



**20<sup>th</sup> 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**

23<sup>rd</sup> – 24<sup>th</sup> 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<sup>er</sup> 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<sup>ère</sup> 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  $\leq 1$  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



<b>Forme infectante</b>	Oocystes (5µm) 1009 Kg/m <sup>3</sup>
<b>Source principale</b>	bovins
<b>Pouvoir infectant dans l'environnement</b>	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
<b>Dose infestante</b>	Hôte immunodéprimé (ID) : < 10 oocystes Immunocompétent : ~130 oocystes
<b>Caractère infectieux de l'eau</b>	1 à 3 oocyste/10L
<b>Principal symptôme</b>	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

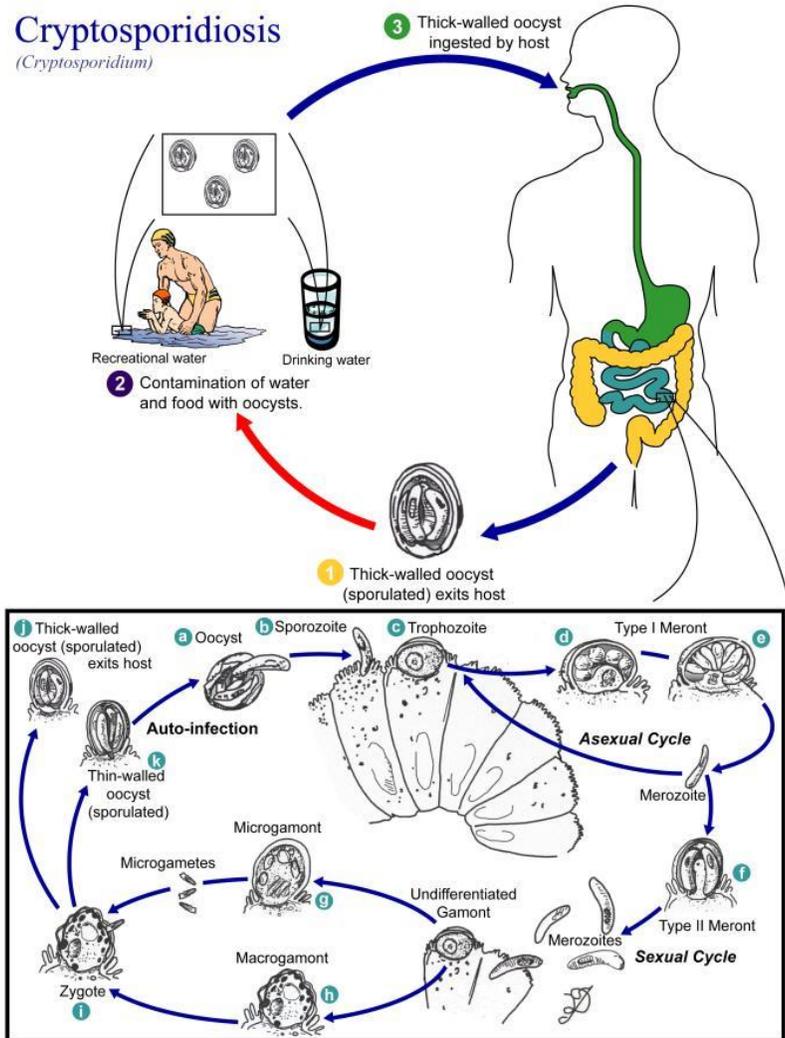


- Monoxènes
- Ubiquitaires
- Pas de multiplication dans l'environnement
- Culture difficile en laboratoire
- Formes infestantes résistantes dans l'environnement
  - *Cryptosporidium* > 6 mois dans de l'eau
  - *Giardia* > 1 à 2 mois
- Dose infectante [Faible]
  - *Cryptosporidium* : 9 oocystes
  - *Giardia*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

