



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES OOCYSTES DE *CYCLOSPORA* DANS LES BAIES

Brent R. Dixon
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
Repère postal : 2204A2
Santé Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0L2
Courriel : Brent_Dixon@hc-sc.gc.ca

1. **APPLICATION**

Cette méthode de laboratoire a été mise au point en collaboration avec la Division des services de laboratoire de l'ACIA (8.1) et est applicable à l'isolement et à l'identification des oocystes de *Cyclospora cayetanensis* à la surface des baies. Il faut l'utiliser avec de petites quantités de baies faisant l'objet de plaintes de consommateurs, ainsi qu'avec des échantillons plus volumineux prélevés au cours d'inspections de routine.

2. **PRINCIPE**

La méthode consiste à provoquer l'éluotion des oocystes des baies en les agitant doucement dans un sac d'appareil stomacher contenant une solution tampon. On concentre ensuite l'éluat par centrifugation, met le culot remise en suspension en masse commune et l'examine au microscope pour y détecter la présence d'oocystes.

3. **CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DU *CYCLOSPORA CAYETANENSIS***

3.1 Caractéristiques biologiques de base et cycle de vie

Le *Cyclospora cayetanensis* est un nouveau parasite protozoaire coccidien (8.2) qui semble infecter les êtres humains seulement. Au stade de la transmission, soit celui de l'oocyste, le parasite est sphérique et a un diamètre de 8 à 10 µm. Les oocystes non sporulés peuvent avoir simplement un cytoplasme granulaire, mais les oocystes sporulés (viables) contiennent deux sporocystes de forme ovale dont chacun contient deux sporozoïtes (visibles ou non). Exposés à la lumière UV, les oocystes produisent une autofluorescence bleue.

Même si l'on n'a pas encore déterminé de cycle de vie définitif pour le *Cyclospora cayetanensis*, on pense qu'il ressemble à celui d'autres parasites protozoaires coccidiens. Les oocystes non sporulés (non à maturité) sont éliminés dans l'environnement avec les fèces des sujets infectés. Les oocystes passent au stade de la sporulation, parviennent à maturité et deviennent viables en quelques jours ou semaines : tout dépend de conditions comme la température et l'humidité. Après avoir été ingérés, les oocystes traversent l'estomac et pénètrent dans l'intestin grêle où ils passent au stade de l'exkystation et les sporozoïtes individuels sont libérés et pénètrent dans les cellules de la muqueuse intestinale. Les sporozoïtes se multiplient ensuite de façon asexuée et la multiplication

produit un nombre important de mérozoïtes qui quittent la cellule et envahissent d'autres cellules hôtes. Certains mérozoïtes évoluent en gamètes mâles et femelles qui se reproduisent de façon sexuée pour produire des oocystes non sporulés.

3.2 Transmission

On considère que le *Cyclospora* est avant tout un agent pathogène d'origine hydrique, car il est en grande partie transmis par l'eau contaminée par les fèces qui est utilisée comme eau potable. Même si ce mode de transmission demeure important dans des pays comme le Pérou et le Népal où le parasite est endémique, on a signalé de nombreuses flambées d'origine alimentaire ces dernières années au Canada et aux États-Unis (8.3, 8.4, 8.5, 8.6). Des données probantes épidémiologiques ont mis en cause des baies importées dans la majorité de ces flambées. La consommation de mesclun (petits haricots verts) et de basilic contaminés par des oocystes a provoqué des flambées de moindre envergure aux États-Unis. Les aliments peuvent être contaminés par des pratiques d'hygiène médiocres des travailleurs, l'eau contaminée utilisée dans l'irrigation, le mélange de pesticides ou le lavage des fruits et légumes, ou par une autre méthode non encore identifiée. La transmission de personne à personne (voie fécale-orale) est peu probable parce que la période de sporulation requise est relativement longue.

3.3 Symptômes, diagnostic et traitement

La maladie elle-même est appelée cyclosporiase et peut provoquer la diarrhée, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, la fatigue, la perte d'appétit, etc. Les symptômes font en général leur apparition environ une semaine après l'absorption des oocystes et peuvent durer des jours ou des semaines s'ils ne sont pas traités. Le diagnostic comporte habituellement un examen microscopique de spécimens de selles qui vise à dépister la présence d'oocystes. Le bactrim, un antibiotique, est efficace contre la cyclosporiase.

