

ANNÉE 2015

N° 051

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional le 15/10/2015 par Adrien LAUDE

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Evaluation des performances du kit G-DiaParaTrio (Diagenode®)
pour la détection simultanée de *G. intestinalis*, *C. parvum*/*C. hominis* et
E. histolytica par PCR multiplex à partir d'échantillons de selles

Composition du Jury:

Président : Monsieur le Professeur LE PAPE Patrice

Assesseurs: Monsieur le Professeur LEPELLETIER Didier
Docteur DESOUBEAUX Guillaume
Docteur COSTE Marianne

Directeur de thèse : Docteur MORIO Florent

**Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de
Parasitologie-Mycologie de l'Institut de Biologie du CHU de Nantes
(chef de service : Professeur Patrice Le Pape).**

A mes juges,

A Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Laboratoire de Parasitologie/Mycologie, CHU de Nantes,

Après m'avoir enseigné la parasitologie depuis la première année de pharmacie et accueilli dans votre service, vous me faites aujourd'hui l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Didier LEPELLETIER,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, service de Bactériologie - Hygiène Hospitalière, CHU de Nantes,

Vous me faites l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Marianne COSTE-BUREL,

Praticien Hospitalier, laboratoire de Virologie, CHU de Nantes,

Pour votre enseignement en virologie, et pour me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Soyez assurée de ma reconnaissance.

A Monsieur le docteur Guillaume DESOUBEAUX,

Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier, laboratoire de Parasitologie/Mycologie, CHU de Tours,

Pour votre implication dans la réalisation de ce travail et votre participation au jury de cette thèse. Soyez assuré de ma reconnaissance.

A mon directeur de thèse, Monsieur le docteur Florent MORIO,

Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier, laboratoire de Parasitologie/Mycologie, CHU de Nantes,

Je te suis reconnaissant de m'avoir confié ce travail et accordé ta confiance. Sans ton implication, ta réactivité et ta disponibilité, ce projet n'aurait pas été envisageable. J'ai été très heureux de travailler avec toi.

Encore merci.

A ceux qui m'ont aidé à élaborer ce travail,

A l'ensemble des techniciennes du laboratoire de Parasitologie – Mycologie du CHU de Nantes et tout spécialement à Christine BUREAU,

Pour m'avoir fait partager votre expérience de l'examen parasitologique des selles, pour vos qualités humaines qui rendent le stage de parasitologie-mycologie très agréable. Soyez assurées de ma reconnaissance.

A Arnaud REIGNER, co-interne de la première heure,

Je te remercie d'avoir initié le recueil des échantillons. Grâce à ta rigueur de travail, il a été aisé d'exploiter tes données et de poursuivre l'étude.

A l'ensemble des biologistes qui ont participé activement à la réalisation de l'étude, notamment Stéphane VALOT, Guillaume DESOUBEAUX, Nicolas ARGY, Céline NOURRISSON, Christelle POMARES, Marie MACHOUART, Yohann LE GOVIC, Frédéric DALLE, Françoise BOTTEREL, Estelle CATEAU, Marion LETERRIER, Anne ESPERN et leurs équipes respectives,

Grâce à votre implication, il a été possible de constituer une vaste collection d'échantillons positifs. Soyez assurés de ma reconnaissance.

A l'équipe du laboratoire de Virologie du CHU de Nantes,

Pour avoir facilité l'utilisation des extracteurs QiaSymphony et pour vos conseils. Soyez assurés de ma reconnaissance.

A Nathalie BOURGEOIS, Ingénieur Biologiste,

Pour avoir permis l'utilisation du LightCycler. Soyez assurée de ma reconnaissance.

A mes proches,

A Faustine,

Merci pour ton soutien, ta présence et ton amour durant toutes ces années d'études. A la fin de ce cursus universitaire, je suis très heureux de commencer une « nouvelle vie » avec toi et notre petit Paul.

A mes parents,

Je vous remercie d'avoir tout mis en œuvre pour que mon cursus universitaire se passe dans les meilleures conditions possibles.

A mes co-internes,

A l'ensemble de mes co-internes, nantais et angevins,

Merci pour tous ces bons moments passés en votre compagnie. Je vais regretter les « grosses sessions » quotidiennes de baby-foot !

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	12
PARTIE I : Contexte de l'étude et données de la littérature	15
1. <i>Giardia intestinalis</i>	16
1.1. Epidémiologie	16
1.2. Cycle parasitaire et physiopathologie	17
1.3. Symptomatologie de la giardiose	20
2. <i>Cryptosporidium</i>	21
2.1. Epidémiologie	21
2.2. Cycle parasitaire et physiopathologie	23
2.3. Symptomatologie de la cryptosporidiose	26
3. <i>Entamoeba histolytica</i>	27
3.1. Epidémiologie	27
3.2. Cycle parasitaire et physiopathologie	28
3.3. Symptomatologie de l'amébose	32
4. Examen Parasitologique des Selles (EPS) : la microscopie	33
4.1. Place de l'EPS dans la nomenclature des actes de biologie médicale	33
4.2. Phase pré-analytique	34
4.3. Examen microscopique direct à l'état frais	36
4.4. Examen microscopique après concentration	37
4.5. Colorations usuelles	41
4.6. Techniques spécifiques	46
a. Détection de <i>Cryptosporidium</i> en microscopie	46
b. Technique de Baermann	50
c. Techniques adaptées à la détection des microsporidies	51
5. Détection de copro-antigènes	53
5.1. Techniques ELISA	53
5.2. Techniques immunochromatographiques	55
5.3. Performances analytiques : revue de la littérature	58
a. <i>Giardia intestinalis</i>	60
b. <i>Cryptosporidium</i> spp.	61
c. <i>Entamoeba histolytica</i>	63

6. Détection d'ADN par PCR à partir d'échantillons de selles	71
6.1. Extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons de selles	71
6.2. PCR multiplex : principe et parasites ciblés	74
6.3. Performances analytiques : revue de la littérature	78
 PARTIE II : Evaluation de la PCR multiplex G-DiaParaTrio (Diagenode®)	 89
1. Introduction	90
2. Article	94
<i>Abstract</i>	96
<i>Introduction</i>	97
<i>Material and methods</i>	99
<i>Results</i>	101
<i>Discussion</i>	103
<i>References</i>	112
 PARTIE III : Discussion	 115
 ANNEXES	 125
 Annexe I : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude d'évaluation de la PCR multiplex G-DiaParaTrio (échantillons positifs)	 126
Annexe II : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude d'évaluation de la PCR multiplex G-DiaParaTrio (échantillons négatifs)	131
Annexe III : Evaluation de la PCR multiplex G-DiaParaTrio sur des extraits d'ADN (<i>E. dispar</i>, <i>E. histolytica</i>, <i>C. felis</i> et <i>C. meleagridis</i>)	133
Annexe IV : Fiche de transmission pour l'envoi des échantillons de selles	134
Annexe V : Communication affichée (SFP – SFMM 2015)	135
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 138

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Forme végétative (g) et kyste (d) de <i>Giardia intestinalis</i>	1
Figure 2 : Trophozoïtes de <i>G. intestinalis</i> fixés sur la muqueuse intestinale	1
Figure 3 : Coupe transverse d'un trophozoïte de <i>Giardia</i> sp. laissant voir les noyaux (N), les flagelles (F) le réticulum endoplasmique (ER), des vacuoles (V) et le disque de fixation ventral (VD)	1
Figure 4 : Cycle parasitaire de <i>Cryptosporidium</i> spp.	1
Figure 5 : Différentes phases du cycle parasitaire de <i>C. hominis</i>	1
Figure 6 : Différents stades parasitaires du cycle d' <i>Entamoeba histolytica</i>	1
Figure 7 : Adhésion de trophozoïtes d' <i>E. histolytica</i> à l'épithélium intestinal	1
Figure 8 : Ulcération de l'épithélium intestinal	1
Figure 9 : Cotation de l'examen parasitologique des selles (nomenclature des actes de biologie médicale – septembre 2014)	1
Figure 10 : Examens directs à l'état frais	1
Figure 11 : Technique de concentration diphasique : tube après centrifugation	1
Figure 12 : Réalisation d'un frottis épais par la méthode de Kato et Miura	1
Figure 13 : Examens microscopiques après coloration au lugol ou au MIF	1
Figure 14 : Mise en œuvre d'une coloration sur frottis humide avec étapes de fixation et coloration différenciées	1
Figure 15 : Examens microscopiques après différentes colorations permanentes	1
Figure 16 : Examens microscopiques avec techniques adaptées à la détection de <i>Cryptosporidium</i> spp.	1
Figure 17 : Montage effectué pour la méthode de Baermann	1
Figure 18 : Montage de la méthode d'Arakaki	1
Figure 19 : Principe du test ELISA	1
Figure 20 : Principe d'un test immunochromatographique	1
Figure 21 : Biosite® Triage Micro Parasite Panel : test positif pour <i>G. intestinalis</i> (A), <i>E. histolytica</i> (B) et <i>Cryptosporidium</i> spp. (C) (Swierczewski <i>et al.</i> 2012)	1
Figure 22 : Meridian® Immunocard STAT! : test positif pour <i>G. intestinalis</i> (milieu) et <i>Cryptosporidium</i> spp. (bas) (Van den Bossche <i>et al.</i> 2015)	1
Figure 23 : Sensibilité (%) des tests de détection antigénique vis-à-vis de <i>G. intestinalis</i> dans différentes études (tableau XI)	1
Figure 24 : Spécificité (%) des tests de détection antigénique vis-à-vis de <i>G. intestinalis</i> dans différentes études (tableau XI)	1

Figure 25 : Sensibilité (%) des tests de détection antigénique vis-à-vis de <i>Cryptosporidium</i> spp. dans différentes études (tableau XI)	1
Figure 26 : Spécificité (%) des tests de détection antigénique vis-à-vis de <i>Cryptosporidium</i> spp. dans différentes études (tableau XI)	1
Figure 27 : Principe de la PCR en temps réel (<i>real-time PCR</i>) : technologie Taqman	1
Figure 28 : courbes réactionnelles de PCR en temps réel	1
Figure 29 : Sensibilité des PCR multiplex (tableau XVIII) en fonction du parasite ciblé et de la méthode de référence utilisée	1
Figure 30 : Spécificité des PCR multiplex (tableau XVIII) en fonction du parasite ciblé et de la méthode de référence utilisée	1
Figure 31 : Comparaison des taux de détection de <i>G. intestinalis</i> dans des études prospectives (tableau XVIII) selon les techniques utilisées	1
Figure 32 : Comparaison des taux de détection de <i>Cryptosporidium</i> spp. dans des études prospectives (tableau XVIII) selon les techniques utilisées	1
Figure 33 : Diagramme de Venn : définition des « vrais positifs » (VP) et des « vrais négatifs » (VN) ; chaque cercle correspond aux échantillons positifs avec la technique citée	1
Figure 34 : Design de l'étude	1
Figure 35 : Répartition des espèces parasitaires (protozoaires et helminthes) identifiées durant la période de notre étude (18 mois) au CHU de Nantes	1
Figure 36 : Exemple d'un algorithme pour l'intégration de la PCR multiplex G-DiaParaTrio (Diagenode®) dans le diagnostic parasitologique des selles	1
Figure 37 : Algorithme intégrant différentes PCR multiplex « ciblées » dans le diagnostic parasitologique des selles	1

