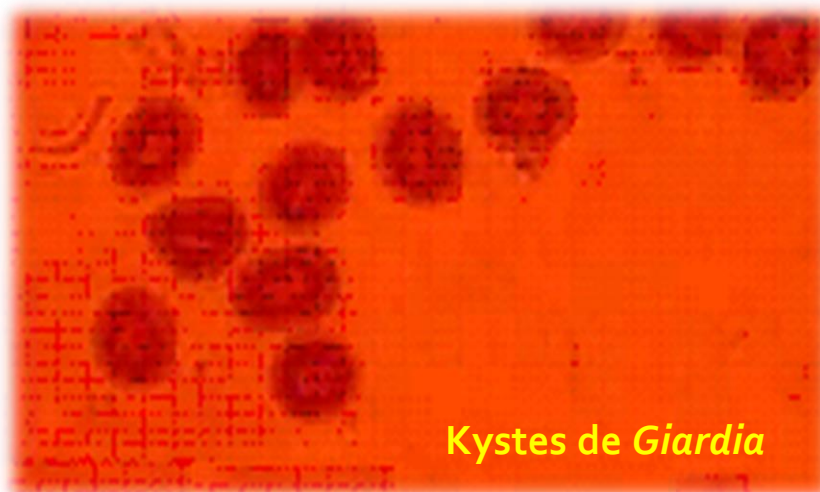
MISE EN PLACE DE LA RECHERCHE DES PROTOZOAIRES À LA DCE



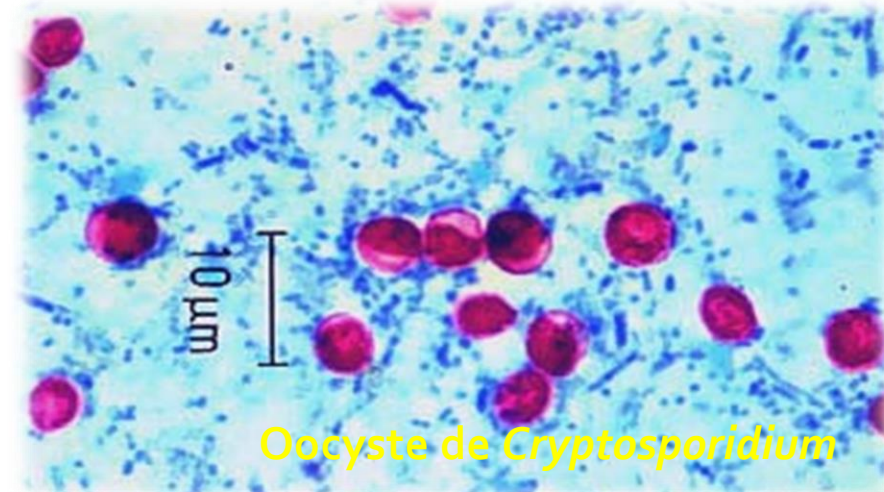
TECHNIQUE DE DÉTECTION DES PARASITES (MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE)



Coloration de Heine



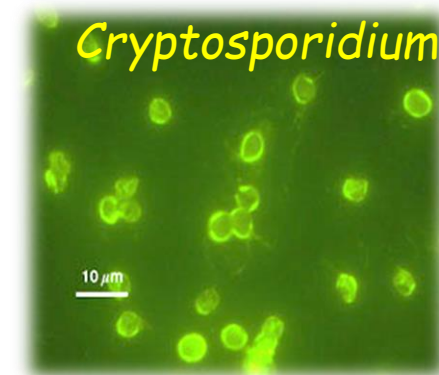
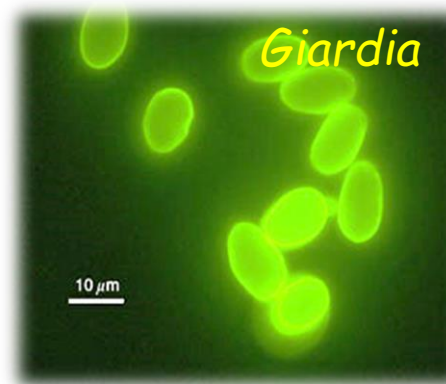
Coloration de Ziehl Nielsen



TECHNIQUE DE RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT D'OOCYSTES DE CRYPTOSPORIDIUM ET DE KYSTES DE GIARDIA PAR MÉTHODE IMS