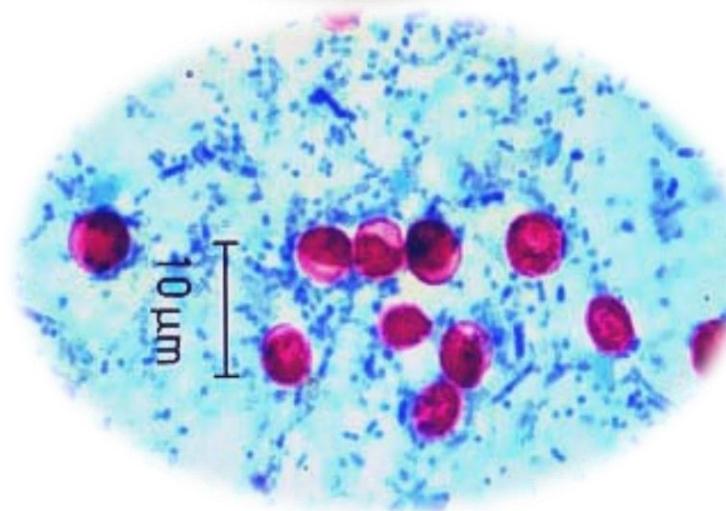
# CRYPTOSPORIDIUM



## Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium*)

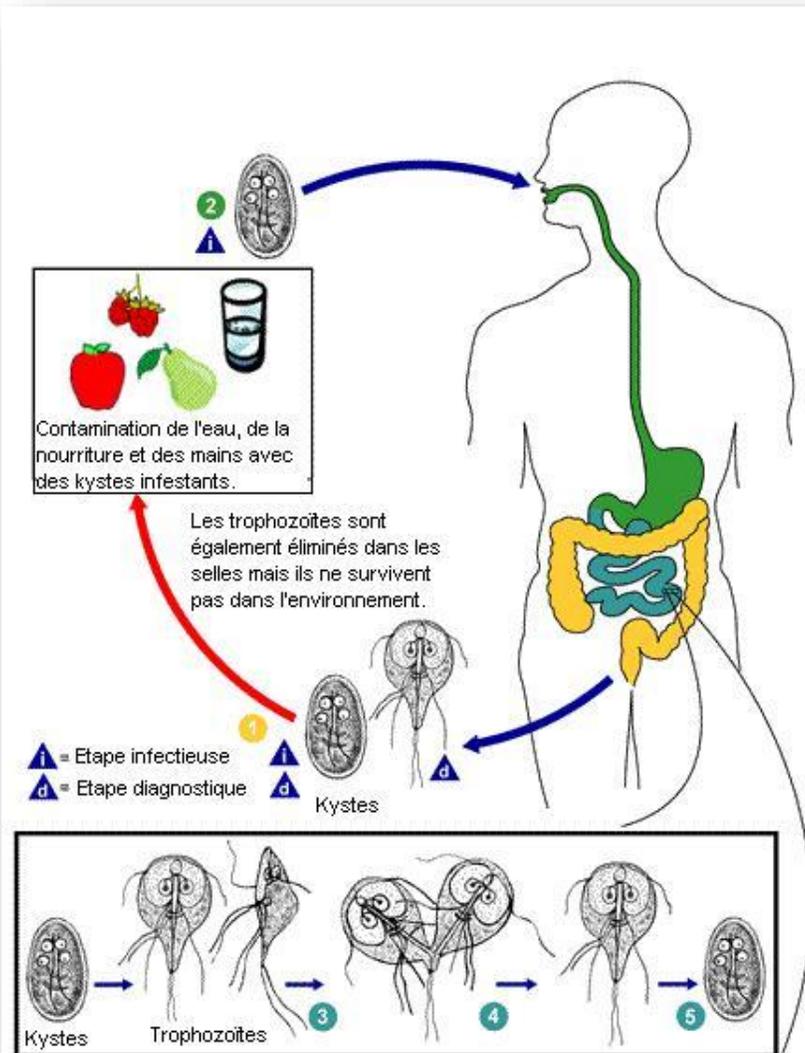


- Chaque oocyste de *Cryptosporidium* contient 4 sporozoïtes.
- Le sporozoïte représente la forme infestante.



- Forme: ovoïde;
- diamètre : 4-6 µm.

# GIARDIA



- Forme végétative ou trophozoïte;
- Corps en « cerf volant »;
- Dimensions: 10  $\mu\text{m}$  x 6 à 10  $\mu\text{m}$ ;
- Très mobile grâce à 8 flagelles.