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Espèces du genre <i>Cryptosporidium</i> et leurs hôtes habituels	23
Tableau II : Solutions de fixation utilisables pour les échantillons de selles	35
Tableau III : Techniques de concentration adaptées à la recherche d'œufs d'helminthes	38
Tableau IV : Techniques de concentration diphasiques	39
Tableau V : Colorants utilisables pour un montage entre lame et lamelle	41
Tableau VI : Techniques de coloration permanentes sur frottis de selles préalablement fixé	44
Tableau VII : Tests commercialisés pour la détection des copro-antigènes parasitaires à partir d'échantillons de selles par méthode ELISA	55
Tableau VIII : Tests commercialisés pour la détection des copro-antigènes parasitaires à partir d'échantillons de selles par méthode immuno-chromatographique	57
Tableau IX : Sensibilité des tests immunochromatographiques vis-à-vis des différentes espèces du genre <i>Cryptosporidium</i>	61
Tableau X : Performances analytiques de différents tests antigéniques dédiés à la détection spécifique d' <i>E. histolytica</i>	64
Tableau XI : Performances analytiques des tests antigéniques (ELISA et immuno-chromatographie) utilisés en coprologie parasitaire : revue de la littérature	66
Tableau XII : Protocoles d'extraction étudiés dans différentes études d'évaluation de PCR multiplex destinées à la détection de parasites dans les selles	73
Tableau XIII : Diversité des panels de parasites (et autres pathogènes) détectés simultanément par PCR multiplex dans différentes études publiées dans la littérature	76
Tableau XIV : PCR multiplex actuellement commercialisées pour la détection de parasites intestinaux	77
Tableau XV : Evaluation des performances de la microscopie et d'une PCR multiplex « maison »	84
Tableau XVI : Evaluation des performances de la microscopie et du kit G-DiaPara (Diagenode®)	84
Tableau XVII : Evaluation des performances de la microscopie et du kit Easyscreen (Genetic Signatures®)	84
Tableau XVIII : Performances analytiques des PCR multiplex adaptées à la recherche de <i>G. intestinalis</i> , <i>E. histolytica</i> et <i>Cryptosporidium</i> spp. : Revue de la littérature	86
Tableau XIX : Séquences des amorces et sondes décrites dans la littérature	88
Tableau XX : Avantages et inconvénients des méthodes microscopiques et de la PCR multiplex	119
Tableau XXI : Eléments d'orientation pour la réalisation d'un EPS par microscopie	120

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFT : *Acid fast trichrome*

ANOFEL : Association Française des Enseignants et Praticiens Hospitaliers titulaires de Parasitologie et Mycologie Médicale

AP : Auramine phénol (coloration à l')

ARN : Acide ribonucléique

BHN : Biologie hors nomenclature

CCA : *Circulating cathodic antigen*

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*

CE: Conforme aux exigences

CHD : Centre hospitalier départemental

CHU : Centre hospitalo-universitaire

COWP : *Cryptosporidium oocyste wall protein*

CRD : *Carbohydrate recognition domain*

DNA : *Deoxyribonucleic acid*

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EPS : Examen parasitologique des selles

ICT : *Immuno-chromatographic test*

IF : Immuno-fluorescence

ISO : *International Organization for Standardization*

IVD : *In vitro diagnostics*

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique à transmission

MF : Merthiolate - formol

MIF : Merthiolate - iode - formol

PAF : phénol - alcool - formol

PCR : *Polymerase chain reaction*

PVA : *Polyvinyl alcohol*

SAF : *Sodium acetate - acetic acid - formaldehyde*

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VSP : *Variant surface protein*

ZNM : Ziehl Neelsen modifiée (coloration de)

Introduction générale

Les parasitoses digestives ont une prévalence inégale dans le domaine des infections humaines. Si ce constat est particulièrement vrai dans la zone intertropicale de notre planète, certains parasites intestinaux, principalement des protozoaires, sont également présents dans les pays « développés ». L'amélioration des conditions sanitaires a largement contribué à restreindre la propagation des parasites digestifs en occident. Cependant l'infestation par des espèces cosmopolites, comme *Giardia intestinalis*, est toujours d'actualité en 2015. D'autre part, les flux de personnes (migratoires ou touristiques), de plus en plus fréquents dans notre monde globalisé, sont à même de confronter régulièrement le biologiste médical aux parasitoses digestives. Les progrès de la médecine, notamment en matière de greffes, a aussi entraîné la résurgence de certains parasites opportunistes. Ainsi en est-il de la cryptosporidiose et des microsporidioses qui, dans un contexte d'immunodépression, peuvent engendrer une pathologie sévère.

L'examen parasitologique des selles représente une activité non négligeable du laboratoire de parasitologie. En ville celui-ci représente, avec les sérologies toxoplasmiques, l'essentiel de l'activité dans ce domaine. Le diagnostic direct joue un rôle prépondérant dans la détection des parasites intestinaux. Cet examen a peu évolué depuis de nombreuses années et repose sur l'utilisation du microscope. Si les parasites, dont la taille est relativement importante (au moins plusieurs micromètres), sont facilement visualisés par un microscopiste expérimenté, le défi consiste à distinguer les éléments parasitaires au sein d'une matrice extrêmement complexe. Ainsi, des méthodes de concentration ou des colorations spécifiques permettent d'augmenter significativement la sensibilité de cet examen microscopique, tout comme le triple recueil de selles chez le patient. La lecture de ce type de préparation nécessite une solide expérience et une pratique régulière. La qualité de l'analyse et notamment sa sensibilité, est donc totalement dépendante de l'opérateur impliqué. Si cette caractéristique rend le travail gratifiant pour le microscopiste expert, elle pose une réelle question de fiabilité à l'heure de l'accréditation. Ceci est d'autant plus problématique pour les laboratoires ayant un faible recrutement d'échantillons positifs, et pour lesquels la mise en évidence d'un parasite intestinal constitue donc un événement rare. L'œil du parasitologue, même exercé, peut en outre être mis à défaut par la phase pré-analytique de l'examen car il n'est pas rare, notamment en milieu hospitalier, que l'examen parasitologique des selles soit effectué sur un prélèvement unique et/ou sur une faible quantité d'échantillon.

La microscopie permet le diagnostic d'un grand nombre d'espèces parasitaires. Toutefois, la simple étude morphologique peut s'avérer insuffisante, comme c'est le cas pour la détection de l'amibe pathogène *Entamoeba histolytica*. Dans ce cas précis, le parasitologue devra se doter d'une technique plus spécifique afin d'affiner son diagnostic.

Depuis plusieurs années de nouvelles techniques ont été mises au point en vue d'incrémenter, voire de remplacer, l'examen microscopique des selles. La détection de « copro-antigènes », notamment par technique immunochromatographique, est déjà couramment employée dans les laboratoires de biologie médicale. Ces tests, particulièrement simples à mettre en œuvre et à interpréter, sont bien adaptés à une pratique quotidienne. Au sein des laboratoires, ce type de test peut s'associer à l'EPS (Examen Parasitologique des Selles) pour certaines recherches spécifiques. Si des kits commerciaux proposent la détection simultanée de plusieurs pathogènes il semble cependant encore peu judicieux, au vu de leurs performances analytiques, de les utiliser isolément. La biologie moléculaire, reposant sur la détection d'ADN parasite par PCR et offrant des performances supérieures à la microscopie, a longtemps été l'apanage des laboratoires spécialisés. L'utilisation de ce type de technologie pour la recherche de parasites intestinaux, qui aurait été auparavant incongrue (notamment d'un point de vue financier), paraît désormais envisageable pour la routine du laboratoire de microbiologie. De nombreux kits commerciaux, d'un emploi aisé, proposent aujourd'hui la détection simultanée de plusieurs espèces de parasites (voire de bactéries et de virus) parmi les plus fréquemment rencontrés. Ces PCR dites « multiplex », avec les performances analytiques promises, les panels de plus en plus étendus proposés et le temps technique réduit, peuvent aujourd'hui remettre en cause l'intérêt de la microscopie.

Plusieurs études parues dans la littérature, pour la très grande majorité prospectives, ont ainsi cherché à comparer la PCR multiplex aux méthodes de référence reposant sur la microscopie. Les effectifs d'échantillons positifs sont toutefois souvent trop faibles et l'interprétation des résultats est de fait sujette à caution.

Le kit G-DiaParaTrio (Diagenode®), qui fait l'objet de ce travail de thèse, permet la détection qualitative et simultanée de trois protozoaires intestinaux par PCR multiplex en temps réel. Le panel choisi fait aujourd'hui consensus pour la plupart des PCR multiplex mises au point, à savoir *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum/hominis* et *Entamoeba histolytica*, qui représentent les parasites intestinaux les plus fréquents.

L'objectif de l'étude a été de comparer le kit G-DiaParaTrio à la méthode de référence actuellement en application au CHU de Nantes et reposant en première intention sur les techniques microscopiques.

Afin de disposer d'un nombre significatif d'échantillons positifs et représentatifs de la diversité des parasites rencontrés au laboratoire de parasitologie, un recueil prospectif et multicentrique a été effectué sur une période de 18 mois. Cette phase de recueil a impliqué les laboratoires de Parasitologie-Mycologie de 11 CHU et d'un CHD situés sur le territoire français afin de concrétiser la constitution d'une collection de selles positives (n = 135) répondant aux objectifs fixés initialement. La PCR multiplex a ensuite été rétrospectivement mise en œuvre sur l'ensemble des selles préalablement conservées à -20°C. Le kit G-DiaParaTrio a été couplé à une extraction automatisée sur l'automate QiaSymphony (Qiagen®) afin d'évaluer la PCR dans des conditions totalement adaptables à la routine d'un laboratoire de biologie médicale ; aisément reproductibles, simples à mettre en œuvre et ne nécessitant qu'un nombre réduit de manipulations par un opérateur. Après analyse des résultats, les performances analytiques du kit G-DiaParaTrio ont été établies. Les données de cette étude ont été utilisées afin de permettre la commercialisation du kit en accord avec la directive 98/79/EC (marquage CE-IVD).

PARTIE I : CONTEXTE DE L'ETUDE ET DONNEES DE LA LITTERATURE

Ce chapitre n'a pas pour vocation la présentation pédagogique et exhaustive des espèces parasitaires recherchées par la PCR multiplex évaluée à l'occasion de ce mémoire. Dans une première partie, nous nous attacherons à rappeler l'importance de ces trois protozoaires en terme d'épidémiologie et de pathogénicité. Dans un second temps, après avoir décrit les techniques de microscopie dédiées à l'examen parasitologique des selles, nous effectuerons une revue de la littérature afin de mieux appréhender les performances analytiques des nouvelles techniques de détection aujourd'hui disponibles au laboratoire (détection antigénique et PCR-multiplex).

1. *Giardia intestinalis*

1.1. Epidémiologie

Giardia intestinalis (syn. *G. lamblia*, *G. duodenalis*) est le parasite intestinal cosmopolite le plus fréquent en pathologie humaine. Sa large répartition et les manifestations cliniques souvent frustrées qu'il engendre expliquent que cette pathologie est relativement négligée. Pourtant les conséquences à long terme, notamment chez les enfants, sont potentiellement préoccupantes (Adam 2001). Comme toutes les parasitoses digestives liées au péril fécal, la giardiose sévit davantage dans les pays en voie de développement. La contamination par les eaux de boissons, l'absence de sanitaires, la mauvaise hygiène des mains et des aliments sont des facteurs de risque de la maladie (Al-Delaimy *et al.* 2014).