- EPA-1623
- ISO 15553
- NF T90-455



01 Prélèvement d'eau

02 Pré-concentration par filtration

03 Elution

04 Concentration

05 Purification par IMS

06 Identification par immunofluorescence
et dénombrement

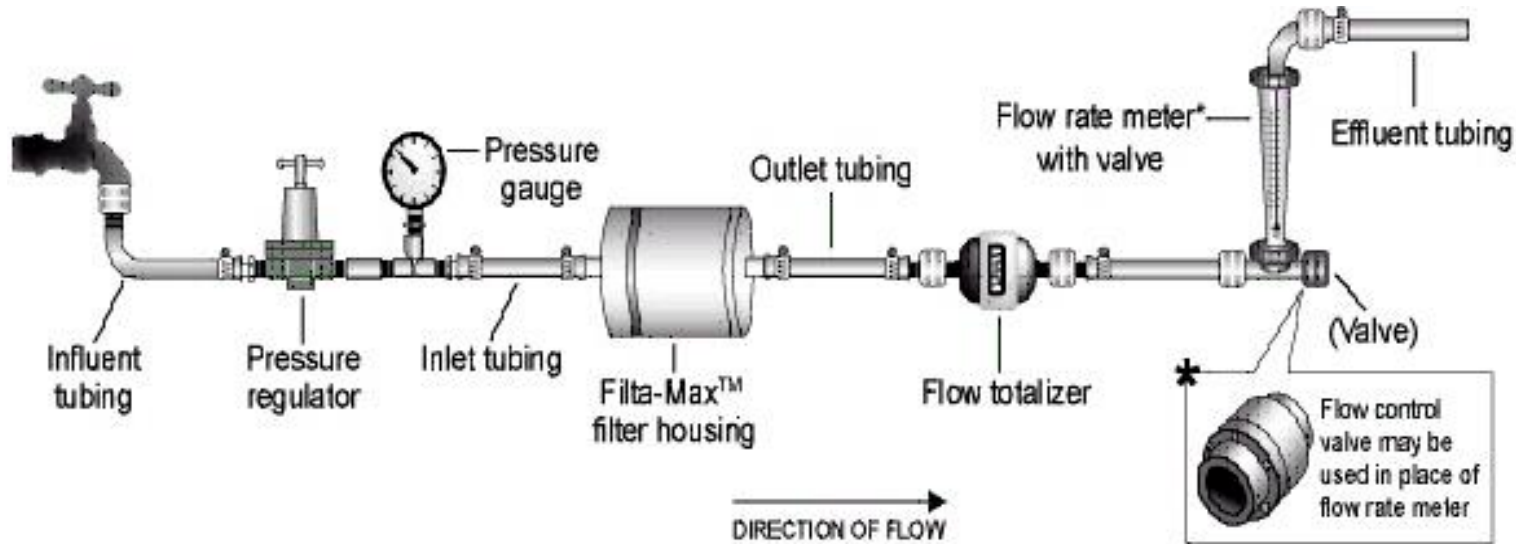
MATÉRIEL



- Cartouche de filtration, module de filtre & membrane filtrante [IDEXX]
- Station de lavage & accessoires [IDEXX]
- PBS & Tween 20
- Immuno-séparation magnétique [Dyna]^(R)
 - Anticorps monoclonaux couplés aux billes magnétiques [Dynabeads^(R) GC-Combo]
 - Agitateur rotatif [*Sample mixer*]
 - Concentrateur magnétique pour tubes de Leighton [*MPC -1*]
 - Portoir magnétique [*MPC -M*]
- Anticorps anti *Cryptosporidium* et anti *Giardia* marqués à la fluorescéine [Cellabs]
 - Crypto/Giardia*
 - Lames Crypto/Giardia control*
- Microscope à épi-fluorescence avec un équipement pour observation en contraste interférentiel en lumière transmise
- Oocystes de *Cryptosporidium* & Kystes de *Giardia*