- Kyste : ovoïde à paroi épaisse assurant la résistance dans le milieu extérieur;
- Dimensions: 8-18  $\mu\text{m}$  de diamètre;
- Immobile.

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

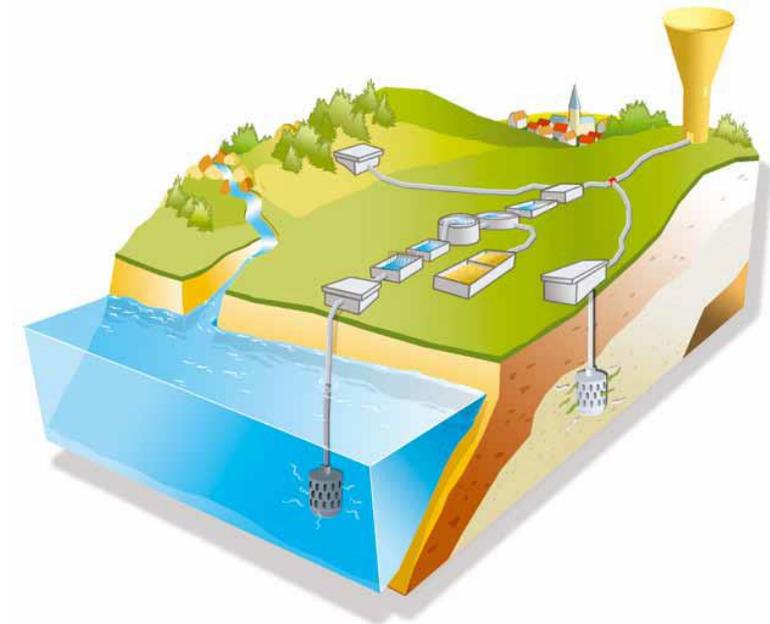


Agent infectieux	Durée d'incubation Min, max (le plus souvent)
<b>Parasites</b>	
-Cryptosporidium	1 à 12 jours (7 jours)
-Giardia	3 à 25 jours (7-10 jours)
<b>Bactéries</b>	
-Campylobacter	1 à 10 jours (2-5 jours)
-E. coli entérotoxigène (ETEC)	2 à 10 (3 - 4 jours)
-E. coli producteur de shigatoxine (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)
<b>Virus</b>	
-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

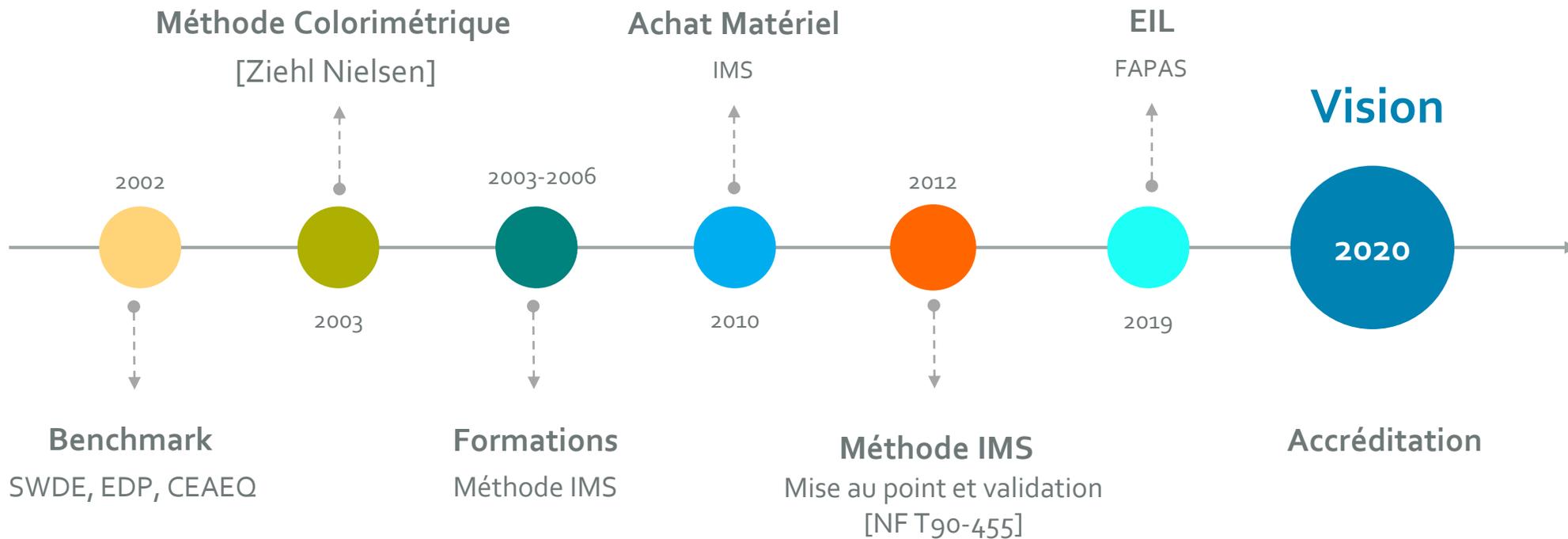
Les radiations UV sont capables d'inactiver les oocystes de *Cryptosporidium* et les kystes de *Giardia*.