La prévalence de l'infestation à *G. intestinalis* est de 20 à 30% dans les pays en voie de développement, et de 2 à 7% dans les pays développés (Dreelin *et al.* 2014)(DuPont 2013). Les disparités régionales sont importantes, et la prévalence globalement plus importante en milieu rural qu'en zone urbaine. L'agriculture et l'utilisation de boues fertilisantes d'origine humaine ou animale sont probablement responsables de ce phénomène (Dreelin *et al.* 2014). De nombreux animaux, de compagnie ou d'élevage, peuvent héberger *G. intestinalis* et notamment les génotypes A et B adaptés à l'homme (AI principalement). Egalement fortement impliqué en pathologie vétérinaire, notons que le genre *Giardia* s'est adapté à une grande variété d'hôte : mammifères, oiseaux, amphibiens. De nombreuses espèces infestent les animaux, chacune ayant un tropisme préférentiel : *G. intestinalis* (génotype A à H), *G. muris*, *G. agilis*, *G. ardeae*, *G. psittaci*, etc. (Adam 2001). Chez l'homme, *G. intestinalis* du génotype B est le plus prévalent, mais ceci est également variable selon la région du globe considérée (Fatni *et al.* 2014).

De nombreuses études épidémiologiques récentes utilisent désormais la biologie moléculaire afin de détecter *G. intestinalis*. Des travaux chez des populations d'enfants nous permettent d'appréhender le degré d'infestation chez différentes populations de niveau socio-économique variable. La prévalence atteint ainsi 6% en Thaïlande (47% génotype AII, 28% BIV) (Boontanom *et al.* 2014), 10% en Inde (Mukherjee *et al.* 2014), 19% au Maroc (73% génotype BIV, 18% AII) (Fatni *et al.* 2014), 28% en Malaisie (Al-Delaimy *et al.* 2014) et jusqu'à 65% chez une population d'enfants au Rwanda (Danquah *et al.* 2014).

Si la prévalence est nettement plus faible en occident, la giardiose reste la parasitose digestive la plus fréquente en Europe de l'ouest et aux Etats-Unis (Troeger *et al.* 2007)(Painter *et al.* 2015). Aux USA, l'incidence de l'infestation à *G. intestinalis* chez les enfants de 1 à 4 ans était de 5,8/100 000 pour l'année 2012 (Painter *et al.* 2015). Les voyageurs de retour de zones à forte endémicité sont particulièrement à risque : en Europe durant l'année 2010, la giardiose était responsable de 16% des diarrhées aiguës présentées au retour d'un voyage (Gautret *et al.* 2012). A titre d'exemple, au CHU de Nantes durant l'année 2014, *G. intestinalis* a été retrouvé dans 13 prélèvements de selles (7 patients), pour un recueil total de 945 échantillons provenant de 700 patients.

Notons que l'infection par le VIH n'est pas un facteur de risque de la giardiose (Boontanom *et al.* 2014).

1.2. Cycle parasitaire et physiopathologie

Giardia intestinalis est un protozoaire existant sous deux formes distinctes : le trophozoïte mobile (ou forme végétative) et le kyste. Appartenant au sous-embranchement des Mastigophora, *Giardia* se déplace sous sa forme trophozoïtes par l'action de 4 paires de flagelles. Tout comme chez *E. histolytica* les formes kystiques de *Giardia*, au métabolisme ralenti (-90% par rapport à la forme mobile), sont capables de subsister plusieurs semaines dans l'environnement extérieur. Liée au péril fécal, l'ingestion accidentelle de kystes se produit le plus souvent lors de la consommation d'eau non traitée. La contamination par les aliments (légumes non lavés), par manuportage ou suite au contact avec certains animaux est également possible (Painter *et al.* 2015).

L'action conjointe de l'acidité gastrique et des protéases pancréatiques entraine alors l'altération des glycoprotéines et des chaines de galactosamine constituant la paroi du kyste (Adam 2001). Dans l'intestin grêle proximal de son hôte, le kyste quadri-nucléé de *Giardia* libère en quelques minutes une forme végétative flagellé qui, après cytokinèse, aboutira à la formation de deux trophozoïtes bi-nucléés (Adam 2001).

La contamination par une dizaine de kystes suffit pour entraîner des symptômes digestifs (Painter *et al.* 2015)(Tejman-Yarden and Eckmann 2011). Afin de permettre la dissémination, certains trophozoïtes s'enkysteront secondairement : le patient peut alors excréter dans ses selles 10^8 à 10^9 kystes par jour, et ce durant une période prolongée (Painter *et al.* 2015).

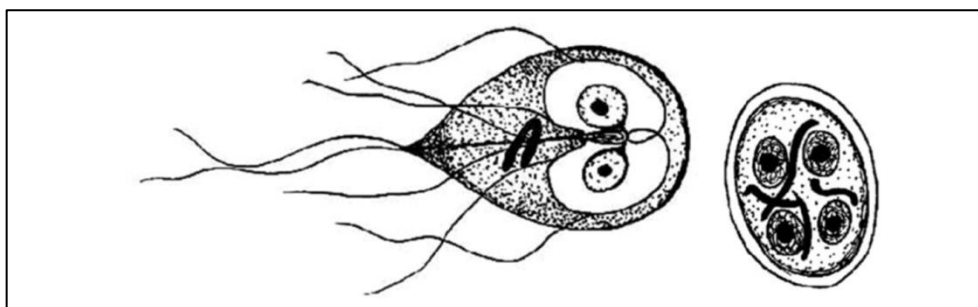


Figure 1 : Forme végétative (g) et kyste (d) de *Giardia intestinalis* (www.parasitoweb.free.fr)

Disposant d'une grande mobilité et se divisant activement par mitose, les trophozoïtes colonisent le jéjunum médian. Les formes végétatives possèdent une large surface ventrale concave jouant le rôle de disque adhésif et leur donnant une forme caractéristique « en cerf-volant ». Ce disque, constitué d'un assemblage microtubulaire complexe et riche en protéines contractiles (actine et myosine), joue le rôle d'une véritable ventouse et permet la fixation mécanique du parasite à l'épithélium intestinal de son hôte (Adam 2001). Si la présence de *Giardia* reste strictement intra-luminale et son interaction avec les cellules intestinales limitée, le protozoaire engendre toutefois une altération de la fonctionnalité de la barrière épithéliale. Ce constat est particulièrement vrai chez l'enfant, cas dans lequel les infestations sont potentiellement massives et chroniques. On observe ainsi une réduction progressive de la surface muqueuse par atrophie villositaire et, d'un point de vue microscopique, par l'atrophie de la bordure en brosse des entérocytes eux-mêmes (Troeger *et al.* 2007). Limitant la surface de contact avec le bol alimentaire, ce phénomène est à même d'engendrer des malabsorptions digestives (lipides et glucose notamment). L'atrophie villositaire s'accompagne aussi d'une augmentation de la perméabilité de la muqueuse provoquant des fuites liquidiennes vers la lumière du tube digestif. Cette hausse de perméabilité est probablement multifactorielle, liée à une sécrétion accrue d'anions par les cryptes intestinales et à une altération des jonctions serrées (*tight junctions*) entre les entérocytes (Troeger *et al.* 2007). L'apoptose des entérocytes est également accrue en présence de *Giardia*.

L'ensemble de ces phénomènes ne semble pas imputable directement au parasite, mais il est probable que la production cytokinique locale et les dégranulations mastocytaires jouent un rôle dans la physiopathologie de la giardiose (DuPont 2013).

La pathogénicité de *Giardia* est en réalité fortement variable et, de façon classique en parasitologie, dépend des caractéristiques du parasite et de son hôte. Ainsi l'âge, l'immunité, les facteurs génétiques et le microbiote intestinal sont probablement des facteurs influençant l'expression de la maladie, tout comme le génotype et/ou l'origine (animale ou humaine) du protozoaire (DuPont 2013). La malnutrition, qui reste un enjeu de santé publique dans de nombreuses régions du monde, est un facteur de risque de passage à la chronicité. L'immuno-modulation engendrée et les déficits nutritionnels (zinc, vitamine A) font alors perdurer l'infestation (DuPont 2013).

Giardia intestinalis, bien adapté à son hôte, semble nouer des relations étroites avec l'immunité. Afin d'échapper aux effecteurs immunitaires, notamment les IgA sécrétoires, le parasite met en place une variabilité importante de ses antigènes de surface VSP (*Variant Surface Protein*). Ce mécanisme pourrait lui permettre, en modifiant ces potentiels épitopes, d'échapper à la spécificité des immunoglobulines (Adam 2001). La sécrétion de certaines cystine-protéases permettrait également à *Giardia* de dégrader les cytokines chimiotactiques sécrétées par les entérocytes (CXCL8) et de limiter ainsi le recrutement de polynucléaires neutrophiles (Cotton *et al.* 2014).

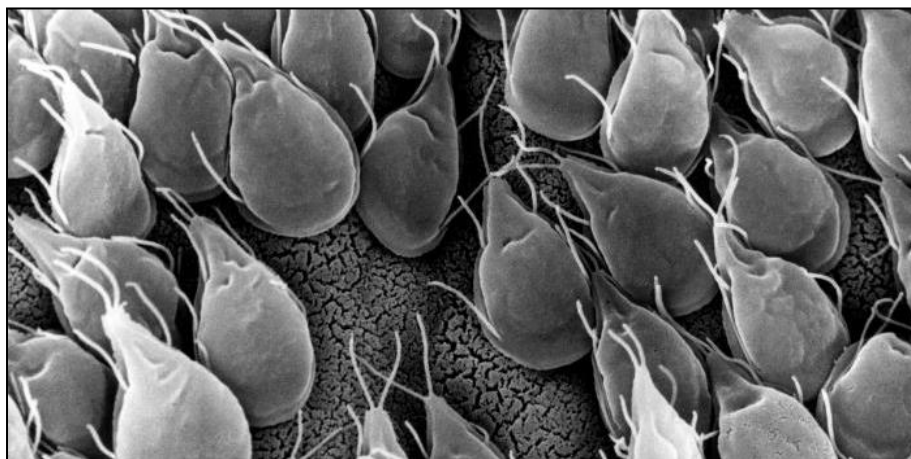


Figure 2 : Trophozoïtes de *G. intestinalis* fixés sur la muqueuse intestinale (MEB, www.boundless.com)

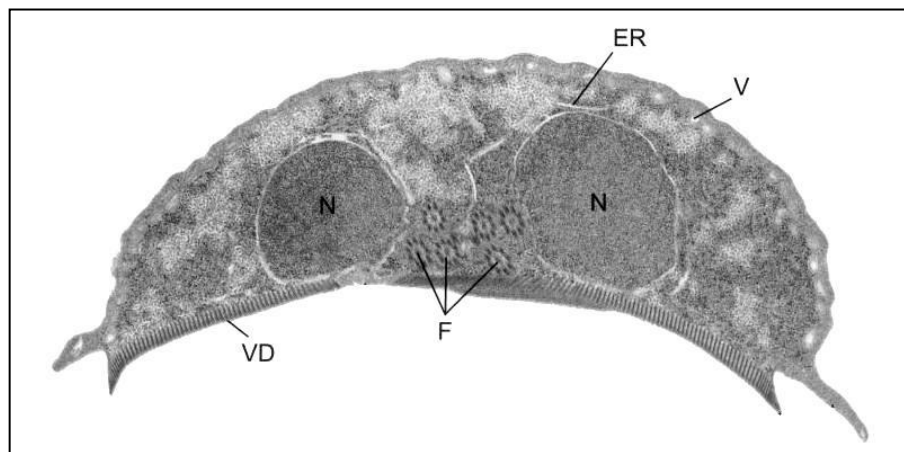


Figure 3 : Coupe transverse d'un trophozoïte de *Giardia* sp. laissant voir les noyaux (N), les flagelles (F) le réticulum endoplasmique (ER), des vacuoles (V) et le disque de fixation ventral (VD)
(MET, Adam R. Clin. Microbiol. Rev. 2001)