1 - PRÉLÈVEMENTS D'EAU IN SITU



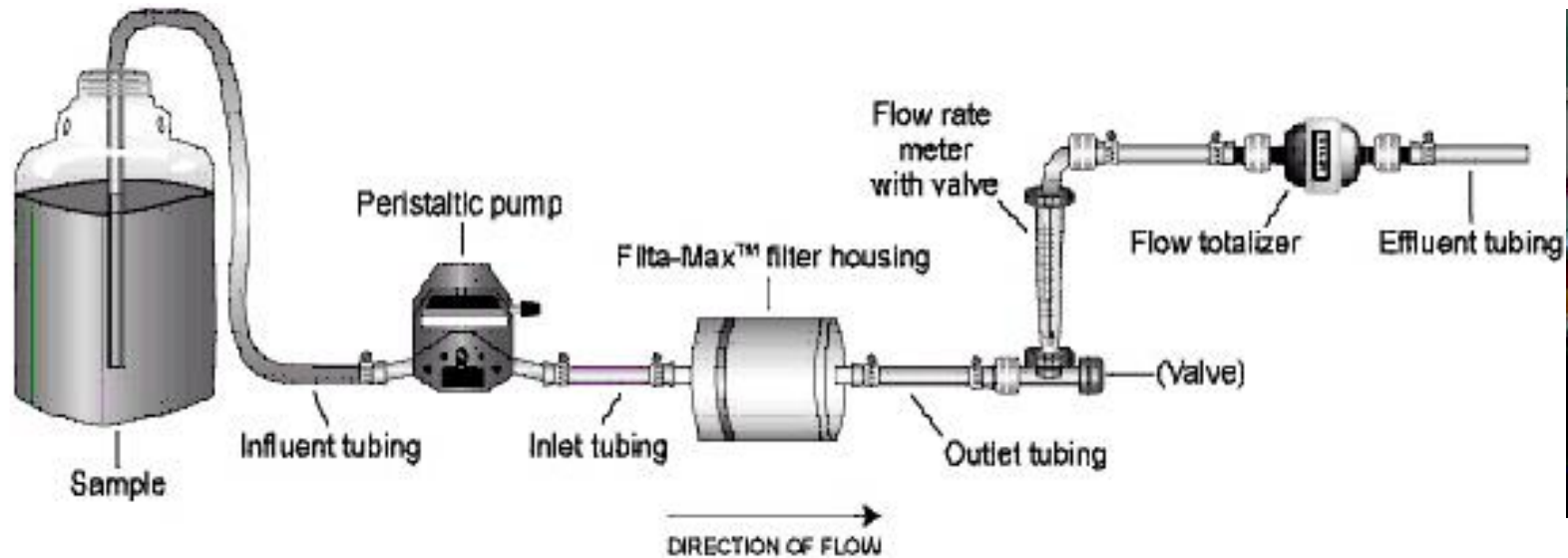
Methods 1623 [EPA 815-R-05-002 :2005]

Si non

Prélèvement dans des flacons en plastique neufs ou stériles de qualité alimentaire



2 – PRÉ-CONCENTRATION PAR FILTRATION [AU LABORATOIRE]



Methods 1623 [EPA 815-R-05-002 :2005]

Débit : 1 à 4 litres/minute

3 - ÉLUTION



- Placer le filtre dans la station du lavage
- Verser 600 ml de PBST*
- Laver le filtre (pomper 20 fois)
- Refaire le 2^{eme} lavage

* PBST: phosphate tamponné salin pH 7,4 contenant du Tween (150 µL/L)



4 - CONCENTRATION



- Concentrer par filtration sur membrane de $3\mu\text{m}$
- Transférer la membrane dans un sac en plastique
- Laver la membrane a l'aide de PBST*
- Transférer la solution de lavage dans un tube de leighton

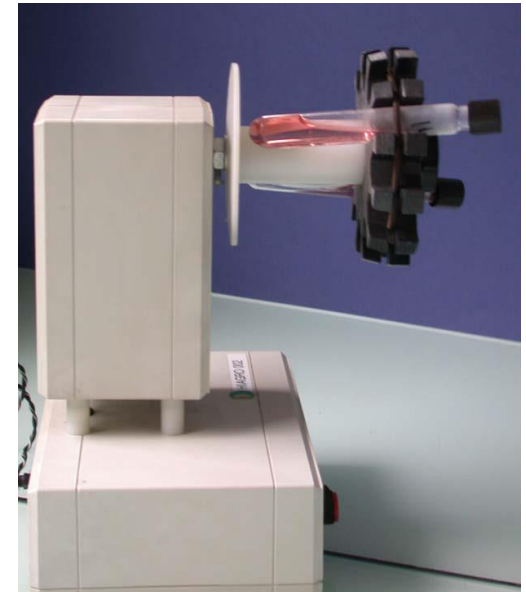
*PBST: phosphate tamponné salin pH 7,4



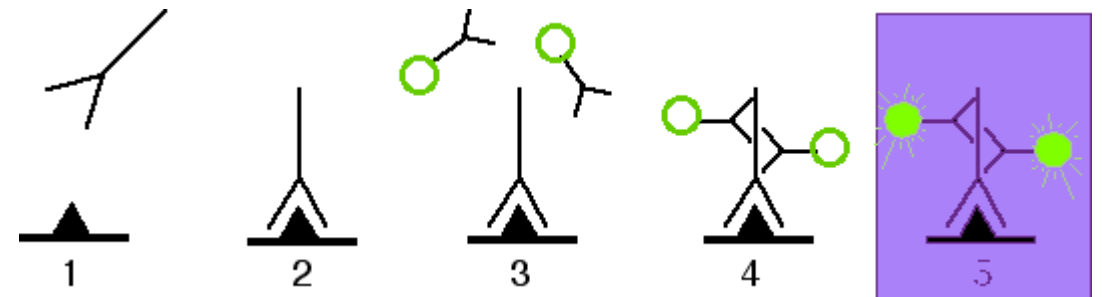
5 - PURIFICATION PAR IMMUNO SÉPARATION MAGNÉTIQUE (IMS)