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<sup>-2</sup> ; sachant que les doses utilisés classiquement dans le traitement des eaux sont environ 30 mw.s.cm<sup>2</sup>

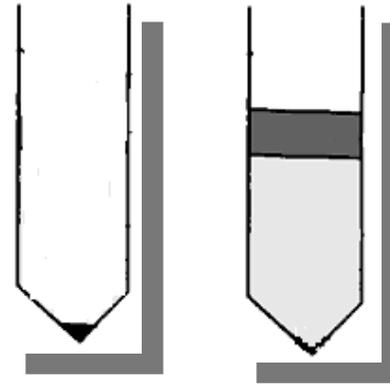
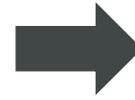
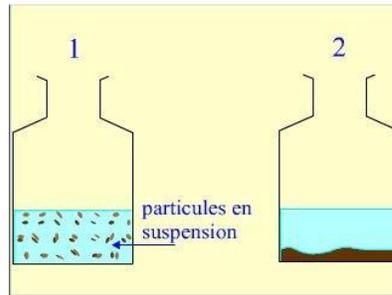
## Filtration

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

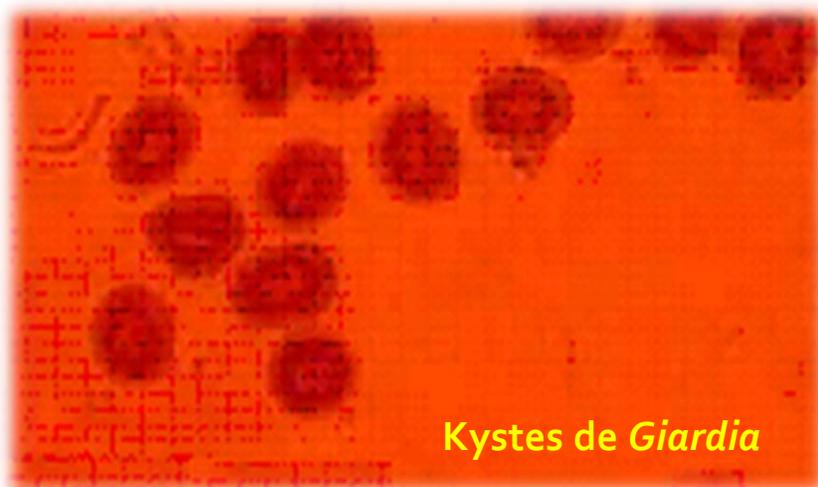
# MISE EN PLACE DE LA RECHERCHE DES PROTOZOAIRES À LA DCE



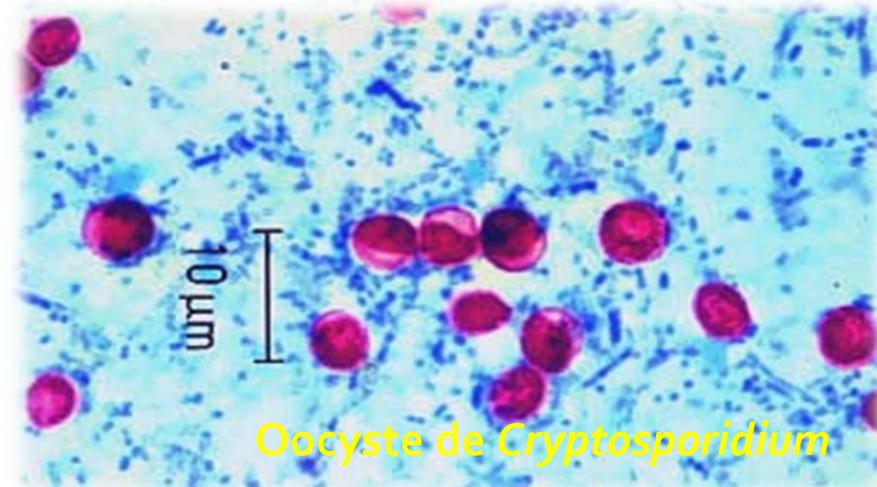
# TECHNIQUE DE DÉTECTION DES PARASITES (MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE)