1.3. Symptomatologie de la giardiose

Selon le contexte d'infestation, *G. intestinalis* engendre des entités cliniques très différentes. Après 1 à 2 semaines d'incubation, les formes symptomatiques se résument le plus souvent à une diarrhée banale associée à des douleurs abdominales et à des ballonnements (Painter *et al.* 2015). Après une phase aiguë de quelques jours, la maladie est généralement spontanément résolutive même si l'amélioration clinique peut être retardée avec une persistance des symptômes digestifs pendant plusieurs semaines (Tejman-Yarden and Eckmann 2011). Chez l'adulte et l'enfant en bonne santé, l'infestation reste asymptomatique dans 50% des cas (ce pourcentage étant probablement bien supérieur en cas de ré-infestation) (Troeger *et al.* 2007). Toutefois, dans certains contextes, *G. intestinalis* fait preuve d'une pathogénicité inédite. C'est notamment le cas des enfants malnutris. Fortement exposés au parasite avec une immunité immature et altérée par une alimentation insuffisante, ces patients sont particulièrement sensibles au protozoaire. L'infestation, devenant chronique, engendre malabsorptions et stéatorrhées (selles couleur « chamois ») qui entretiennent et aggravent la précarité de l'état nutritionnel. A long terme, *G. intestinalis* engendre chez ces enfants une forte morbidité avec perte de poids et des retards de croissance et intellectuels préoccupants (DuPont 2013). Certains déficits immunitaires rares, notamment humoraux (déficit en IgA), sont aussi susceptibles d'engendrer une symptomatologie sévère et chronique. *A contrario*, notons que les déficits de l'immunité cellulaires n'accroissent pas la sévérité de la giardiose (DuPont 2013).

2. *Cryptosporidium*

2.1. Epidémiologie

Découvert il y a plus d'un siècle par Ernest Edward Tyzzer, le genre *Cryptosporidium* n'est considéré comme réellement pathogène que depuis une trentaine d'année. Ce constat est étonnant, car si la cryptosporidiose est surtout problématique chez le patient VIH ou greffé, cette parasitose peut aussi s'exprimer chez l'immunocompétent sous la forme de vastes épidémies (Tzipori and Widmer 2008). Cosmopolite, liée à un grand nombre d'espèces impliquées dans des cycles zoonotiques et/ou anthroponotiques, la cryptosporidiose est un vaste sujet d'étude pour lequel les futures découvertes restent encore nombreuses. A l'heure actuelle, 22 espèces (Tableau I) sont considérées comme valides sur le plan taxonomique au sein du genre *Cryptosporidium* (Rossle and Latif 2013).

Bien connue en médecine vétérinaire, la cryptosporidiose touche un large panel de vertébrés : mammifères, oiseaux, reptiles, poissons (Leitch and He 2011). Si la plupart des espèces ont un tropisme préférentiel, la spécificité d'hôte de ces parasites est relative et de nombreuses espèces (11 actuellement décrites) peuvent potentiellement infecter l'Homme. 90% des cryptosporidioses humaines sont liées à *C. parvum* et *C. hominis* (Jiang *et al.* 2014)(Rossle and Latif 2013)(Bouzid *et al.* 2013)(ANOFEL *Cryptosporidium* National Network 2010). Si *C. hominis* (ex *C. parvum* génotype I) est presque exclusivement rencontré chez l'Homme, *C. parvum* (ex *C. parvum* génotype II) se retrouve également dans les populations animales (Rossle and Latif 2013). La suprématie de ces deux espèces est constante mais on note cependant de fortes disparités géographiques en terme de distribution. Ainsi, *C. hominis* est majoritaire sur le continent américain, australien et africain, tandis que *C. parvum* représente l'essentiel des souches isolées en Europe (Putignani and Menichella 2010). D'autres espèces peuvent cependant émerger et représenter alors une part non négligeable des cas de cryptosporidiose humaine : c'est ainsi le cas de *C. meleagridis* en Amérique du sud (Leitch and He 2011)(Putignani and Menichella 2010) et de *C. andersoni* en Chine (Jiang *et al.* 2014). D'autres souches d'origine animale peuvent être mises en évidence chez l'homme notamment en cas d'immunodépression ; c'est le cas pour *C. felis*, *C. muris*, *C. canis*, *C. suis*, *C. baileyi* et *C. wrairi* (Rossle and Latif 2013)(Putignani and Menichella 2010). Les populations vivant en milieu rural sont ainsi naturellement exposées à un plus large éventail d'espèces (Leitch and He 2011).

Les études de prévalence de la cryptosporidiose révèlent de fortes disparités régionales. Celle-ci est de 1 à 4% en Europe et aux Etats-Unis, et varie de 1 à 37% sur les continents asiatique, africain, et en Amérique du sud et centrale (Leitch and He 2011). Des études sérologiques effectuées chez des enfants en zone rurale révèlent un pourcentage de séropositivité atteignant 17% aux USA, 50% en Chine et 100% au Brésil (Zu *et al.* 1994). En France l'incidence du parasite dans la population hospitalisée a été évaluée à 1,7% entre 2006 et 2009, mais ces données ne sont pas représentatives de la population générale (ANOFEL Cryptosporidium National Network 2010).

La forte incidence du parasite dans les pays en voie de développement s'explique par le bas niveau socio-économique qui, comme pour le parasite précédemment décrit, accroît considérablement les risques de transmission des pathogènes liés au péril fécal. Dans ces régions, la cryptosporidiose concerne majoritairement les jeunes enfants (avant 5 ans), les personnes âgées, malnutries et les patients infectés par le VIH (Rossle and Latif 2013).

Le mode de contamination par *Cryptosporidium* est fortement lié à l'eau. La résistance du parasite à certaines méthodes de traitement des eaux usées (potentiellement contaminées par les déjections humaines ou animales) lui permet de persister dans les eaux de distribution. Ceci explique la transmission, y compris dans les pays développés, du parasite sur le mode épidémique. Durant la dernière décennie, parmi les 71 épidémies de cryptosporidioses recensées (Etats-Unis, Canada, Australie, Royaume-Uni), 56% étaient directement liées au système de distribution de l'eau (Putignani and Menichella 2010). Ces épidémies peuvent être massives. Ainsi en 2010, 45% de la population d'Östersund, en Suède, fut touchée par *C. hominis*, soit 27000 personnes (Widerström *et al.* 2014). D'autres modes de contamination existent cependant, comme la baignade dans les piscines publiques ou les plans d'eau, la consommation de légumes crus mal nettoyés, le contact avec les animaux ou avec des personnes infectées (Bouzid *et al.* 2013). Ceci explique probablement la saisonnalité de l'épidémiologie de la cryptosporidiose. En France, comme dans d'autres pays, un pic d'incidence saisonnier se situe ainsi entre la fin de l'été et le début de l'automne (ANOFEL Cryptosporidium National Network 2010). Cette période est en effet propice aux baignades dans des eaux potentiellement contaminées. En outre, les jeunes animaux, nés au cours de l'année, excrètent une grande quantité d'oocystes dans l'environnement.

La prévalence de *Cryptosporidium* chez le patient VIH atteint 6,6% en Europe, la susceptibilité au parasite (notamment aux espèces d'origine animale) et la gravité de la clinique étant proportionnelles à la chute du taux de lymphocytes TCD4. Chez le patient sidéen, le pourcentage des espèces non *parvum/hominis* atteint 27,5% (Hunter and Nichols 2002).

Tableau I : Espèces du genre *Cryptosporidium* et leurs hôtes habituels. * : espèces décrites comme infectant l'homme (d'après Rossle *et al.* Asian Pac J Trop Biomed 2013)

Espèce	Hôte habituel
<i>C. hominis</i> *	Homme
<i>C. parvum</i> *	bovins, Homme
<i>C. andersoni</i> *	bovins
<i>C. felis</i> *	chats
<i>C. suis</i> *	porcs
<i>C. muris</i> *	rongeurs
<i>C. canis</i> *	chiens
<i>C. cuniculus</i> *	lapins
<i>C. meleagridis</i> *	oiseaux, Homme
<i>C. baileyi</i> *	volailles
<i>C. wrairi</i> *	cochon d'Inde
<i>C. bovis</i>	bovins, ovins
<i>C. galli</i>	oiseaux
<i>C. serpentis</i>	reptiles
<i>C. saurophilum</i>	reptiles
<i>C. molnari</i>	poissons
<i>C. scophthalmi</i>	poissons
<i>C. xiaoi</i>	ovins, caprins
<i>C. fragile</i>	amphibiens
<i>C. ryanae</i>	bovins
<i>C. macropodum</i>	kangourou
<i>C. fayeri</i>	kangourou

2.2. Cycle parasitaire et physiopathologie

Cryptosporidium est une coccidie appartenant à l'embranchement des Apicomplexa. Comme *Toxoplasma* et *Plasmodium*, ce protozoaire est caractérisé par la présence d'un complexe apical permettant l'interaction avec la cellule hôte puis son invasion. La contamination par *Cryptosporidium* se fait par l'ingestion accidentelle d'oocystes. Cette forme de dissémination, à l'image des kystes précédemment décrits pour la giardiose, est particulièrement résistante dans l'environnement extérieur. Sous l'influence de la température, de l'acidité gastrique et surtout des sels biliaires, l'oocyste se fend et libère quatre sporozoïtes dans l'intestin grêle de son hôte (Leitch and He 2011)(Bouzid *et al.* 2013). Les sporozoïtes, mobiles par leurs mouvements rotatoires et hélicoïdaux (Bouzid *et al.* 2013), pénètrent alors la couche de mucus et parviennent jusqu'à l'épithélium intestinal. La compréhension des mécanismes d'interaction entre le parasite et l'entérocyte est encore limitée à l'heure actuelle. Il semble toutefois que le sporozoïte dispose de récepteurs capables de reconnaître spécifiquement les antigènes entérocytaires comme la glycoprotéine p57 (Leitch and He 2011).

Des protéines contenues dans les micronèmes du parasite, comme la gp900, permettent en outre d'induire l'invasion de la cellule hôte (Bouzid *et al.* 2013). Au niveau de sa bordure en brosse, le contact avec *Cryptosporidium* engendre des modifications structurales importantes chez l'entérocyte : une forte polymérisation de l'actine entraîne un allongement des microvillosités de part et d'autre du sporozoïte, ce phénomène aboutissant finalement à l'enfermement du pathogène dans une vacuole parasitophore. Cette vacuole, bien que constituée avec la membrane plasmique de l'entérocyte, isole le parasite du cytoplasme cellulaire. Le protozoaire possède une biosynthèse limitée. Afin d'obtenir les nutriments dont il a besoin, le trophozoïte de *Cryptosporidium* interagit avec le milieu intracellulaire par l'intermédiaire d'un « organe nourricier » (« *feeder organelle* »), unique chez les Apicomplexa et situé à la jonction de la vacuole et du cytoplasme entérocytaire (Leitch and He 2011)(Bouzid *et al.* 2013). La création de ce type de vacuole se retrouve aux différentes phases du cycle parasitaire, à l'occasion de chaque invasion cellulaire.