4. FOURNITURES, MATÉRIEL ET RÉACTIFS

4.1 Élution

- 4.1.1 sacs de stomacher ou l'équivalent (capacité d'au moins 1 L)
- 4.1.2 solution tampon TE pH 7,4 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)
- 4.1.3 agitateur orbital avec pinces ou autre moyen de supporter les sacs de stomacher

4.2 Concentration

- 4.2.1 feuilles d'étamine
- 4.2.2 tubes à centrifuger coniques en polypropylène de 50 mL
- 4.2.3 centrifugeuse réfrigérée avec adaptateurs pour tubes de 50 mL
- 4.2.4 pipettes de 25 mL et poire en caoutchouc pour enlever le liquide surnageant
- 4.2.5 pipettes de Pasteur et poires en caoutchouc
- 4.2.6 micropipettes numériques (capacité de 100 µL et 1 000 µL) et embouts appropriés pour transférer des culots remis en suspension
- 4.2.7 tubes à microcentrifugeuse en polypropylène de 1,5 mL
- 4.2.8 microcentrifugeuse avec adaptateurs pour tubes de 1,5 mL
- 4.2.9 mélangeur à tourbillons

4.3 Analyse microscopique

- 4.3.1 lames à microscope standard et lamelles de 22x22 mm
- 4.3.2 cyto seal 60 (VWR Canlab) ou vernis à angle clair pour sceller la lamelle
- 4.3.3 lame témoin positive contenant des oocystes de *Cyclospora*, de préférence élués à partir de baies contaminées naturellement ou piquées de la même variété que celles qui sont examinées
- 4.3.4 microscope composé avec objectifs 40 X et 100 X (immersion dans l'huile); capacité de microscopie à fond clair et à épifluorescence (filtre à excitation ultraviolet 330-380 nm, filtre interférentiel 420 nm et lampe au mercure).

5. MÉTHODES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION

5.1 Élution et concentration des oocystes

- 5.1.1 Prélever sur chaque échantillon environ 50 g de baies et déposer dans un sac de stomacher identifié comme il se doit. Éviter si possible d'utiliser des baies très grosses ou très petites, ou qui sont manifestement endommagées ou molles.
- 5.1.2 Verser avec précaution 120 mL de solution tampon TE (pH 7,4) dans chaque sac de stomacher. Éviter de verser la solution tampon directement sur les baies.
- 5.1.3 Déposer les sacs sur l'agitateur orbital pendant deux minutes à 120 t/m. Si les baies sont particulièrement molles ou endommagées, il ne faut pas utiliser l'agitateur orbital, ce qui produira des quantités excessives de débris dans la solution tampon et, par conséquent, un culot difficile à manipuler. Ajouter plutôt les 120 mL de solution tampon TE et laisser reposer les baies pendant 30 minutes sans les agiter. Décanter doucement le liquide et suivre les autres étapes de la procédure décrite.
- 5.1.4 Retirer les sacs de stomacher de l'agitateur et décanter avec précaution le liquide de chaque sac dans trois tubes à centrifuger coniques de 50 mL étiquetés. Il faudrait décanter le liquide sur quelques épaisseurs d'étamine pour éliminer les baies et les autres gros débris.
- 5.1.5 Centrifuger les tubes à 1 500 x g pendant dix minutes à 4 °C.
- 5.1.6 Utiliser une pipette de 25 mL pour retirer et jeter le liquide surnageant et en laisser de 1 à 2 mL dans chaque tube pour remettre le culot en suspension (en produisant des tourbillons).
- 5.1.7 Utiliser une pipette de Pasteur pour transférer les culots remis en suspension de deux tubes dans le troisième tube et utiliser ensuite la même pipette pour rincer un des tubes vides avec un faible volume de solution tampon TE, transférer dans le deuxième tube vide et rincer de nouveau. Enfin, transférer le liquide de rinçage dans le troisième tube à centrifuger qui contient les culots mis en masse commune.
- 5.1.8 Centrifuger le tube qui contient la masse commune de culots remis en suspension à 1 500 x g pendant dix minutes à 4 °C.
- 5.1.9 Utiliser une pipette de Pasteur pour retirer et jeter le liquide surnageant et en laisser environ 0,5 mL pour remettre le culot en suspension. Transférer le culot remis en suspension dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL.
- 5.1.10 Centrifuger le tube à environ 16 000 x g pendant dix minutes.
- 5.1.11 Utiliser une pipette de Pasteur pour retirer et jeter le liquide surnageant. Utiliser une micropipette numérique pour ajouter 500 µL de solution tampon TE dans le tube et remettre le culot en suspension en produisant des tourbillons.