Coloration de Heine



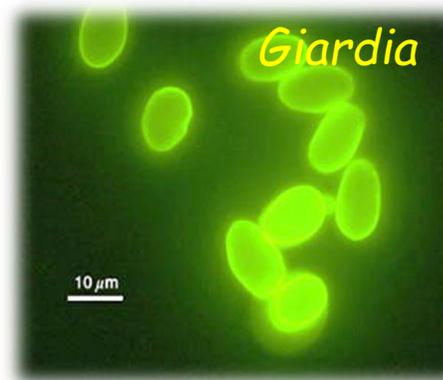
Coloration de Ziehl Nielsen



# 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

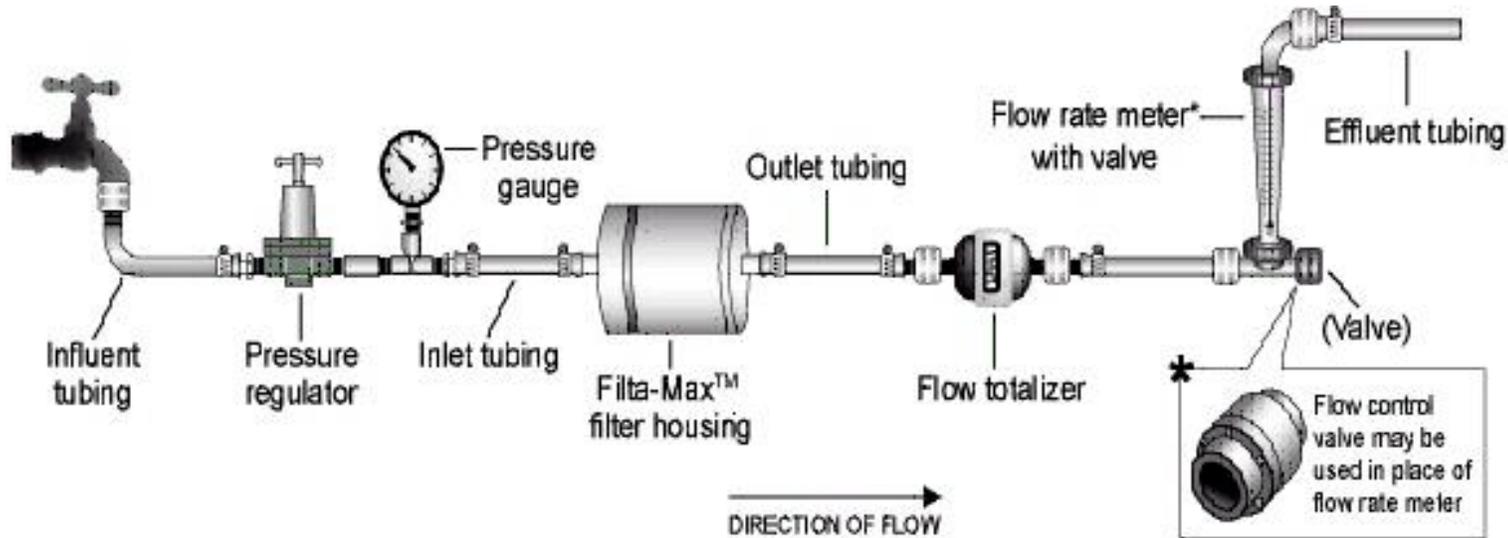
# MATÉRIEL



- Cartouche de filtration, module de filtre & membrane filtrante [IDEXX]
- Station de lavage & accessoires [IDEXX]
- PBS & Tween 20
- Immuno-séparation magnétique [Dyna]<sup>(R)</sup>