La reproduction asexuée de *Cryptosporidium* s'effectue par mérogonie. Le méronte de type I (formé après mitoses du trophozoïte) libère alors six à huit mérozoïtes qui, à l'image des sporozoïtes initiaux, infestent de nouvelles cellules hôtes. Le méronte de type II permet la reproduction sexuée du protozoaire : quatre mérozoïtes sont alors libérés et vont, après infestation de nouveaux entérocytes, engendrer la formation de microgamontes (mâles) et macrogamontes (femelles). La fécondation du macrogamonte par les microgamètes libérés par le microgamonte aboutit finalement à la formation d'un zygote diploïde. Ce zygote, après méiose, se différencie alors en un oocyste contenant quatre sporozoïtes. Deux types d'oocystes peuvent être engendrés. L'oocyste à paroi fine (*thin-walled-oocyst*), représentant 20% des oocystes formés, libère ses sporozoïtes infestant chez l'hôte initial, entraînant dans certains cas la chronicisation de la maladie par des cycles d'auto-infestation. L'oocyste à paroi épaisse (*thick-walled oocyst*), représentant 80% des oocystes formés, est évacué avec les selles et peut ainsi potentiellement infecter un nouvel hôte (Rossle and Latif 2013)(Leitch and He 2011)(Bouzid *et al.* 2013).

L'altération de la bordure en brosse des entérocytes, l'altération des jonctions serrées intercellulaires et l'action locale des cytokines vont entraîner une malabsorption et une augmentation de la perméabilité épithéliale, engendrant une importante fuite liquidienne vers le compartiment intra-luminal (Leitch and He 2011). Dans certaines situations pathologiques, notamment chez l'immunodéprimé, *Cryptosporidium* peut se multiplier au niveau des épithéliums gastriques, biliaires, pancréatiques et pulmonaires. Dans ce dernier cas, le mode de contamination est encore mal compris (Leitch and He 2011), même si l'inhalation des oocystes semble pouvoir mener à une infestation respiratoire (Bouzid *et al.* 2013).

Le rôle de l'immunité est primordial dans le contrôle de la cryptosporidiose. Outre l'immunité innée, l'immunité adaptative cellulaire semble jouer un rôle essentiel (Leitch and He 2011)(Bouزيد *et al.* 2013).

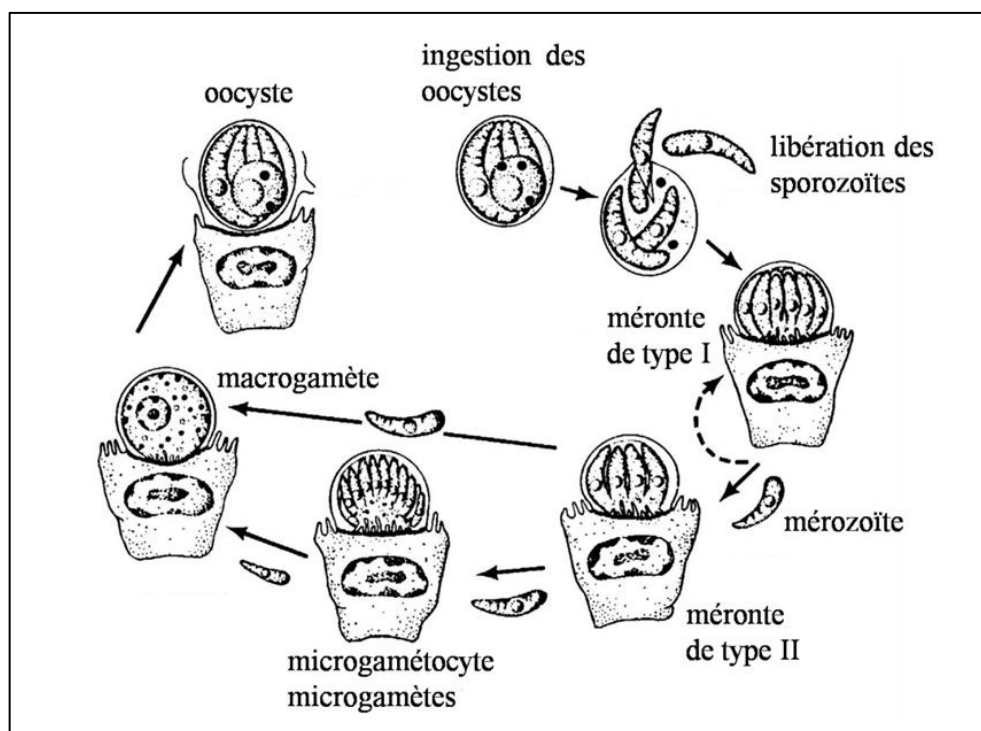


Figure 4 : Cycle parasitaire de *Cryptosporidium* spp.
(Upton S.J. www.k-state.edu)

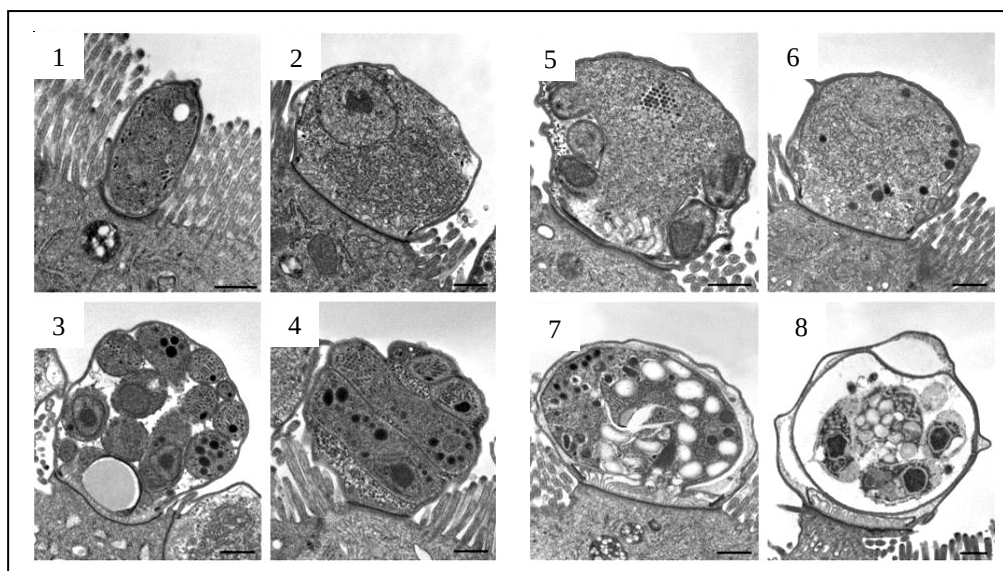


Figure 5 : Différentes phases du cycle parasitaire de *C. hominis*. 1 et 2 : trophozoïte, 3 : méronte de type I, 4 : méronte de type II, 5 : microgamonte en division, 6 : macrogamonte, 7 : zygote, 8 : oocyste à paroi épaisse (MET, Tzipori S. *et al. Microbes Infect.* 2002)

2.3. Symptomatologie de la cryptosporidiose

Chez l'adulte immunocompétent l'infestation par *Cryptosporidium*, quand elle n'est pas asymptomatique, se caractérise par un syndrome diarrhéique associant diarrhées aqueuses, douleurs abdominales, nausées, vomissements et parfois une fièvre modérée (Leitch and He 2011). Ces symptômes sont généralement spontanément résolutifs en deux à trois semaines (Leitch and He 2011)(Bouzig et al. 2013). Les manifestations cliniques pourraient différer sensiblement selon l'espèce impliquée. Ainsi les infestations à *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis* ou *C. felis* provoquent principalement des diarrhées. A contrario, *C. hominis* semble associé à une symptomatologie plus prononcée avec vomissements, céphalées récurrentes, fatigue, douleurs articulaires (Bouzig et al. 2013). La cryptosporidiose engendre un tableau clinique bien plus préoccupant chez le patient immunodéprimé. Les patients VIH au stade SIDA sont heureusement de plus en plus rares, mais l'augmentation du nombre d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et de transplantations d'organes solides (rein notamment) offrent de nouvelles opportunités au parasite. Chez le sidéen, *Cryptosporidium* provoque une diarrhée profuse persistante et incontrôlable pouvant atteindre 17 litres par jour, engendrant une déshydratation et une altération de l'état général pouvant mettre en jeu le pronostic vital (Tzipori and Widmer 2008)(Leitch and He 2011). Des manifestations extra-intestinales interviennent également chez le patient immunodéprimé, avec des atteintes gastriques (rétrécissement antral), biliaires (cholécystite, cholangite sclérosante), pancréatiques et possiblement pulmonaires (Bouzig et al. 2013)(Hunter and Nichols 2002). La cryptosporidiose peut aussi se chroniciser sur certains terrains, comme chez les enfants malnutris dans les zones de forte endémicité. Le parasite peut alors altérer significativement la croissance et le développement psychique, et ce même en l'absence de signes digestifs évidents (Rossle and Latif 2013)(Leitch and He 2011).

3. *Entamoeba histolytica*

3.1. Épidémiologie

Comme les autres parasites à transmission féco-orale (liée au péril fécal), *E. histolytica* est largement répandu dans les pays en voie de développement dont le niveau socio-économique ne permet pas, aujourd'hui encore, l'accès à un niveau d'hygiène suffisant (accès à des sanitaires notamment). Le continent africain, le sous-continent indien, l'extrême orient et l'Amérique du sud sont ainsi des régions particulièrement touchées par l'amoebose (Ali *et al.* 2008).

Les chiffres épidémiologiques, connus depuis de nombreuses années, doivent être lus avec un œil critique. En effet, *Entamoeba histolytica* étant difficilement différenciable morphologiquement des autres espèces du genre *Entamoeba* (*E. dispar* et *E. moshkovskii*), l'épidémiologie précise de cette espèce requiert un diagnostic spécifique (détection antigénique ou technique moléculaire). Il est probable que de nombreuses études épidémiologiques surestiment la prévalence d'*E. histolytica* en employant une détection microscopique. D'autre part, si l'absence de pathogénicité d'*E. dispar* semble aujourd'hui admise, il n'en est pas de même pour *E. moshkovskii* dont le potentiel rôle pathogène reste à établir (Ralston and Petri 2011).

L'amoebose touche environ 50 millions de personne dans le monde avec un taux de mortalité, lié aux complications intestinales ou extra-intestinales des formes invasives, avoisinant les 100.000 décès par an (Ali *et al.* 2008)(Bercu *et al.* 2007a)(Ximénez *et al.* 2009). Considérant que 80 à 90% des infestations sont asymptomatiques (Ximénez *et al.* 2009), 500 millions de personnes pourraient être touchées par cette amibe. *E. histolytica* représente la quatrième cause de décès liée à un protozoaire dans le monde derrière le paludisme, la maladie de Chagas et la leishmaniose viscérale, et se positionne en troisième position derrière le paludisme et la trichomonose en terme de morbidité (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000). L'âge conditionne la susceptibilité à l'amoebose intestinale, les pics d'incidence se situant avant 14 ans et après 40 ans (Ali *et al.* 2008). Les enfants sont particulièrement touchés par cette parasitose, qui entraîne malnutrition et indirectement une diminution des performances scolaires (Bercu *et al.* 2007a). Une étude menée au Bangladesh sur 289 enfants âgés de 2 à 5 ans a montré, sur une période d'observation de 4 ans, que l'amoebose a touché 80% des patients (dont 75% asymptomatiques), 53% d'entre eux ayant présenté des infestations récurrentes (Haque *et al.* 2006). L'infection par le VIH expose à un risque accru d'amoebose. Ainsi, au Mexique, la prévalence de cette parasitose atteint 25% chez les patients infectés par le VIH, contre 18% dans le groupe contrôle (Ali *et al.* 2008).