5.2 Identification des oocystes

- 5.2.1 Examiner brièvement la lame témoin qui contient des *Cyclospora* avant et, à l'occasion, pendant l'examen des spécimens.
- 5.2.2 Utiliser une micropipette numérique pour transférer 30 µL du culot remis en suspension sur une lame à microscope standard. Il peut être nécessaire d'utiliser des volumes plus petits dans des échantillons plus dilués. Déposer une lamelle sur la goutte et sceller la lamelle avec du cytoseal 60. Utiliser un objectif 40 X pour examiner attentivement la lame au complet (de gauche à droite et de haut en bas) sous une lumière UV. Les oocystes de *Cyclospora* produisent une autofluorescence et forment des cercles bleu pâle brillants à l'intérieur bleu plus foncé. On peut observer la présence d'autres débris de couleur semblable, mais il est

habituellement possible de les rejeter rapidement à cause de leur taille et de leur forme. Si un système de filtre approprié au fluorochrome FITC (filtre d'excitation 450-490 nm) est disponible, il est possible de confirmer l'identification, car les oocystes produisent une fluorescence verte à cette longueur d'onde.

5.2.3 Confirmer l'identité des oocystes sur champ clair en utilisant l'objectif 40 X ou, au besoin, l'objectif 100 X (immersion dans l'huile). Il est aussi possible de déterminer alors le degré de sporulation.

5.2.4 Il faudrait si possible prendre une photographie couleur, ou une image saisie par analyse d'image informatisée, de chaque lame de microscope qui donne un résultat positif ou douteux. Il faudrait aussi garder le culot remis en suspension correspondant pour l'examiner plus à fond au besoin.

6. CONSIGNATION DES RÉSULTATS

Inscrire minutieusement dans un registre tous les renseignements pertinents (origine des baies, date de réception, origine, numéro de lot, etc.) pour chaque échantillon de baies reçu. Si les baies étaient en mauvais état ou s'il y a eu d'autres problèmes au cours de l'examen, l'examineur doit aussi en prendre note dans le registre. Inscrire le poids total et le nombre de baies examinées pour chaque échantillon. Il faut étiqueter chaque tube et lame de microscope avec soin pour qu'ils correspondent à l'échantillon de baies analysé. Il faut consigner le nom de l'examineur et la date de l'examen, ainsi que les résultats dans le cas de chaque lame en indiquant s'ils sont positifs ou négatifs (confirmés ou non confirmés). Si les résultats sont positifs, l'examineur devrait indiquer le nombre total (ou approximatif) d'oocystes observés sur une lame. Si la confirmation morphologique est impossible, l'examineur devrait indiquer si les oocystes étaient sporulés, non sporulés, ou les deux.

7. INTERPRÉTATION

Même s'il n'y a actuellement aucune ligne directrice de la DGPS au sujet des parasites sur les baies, la consommation de baies fraîches contenant n'importe quel nombre d'oocystes de *Cyclospora* peut être considérée comme un danger pour la santé. La dose infectieuse minimale de *Cyclospora* est inconnue, mais elle est probablement assez faible, tout comme dans le cas du parasite apparenté, *Cryptosporidium parvum*. Il y a encore peu de données disponibles sur la résistance à la chaleur et à la congélation des oocystes de *Cyclospora*. Des études préliminaires indiquent toutefois que des baies contaminées qui ont été soumises à la chaleur (p. ex., produits de boulangerie) peuvent être consommées sans danger. De même, les baies contaminées qui ont été congelées à fond (p. ex., confitures congelées) peuvent être consommées sans danger. Le lavage ne réussit pas à éliminer les oocystes de *Cyclospora* et il ne faudrait pas le recommander comme moyen de décontaminer les baies.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Blais, B. 1998. CFIA Standard Operating Procedure - Isolation and Identification of *Cyclospora* Oocysts in Berries.
- 8.2 Ortega, Y.R., et al. 1993. *Cyclospora* species - a new protozoan pathogen of humans. New Engl. J. Med. **328**:1308-1312.
- 8.3 DeGraw, E. et al. 1997. Update: outbreaks of cyclosporiasis - United States and Canada, 1997. Morb. Mort. Weekly Rep. **46**:521-523.
- 8.4 Herwaldt, B.L. et al. 1997. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. New Engl. J. Med. **336**:1548-1556.
- 8.5 Pritchett, R. et al. 1997. Outbreak of cyclosporiasis - Northern Virginia - Washington, DC - Baltimore, Maryland, metropolitan area, 1997. J. Am. Med. Assoc. **278**:538-539.

- 8.6 Toronto Public Health et al. 1998. Outbreak of cyclosporiasis - Ontario, Canada, May 1998. *Morb. Mort. Weekly Rep.* **47**:806-809.