  - Anticorps monoclonaux couplés aux billes magnétiques [Dynabeads<sup>(R)</sup> 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



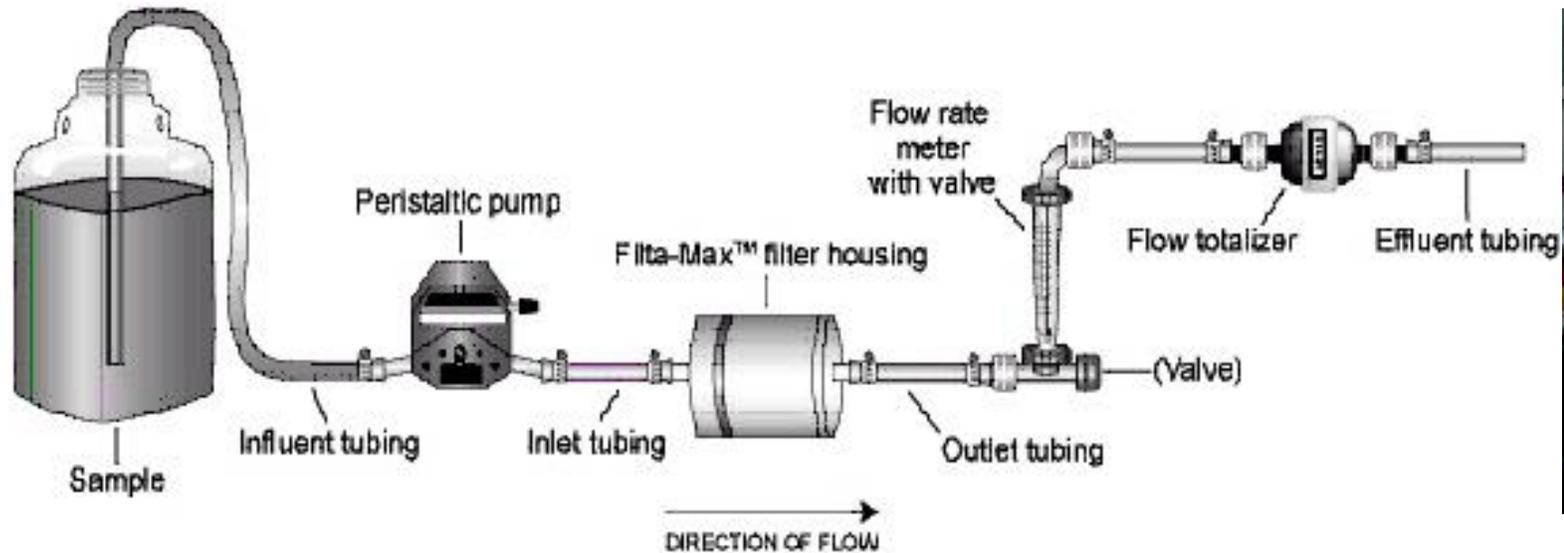
Methods 1623 [EPA 815-R-05-002 :2005]

*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<sup>eme</sup> 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