Dans les pays développés, l'amébose touche principalement les voyageurs de retour des zones les plus endémiques. 3% des diarrhées aiguës au retour de voyage sont ainsi directement imputable à *E. histolytica* (Bercu *et al.* 2007a). Certaines pratiques sexuelles augmentent aussi le risque de transmission du parasite ; les homosexuels masculins représentent ainsi une population à risque accru d'amébose (Ali *et al.* 2008).

3.2. Cycle parasitaire et physiopathologie

Entamoeba histolytica appartient au sous-embranchement des Sarcodina ou Rhizopodes. La forme trophozoïte (ou forme végétative) de cette amibe se déplace grâce à la formation de pseudopodes. L'amibe existe également sous une forme kystique qui constitue la forme de résistance et de dissémination dans l'environnement. Protégé par une épaisse paroi chitineuse, le kyste amibien peut survivre plusieurs semaines dans l'eau ou le sol, jusqu'à son ingestion accidentelle par son hôte (aliments ou eau souillés). Dans l'iléon distal, sous l'action des sucs digestifs, le kyste se désincarcère alors de sa paroi protectrice et engendre 8 trophozoïtes mobiles (Ximénez *et al.* 2009). Les trophozoïtes, qui colonisent préférentiellement le caecum et le côlon ascendant (régions riches en bactéries dont ils se nourrissent), ont la capacité de se multiplier par mitoses successives et d'engendrer de nouvelles formes kystiques inertes qui seront alors éliminées avec les selles.

Si son cycle est similaire à celui des amibes non pathogènes couramment retrouvées chez l'homme (*Entamoeba dispar*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, etc.), *E. histolytica* possède une pathogénicité unique. Disposant d'un arsenal chimique et enzymatique, cette amibe a en effet la capacité d'envahir la muqueuse intestinale voire de progresser dans les matrices extracellulaires profondes (Ralston and Petri 2011).

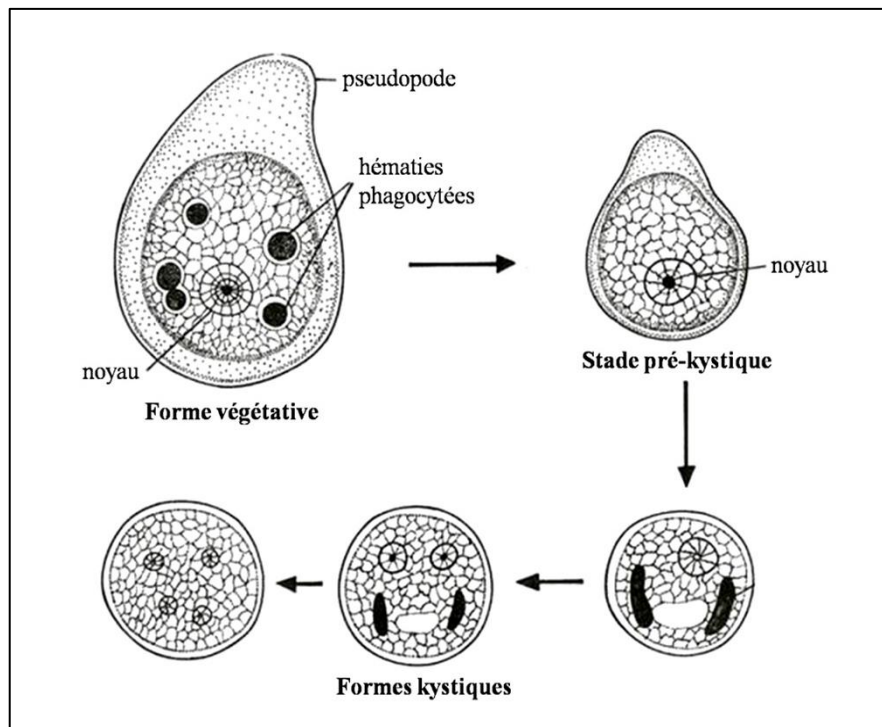


Figure 6 : Différents stades parasites du cycle d'*Entamoeba histolytica* (S. Pujari, www.yourarticlelibrary.com)

La colite amibienne débute lors de l'envahissement du mucus intestinal par les formes trophozoïtes. Ce mucus épais protège les cellules épithéliales sous-jacentes et joue le rôle de barrière naturelle vis-à-vis des pathogènes. Doté d'un large panel d'enzymes (glucosidases, galactosidases, mannosidases, fucosidases, xylosidases, glucuronidases, amylases, hyaluronidases, etc.), *E. histolytica* est capable de rompre l'intégrité de ce film protecteur (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000). Une cystine-protéase, en clivant la mucine MUC2, composant majeur du mucus, joue également un rôle essentiel (Bercu *et al.* 2007a).

Une fois cette barrière franchie, l'amibe peut ensuite éroder l'épithélium lui-même. Là encore, le parasite possède de multiples atouts, à commencer par la lectine Gal/GalNAc qui lui permet de se lier aux glycoprotéines des cellules épithéliales. Le protozoaire est capable d'engendrer la cytolysse, par l'intermédiaire de cette lectine et d'autres « toxines amibiennes » comme les amoebapores ; des peptides qui, à l'image des perforines de notre système immunitaire, sont à même de créer un canal protéique en s'associant entre eux (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000). Les mécanismes de cytolysse sont complexes et parfois mal connus.

Il est ainsi démontré que *E. histolytica* est aussi capable de déclencher la voie apoptotique des caspases, le contact du parasite avec la cellule endothéliale entraînant une forte élévation des concentrations cytosoliques en calcium et une inhibition des tyrosine-phosphorylases. Ces mécanismes, probablement intriqués, sont alors à même de mener la cellule à l'apoptose (Ralston and Petri 2011).

La motilité de l'amibe est aussi un outil utile dans sa progression. La poussée de l'endoplasme engendrée par la polymérisation de son cytosquelette d'actine entraîne la formation d'un pseudopode permettant au protozoaire de s'infiltrer entre les cellules glandulaires de l'épithélium (Ralston and Petri 2011). Dans la sous-muqueuse, des protéines d'adhésion à la fibronectine et des enzymes lytiques (hyaluronidases, collagénases) permettent au trophozoïte de progresser. Pour assurer ses besoins indispensables en fer, *E. histolytica* pratique l'érythrophagocytose. Dans les vésicules d'endocytose, une hémoglobinease permet la digestion de l'hémoglobine (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000). Une fois située dans les tissus profonds de son hôte, l'amibe peut alors disséminer par voie hématogène via le système porte et engendrer des abcès à distance et notamment au niveau hépatique.

L'invasion de la muqueuse entraîne chez l'hôte une forte mobilisation des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles, macrophages), mais *E. histolytica*, avec l'arsenal décrit précédemment, est capable de résister au système immunitaire. La lectine Gal/GalNAc a aussi la capacité d'empêcher l'action du complexe d'attaque membranaire du complément (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000).

L'action pathogène semble être conditionnée par de multiples facteurs d'hôte, comme la composition du mucus ou de la flore commensale bactérienne (Bercu *et al.* 2007b). La présence d'IgA sécrétoires anti-CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) dirigées contre la lectine parasitaire permet de limiter fortement la pathogénicité de l'amibe notamment au cours d'une ré-infestation (Haque *et al.* 2006).

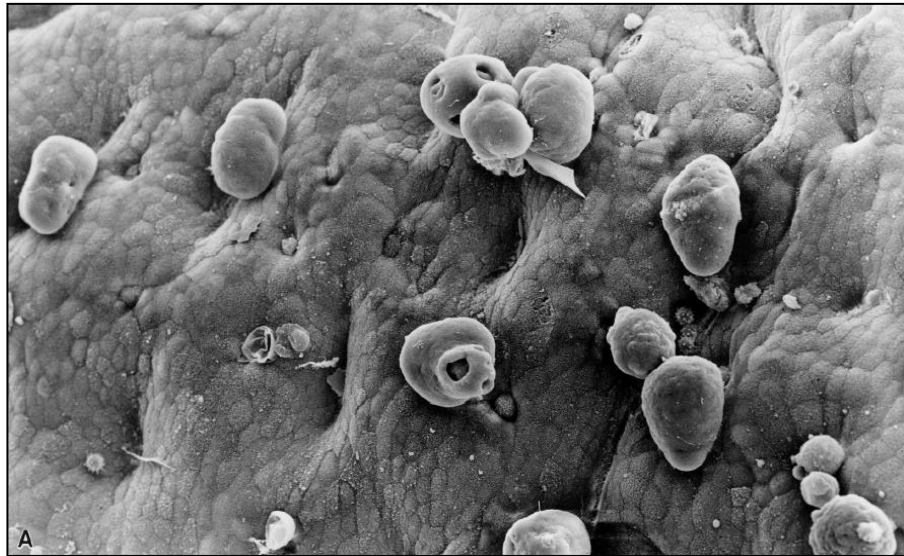


Figure 7 : Adhésion de trophozoïtes d'*E. histolytica* à l'épithélium intestinal (MEB, Espinosa-Cantellano *et al.* Clin. Microbiol. Rev. 2000)



Figure 8 : Ulcération de l'épithélium intestinal (MEB, Espinosa-Cantellano *et al.* Clin. Microbiol. Rev 2000)

3.3. Symptomatologie de l'amoebose

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'infestation par *E. histolytica* n'est pas toujours symptomatique. 90% des patients sont ainsi colonisés sans pour autant présenter de signes digestifs (ou mineurs). Selon la charge parasitaire et le degré d'envahissement de la muqueuse digestive, l'amoebose peut revêtir des aspects cliniques distincts. La colite amibienne évolue souvent insidieusement pendant une à plusieurs semaines (Bercu *et al.* 2007b), l'intensité des troubles digestifs étant proportionnels à l'évolution des ulcérations coliques. La dysenterie amibienne se caractérise par l'émission de trois à cinq selles glairo-sanglantes par jour, associées à des douleurs abdominales, épreintes et ténesmes. L'extension du parasite s'accompagne ensuite d'une diarrhée aqueuse profuse striée de sang (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000). A ce stade, la présence du parasite étant limitée au tube digestif, les manifestations systémiques et la fièvre sont rares : seulement 30% des patients sont fébriles (Bercu *et al.* 2007b), ce qui distingue cette parasitose des étiologies bactériennes.