- Ajouter les tampons de fixation des anticorps SL-A 10 X et SL -B 10 X
- Ajouter les billes** magnétiques anti-*Crypto* et anti-*Giardia* à raison de 100 µL
- Agitation sur agitateur rotatif pendant une heure
- Réaction antigène -anticorps entre les parasites et des anticorps monoclonaux couplés à des billes magnétiques
- Purification et réduction du volume du concentrât



**Agitation au Vortex préalable



5.1- PURIFICATION



- Placer le tube côté plat contre l'aimant MPC -1
- Agiter doucement par retournement manuel pendant 2 min. Les parasites fixés aux billes sont plaqués sur le verre. Vider le liquide immédiatement
- Retirer le tube de l'aimant, ajouter 1 mL de tampon SLA 1X. Mélanger doucement à la main pour remettre en suspension les parasites fixés aux billes.
- Transférer le liquide dans un microtube de 1,5 mL



5.2- CAPTURE DES OOCYSTES ET KYSTES



- Placer les microtubes dans le concentrateur MPC –M avec la plaque aimantée.
- Incliner d'avant en arrière pendant 1 min. Aspirer le liquide.
- Les billes avec les parasites sont fixées contre la paroi
- Rinçage des billes avec 1mL de tampon SLA 1X : retirer la plaque aimantée et remettre les billes en suspension
- Replacer l'aimant et incliner le portoir d'avant en arrière pendant 1 min. Éliminer le liquide



5.3 - DISSOCIATION DU COMPLEXE BILLES MAGNÉTIQUES - ANTICORPS

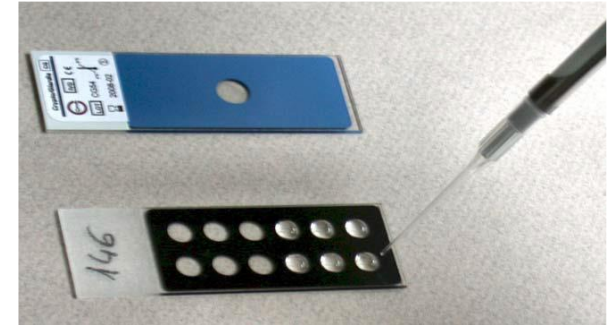


- Enlever la plaque aimantée
- Ajouter 50 μ L HCl 0,1mol/L et homogénéiser au vortex, 5 sec. Contact 10min
- Homogénéiser au vortex, 5sec. Replacer le microtube sur l'aimant MPC-M. Laisser au repos 10sec
- Transférer le surnageant purifié dans un autre microtube avec 5 μ L de NaOH 1mol/L. Homogénéiser par aspiration - refoulement
- Conserver le concentrât final en totalité

6.1-MARQUAGE PAR IMMUNOFLOUORESCENCE



- Dépôt de la totalité du concentrât dans les puits d'une lame, sécher à $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$, 30min.
- Fixation au méthanol et séchage à l'air
- Marquage des parasites par dépôt des anticorps à épifluorescence
- Montage en glycérol tamponné
- Lecture immédiate



6.2-IDENTIFICATION ET DÉNOMBREMENT

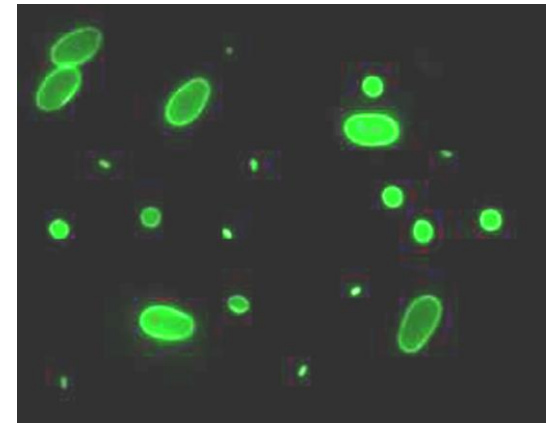


Cryptosporidium

- fluorescence verte avec une intensité plus forte de leur paroi externe nette et régulière
- taille : 4 à 6 μm
- forme sphérique ou légèrement ovoïde

Giardia

- fluorescence verte assez intense plus forte de leur paroi externe nette et régulière
- Taille 9-15 μm x 7-10 μm
- Forme ovoïde



AVANTAGES ET LIMITES DE LA MÉTHODE



- **Avantages**
 - Visualisation de la morphologie des parasites
 - Dénombrement
- **Limites**
 - Absence d'information sur (L'espèce , La viabilité & L'infectivité)
- **Lecture délicate**
 - Nécessite une bonne formation du personnel
- **Lecture directe fastidieuse**



20th AfWA CONGRESS

— YOU ARE WELCOME —