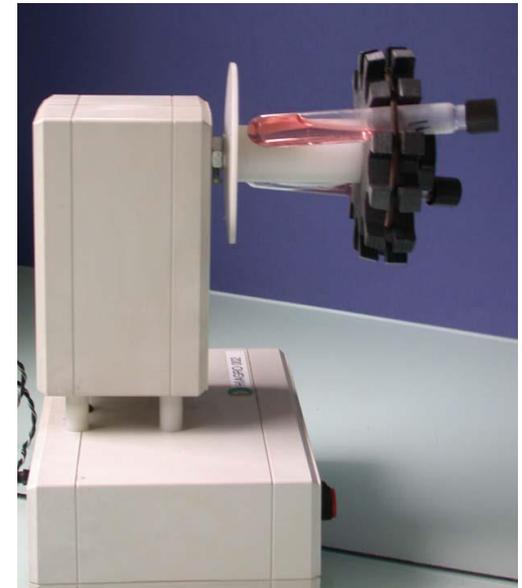
\*PBST: phosphate tamponné salin pH 7,4



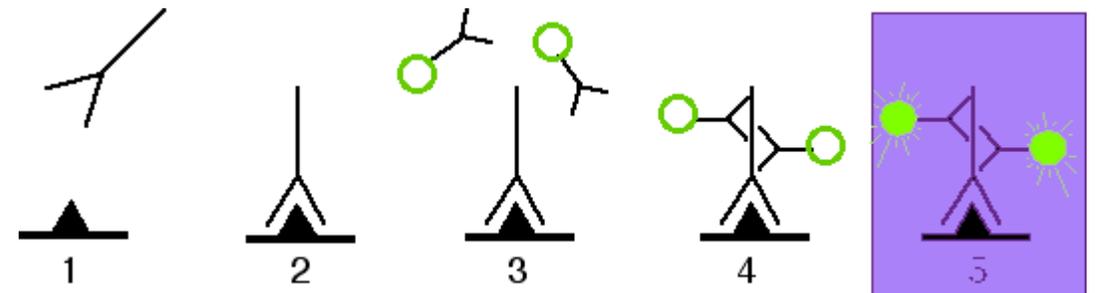
# 5 - PURIFICATION PAR IMMUNO SÉPARATION MAGNÉTIQUE (IMS)



- 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

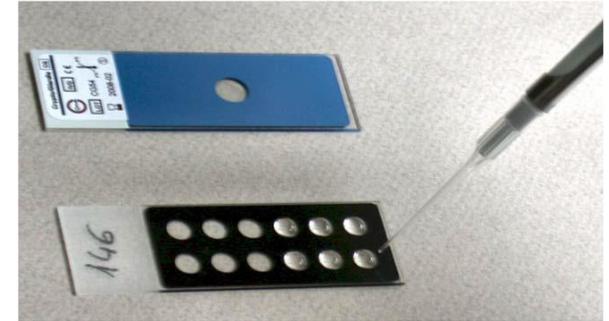


- Enlever la plaque aimantée
- Ajouter 50µL HCl 0,1mol/L et homogénéiser au vortex, 5 sec. Contact 10min
- Homogénéiser au vortex, 5sec. Replacer le microtube sur l'aimant MPC-M. Laisser au repos 10sec
- Transférer le surnageant purifié dans un autre microtube avec 5µL de NaOH 1mol/L. Homogénéiser par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

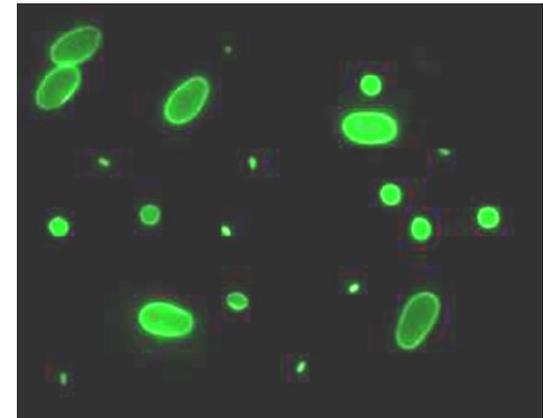


### *Cryptosporidium*

- fluorescence verte avec une intensité plus forte de leur paroi externe nette et régulière
- taille : 4 à 6  $\mu\text{m}$
- forme sphérique ou légèrement ovoïde

### *Giardia*

- fluorescence verte assez intense plus forte de leur paroi externe nette et régulière
- Taille 9-15 $\mu\text{m}$  x 7-10 $\mu\text{m}$
- 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**