D'autres entités cliniques, plus rares, peuvent survenir : amoebome (infiltration granulaire), appendicite amibienne, colite nécrotique, mégacôlon. En zone de forte endémie, la répétition des épisodes peut entraîner une colite chronique post-amibienne avec des troubles de transit récurrents. La dissémination des amibes dans le torrent circulatoire porte peut engendrer la formation d'un kyste amibien hépatique. Si le foie, de par sa localisation, est l'organe préférentiellement ciblé par *E. histolytica*, d'autres atteintes viscérales sont possibles par voie hématogène ou par contiguïté (poumon, cerveau). L'amoebose hépatique peut survenir à distance de l'épisode dysentérique (si celui-ci a eu lieu). Celle-ci débute brutalement, la fièvre s'accompagnant de douleurs à l'hypocondre droit dans 90% des cas (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo 2000). Le traitement de l'amoebose, qui évolue toujours défavorablement, est indispensable. Dans ces conditions, le biologiste doit pouvoir disposer d'outils diagnostiques fiables et performants.

4. Examen parasitologique des selles (EPS) : la microscopie

4.1. Place de l'EPS dans la nomenclature des actes de biologie médicale

La nomenclature des actes de biologie médicale définit précisément les modalités de l'examen parasitologique des selles et la cotation associée. Selon le contexte, l'EPS associe un examen direct à une ou deux techniques de concentration (figure 9). La recherche de formes végétatives est effectuée sur des selles fraîchement émises. Notons que la recherche de copro-antigènes parasitaires dans les selles est hors nomenclature (BHN 100), tout comme les techniques de biologie moléculaire.

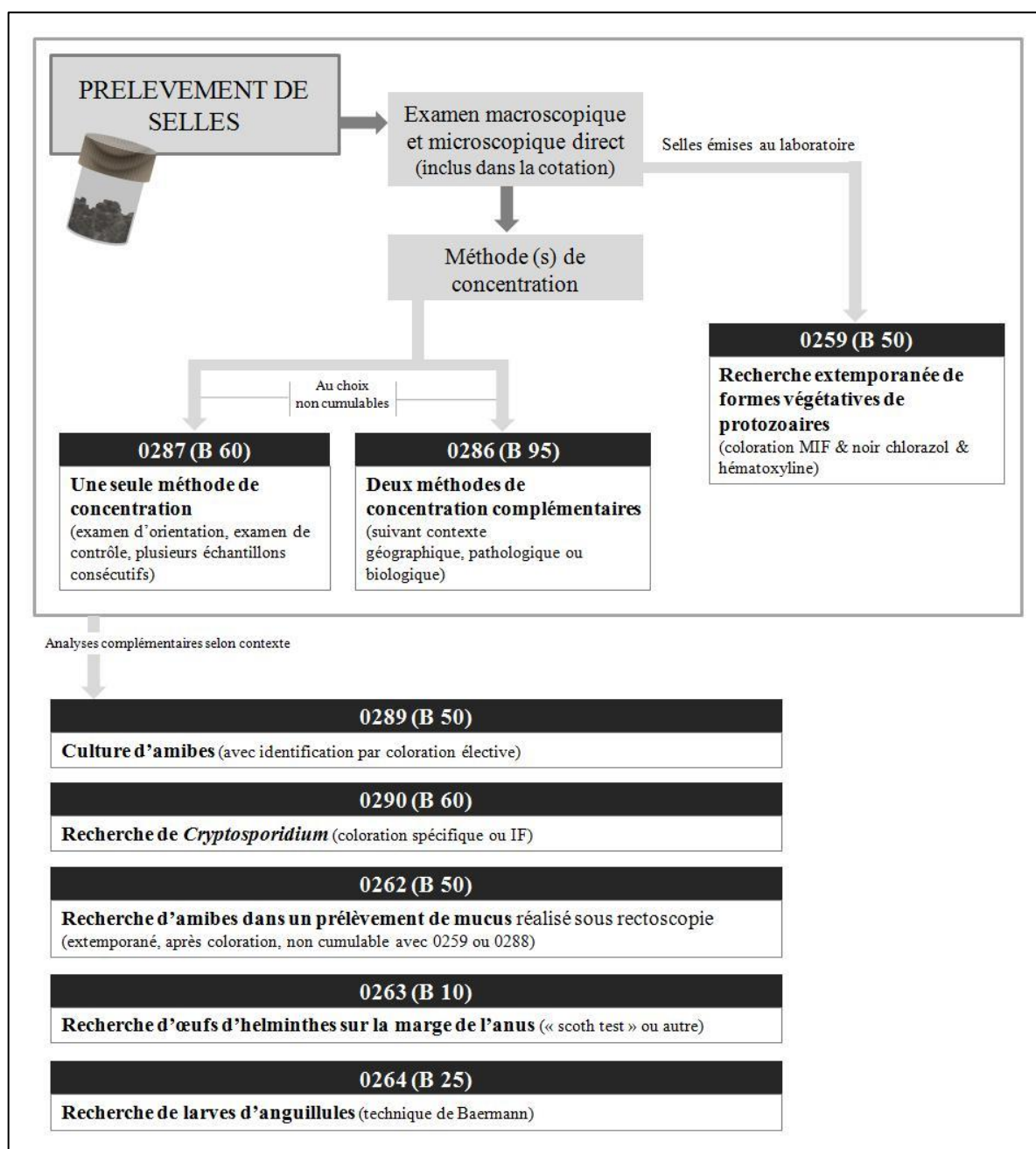


Figure 9 : Cotation de l'examen parasitologique des selles (nomenclature des actes de biologie médicale – septembre 2014)

4.2. Phase pré-analytique

• Recueil des selles

Comme pour tout examen de biologie médicale, la phase pré-analytique de l'examen parasitologique des selles est essentielle. Le recueil de la totalité de la selle émise est absolument conseillé, et le laboratoire doit ainsi fournir au patient (ou au service hospitalier correspondant) un flacon de contenance suffisante (250 – 300 ml). Outre l'appréciation globale de l'aspect macroscopique du prélèvement et des éventuels parasites visibles, cela offre le choix de différentes zones pour la réalisation de l'examen microscopique et assure naturellement une quantité appréciable de matière pour les techniques de concentration (Bailenger 1982). Le nombre de prélèvements influe également sur la sensibilité analytique de l'examen. Les émissions d'œufs ou de kystes parasitaires étant irrégulières dans les fèces, un **triple recueil de selles** est donc recommandé, celui-ci devant idéalement s'étaler sur une période d'une dizaine de jour (Bailenger 1982)(McHardy *et al.* 2014). L'acheminement au laboratoire doit être rapide, idéalement dans les 30 à 60 minutes suivant l'émission de la selle.

La sensibilité de l'examen microscopique varie de 58 à 72% sur un échantillon unique. Le prélèvement de 3 échantillons, pour la détection d'*E. histolytica* et de *G. intestinalis*, permet d'augmenter la sensibilité respectivement de 23% et 11% (McHardy *et al.* 2014)(Hiatt *et al.* 1995).

• Techniques de fixation

Même si l'examen parasitologique des selles doit idéalement s'effectuer dans les 30 à 60 minutes, notamment pour les échantillons susceptibles de contenir des formes végétatives, il est parfois nécessaire de différer l'analyse. Dans cette situation, l'utilisation d'un fixateur permet de préserver les formes trophozoïtes éventuellement présentes dans l'échantillon (Bailenger 1982)(McHardy *et al.* 2014). Les fixateurs habituellement utilisés sont le formol (5 ou 10%), le SAF (*Sodium acetate – Acetic acid – Formaldehyde*), le fixateur de Schaudinn et les solutions polyvinyliques (PVA : *PolyVinyl Alcohol*) (McHardy *et al.* 2014)(Fotedar *et al.* 2007).

Le *gold standard* actuel consiste à utiliser 2 fixateurs : le formol permet la réalisation ultérieure d'une technique de concentration afin de faciliter la visualisation des kystes et des œufs, tandis que le PVA conserve les trophozoïtes en vue d'une coloration (McHardy *et al.* 2014). Toutefois, le formol et le chlorure mercurique contenus dans les solutions de fixations posent des problèmes de toxicité et de traitement des déchets pour les laboratoires. Des alternatives, basées sur l'utilisation d'un seul fixateur, remplissant les rôles du formol et du PVA, sont actuellement évaluées (Pietrzak-Johnston *et al.* 2000). Le SAF est à même de satisfaire cette double fonction.

Cependant, le SAF ne peut être couplé à la coloration de trichrome car les préparations microscopiques réalisées sont alors de faible qualité. Toutefois, l'association de ce fixateur avec une coloration permanente à l'hématoxyline ferrique est tout à fait satisfaisante (McHardy *et al.* 2014). D'autres alternatives basées notamment sur des solutions polyvinyliques dénuées de chlorure mercurique (ici remplacé par le sulfate de zinc) existent également, comme le kit Ecofix (Meridian®) dont les qualités de fixation sont équivalentes au PVA (Pietrzak-Johnston *et al.* 2000). La sensibilité de certains tests, notamment immuno-chromatographiques, peut toutefois être diminuée sur les échantillons fixés avec Ecofix par rapport à une fixation formolée (Johnston *et al.* 2003).

Tableau II : Solutions de fixation utilisables pour les échantillons de selles (McHardy *et al.* 2014) (Bailenger 1982)

Fixation	Réactifs	Notes
Méthode au PVA	Alcool polyvinylique, fixateur de Schaudinn (chlorure mercurique), acide acétique, glycérol	Pas de test immuno-chromatographique réalisable, toxicité importante
Méthode de Scholten	Fixateur de Schaudinn, acide acétique, glycérol, albumine	(cf précédent)
Méthode de Burrows	PAF (phénol - alcool - formol) colorant: thionine	Pas d'utilisation avec les colorations permanentes (trichrome, hématoxyline)
MIF (Merthiolate - iode - Formol)	Solution MF + solution de lugol	Visualisation des protozoaires parfois délicate
Formol	Formol 5 ou 10%	Mauvaise conservation des trophozoïtes
SAF	Acétate de sodium, acide acétique, formaldéhyde	Morphologie des trophozoïtes possiblement altérée
Schaudinn modifié	Alcool polyvinylique, fixateur non mercurique (Zn, Cu)	Pas de test immuno-chromatographique réalisable, morphologie des trophozoïtes possiblement altérée

4.3. Examen microscopique direct à l'état frais

L'examen parasitologique des selles commence par l'examen direct. Celui-ci consiste au montage entre lame et lamelle d'un fragment de selles, idéalement fraîchement émises, généralement dilué avec un peu de sérum physiologique. Toutefois ce type de montage peut également être effectué sur un échantillon fixé en cas d'examen différé. En effet, la mise en évidence de formes végétatives mobiles doit être réalisée peu après émission de la selle (idéalement dans les 30 minutes) sur les selles molles, liquides, ou sur les glaires muqueuses et/ou sanguinolentes présentes sur les fèces. Afin de pouvoir observer la mobilité caractéristique des trophozoïtes, la préparation peut être placée sur une platine microscopique chauffante à 37°C (Bailenger 1982). Il est ainsi possible de visualiser la progression rapide et saccadé (en « chute de feuille ») du trophozoïte de *G. intestinalis*, ou le déplacement lent et orienté de la forme végétative d'*E. histolytica*. La présence de globules rouges dans cette amibe hématophage peut aussi être mise en évidence (Bailenger 1982).

L'examen direct à l'état frais peut également être accompagné d'une coloration entre lame et lamelle afin d'améliorer la visualisation des structures parasitaires internes (voir 4.5).

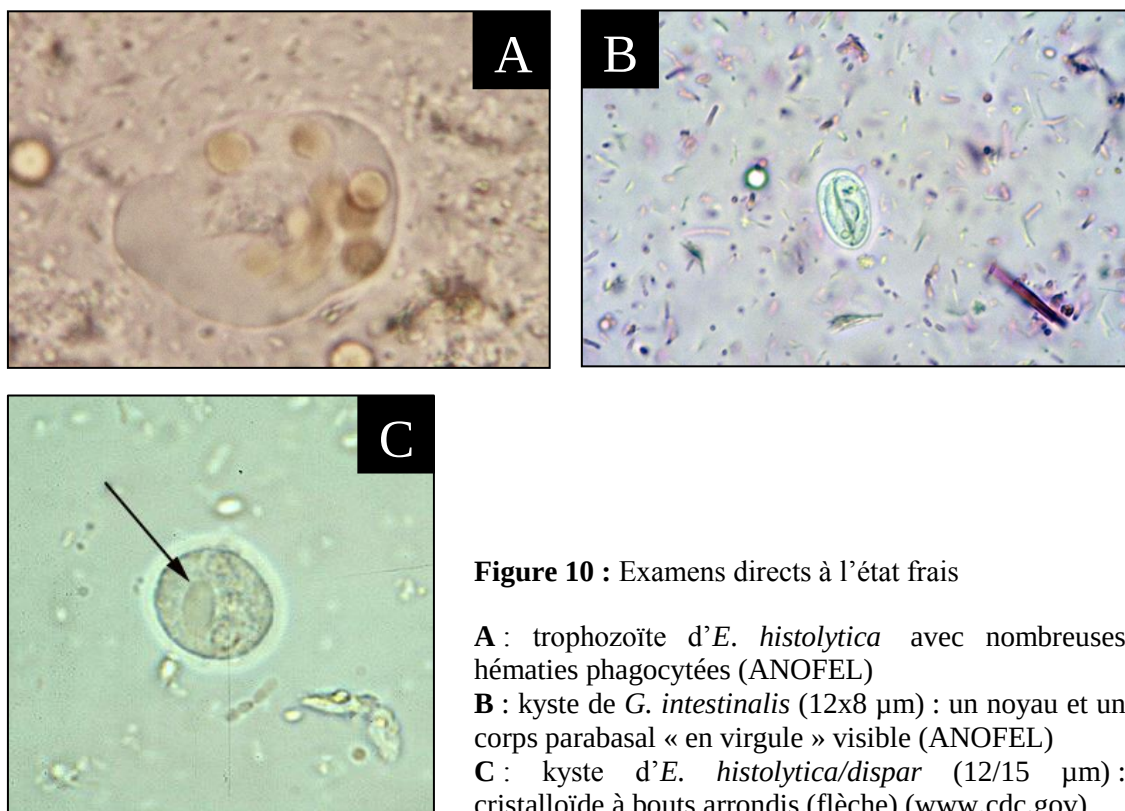


Figure 10 : Examens directs à l'état frais

A : trophozoïte d'*E. histolytica* avec nombreuses hématies phagocytées (ANOFEL)

B : kyste de *G. intestinalis* (12x8 µm) : un noyau et un corps parabasal « en virgule » visible (ANOFEL)

C : kyste d'*E. histolytica/dispar* (12/15 µm) : cristalloïde à bouts arrondis (flèche) (www.cdc.gov)

4.4. Examen microscopique après concentration

Les techniques d'enrichissement sont indissociables de l'examen parasitologique des selles. Les selles représentent en effet une matrice complexe mélangeant des débris alimentaires de diverses tailles et une très riche flore bactérienne. En éliminant nombre de débris, la concentration permet d'éclaircir la préparation microscopique et ainsi d'en faciliter la lecture. D'autre part, la concentration des éléments parasitaires dans un faible volume augmente significativement la sensibilité de l'examen microscopique (Bailenger 1982). Les techniques utilisées au laboratoire, décrites comme « physico-chimiques », utilisent les différences de densité relative entre les éléments parasitaires par rapport au milieu de dilution, ainsi que leur équilibre hydrophile – lipophile. Nous décrirons successivement les techniques utilisant le principe de la sédimentation, de la flottation et de la concentration diphase.

- **Sédimentation** : Ces méthodes, très simples, utilisent la sédimentation (parfois accélérée par la centrifugation) des éléments parasitaires dans un diluant de densité moyenne. Les manipulations sont cependant conséquentes et le temps de réalisation important. Ces méthodes sont adaptées à la recherche d'œufs d'helminthes (*Schistosoma* notamment), mais **ne conviennent pas pour les kystes de protozoaires** (Bailenger 1982).

- **Flottation** : Cette fois, l'utilisation d'un diluant de forte densité fait remonter les éléments parasitaires dans le film superficiel de la surface. Cette méthode simple est également adaptée principalement à la détection des œufs d'helminthes. Les selles riches en lipides sont problématiques, les graisses se concentrant également en surface du diluant (Bailenger 1982). Certains kits commerciaux utilisent le principe de flottation avec des dispositifs à usage unique (FLOTAC) simples à employer et permettant d'établir facilement une numération des œufs (Cringoli 2006).

Les techniques de concentration par sédimentation et par flottation sont adaptées à la recherche des œufs d'helminthes (*Schistosoma*, *Ascaris*, ankylostomidés), mais ne permettent pas une concentration efficace des kystes de protozoaires. Dans ces conditions, l'utilisation isolée de ces méthodes n'est pas envisageable. Il conviendra alors d'y associer une technique adaptée aux protozoaires, ou de choisir une technique plus polyvalente comme celles utilisant le principe de la concentration diphase.

Tableau III : Techniques de concentration adaptées à la recherche d'œufs d'helminthes (d'après Bailenger 1982)

Méthode	Technique	Parasites ciblés
Techniques par sédimentation		
Méthode de Faust et Ingalls	Diluant: eau glycinée 0,5% filtration de la suspension suivie de 3 sédimentations (60/45/30')/décantations	Œufs de <i>Schistosoma</i>
Méthode de Jahnes et Hodges	Diluant: éthanol 10% (protocole identique au précédent)	Œufs de <i>Schistosoma</i>
Méthode de Baroody et Most	Diluant: eau filtration de la suspension suivie de 2/3 centrifugations/décantations	Œufs de <i>Schistosoma</i>
Techniques par flottation		
Méthode de Fülleborn	Diluant: NaCl saturé (25%) filtration de la suspension puis récupération du surnageant à l'anse après 45' de flottation	Œufs d'ankylostomides et d' <i>Ascaris</i>
Méthode de Willis	Diluant: NaCl saturé (25%) filtration de la suspension puis récupération du surnageant sur lame (laissée 20-45')	Œufs d'ankylostomides et d' <i>Ascaris</i>
Méthode de Janeckso et Urbanyi	Diluant: iodomercurate de potassium filtration de la suspension, centrifugation puis récupération du surnageant à l'anse	Œufs d'helminthes (sauf <i>Ascaris</i>), larves, kystes de <i>Giardia</i>
Méthode de Faust	Diluant: ZnSO ₄ (33%) filtration de la suspension, 3/4 centrifugations avec de l'eau, reprise dans une solution de ZnSO ₄ puis récupération du surnageant	Œufs d'helminthes (sauf œufs operculés et <i>Schistosoma</i>)

• **Méthodes diphasiques :** De part leur simplicité et leur rapidité de mise en œuvre, les méthodes de concentration diphasique sont couramment employées au laboratoire de parasitologie. Celles-ci permettent en outre l'enrichissement de nombreuses espèces parasitaires (à l'exception des œufs d'*Ascaris*). Le principe de ces méthodes repose sur la séparation des particules fécales en fonction de leur coefficient de partage au sein d'un mélange diphasique eau/éther. La phase lipophile permet aussi la dissolution des éléments lipidiques fécaux. La suspension aqueuse fécale est initialement filtrée afin d'éliminer les plus gros débris alimentaires (ou laissée à sédimenter une dizaine de secondes avant décantation), puis celle-ci est émulsionnée avec la phase lipophile étherée avant centrifugation. Le culot d'enrichissement ainsi obtenu peut alors être utilisé pour la préparation microscopique (Bailenger 1982). Des kits commercialisés, d'utilisation aisée, fournissent les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une concentration diphasique comme c'est le cas du kit Para-selles/Kop-color (Fumouze®) permettant la réalisation de la méthode de Bailenger (Tableau IV).

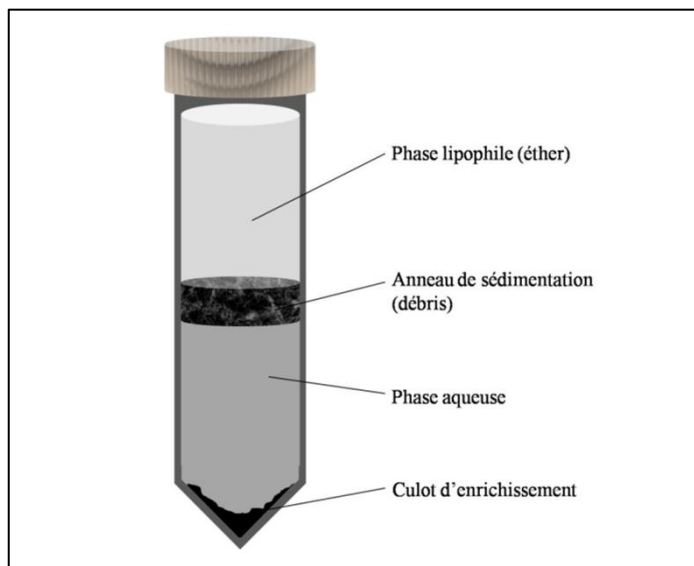


Figure 11: Technique de concentration diphase : tube après centrifugation

Tableau IV : Techniques de concentration diphases (d'après Bailenger 1982)

Concentration diphase				
Méthode	Phase lipophile	Phase hydrophile	Nombre centri.	Notes
Méthode de Bailenger	Ether	Solution tampon acéto-acétique (pH = 5)	x1	Efficace pour presque tous les parasites recherchés (à l'exception des œufs d' <i>Ascaris</i>)
Méthode de Blagg, Schloegel, Mansour et Khalaf (MIF)	Ether	MIF (merthiolate/formol + lugol)	x1	Concentration des kystes non optimale, pas de coloration réalisable secondairement
Méthode de Faust et Ingalls	Ether	Solution (Na) ₂ SO ₄ (10%), triton NE	x1	
Méthode de Loughlin et Spitz	Ether - xylol	Solution NaCl isotonique, dioctyl-succinate de sodium	x1	
Méthode de Ritchie	Ether	Solution NaCl isotonique, formol 10%	x3	Ritchie modifié: reprise du sédiment salin par une solution alcoolique tamponnée (pH = 7) avant émulsion: améliore la conc. des œufs d' <i>Ascaris</i> et de <i>Schistosoma</i>
Méthode de Rivas	Ether	Acide acétique 5%	x1	Faible pouvoir de concentration (notamment pour les kystes de <i>Giardia</i>)
Méthode de Carles et Barthélémy	Ether	Solution saline formolée + solution acide citrique/formol	x2	Faible pouvoir de concentration pour les larves et les œufs (notamment ankylostomides)
Méthodes complémentaires (sur culot d'enrichissement)				
Méthode de Roman	-	Solution (Na) ₂ SO ₄	x2	Double lavage du culot d'enrichissement (élimination des débris celluloseux)

● **Eclaircissement** : Cette méthode, initialement décrite par Kato et Miura (1954), est spécifiquement dédiée à la recherche des œufs d'helminthes. Cette technique simple consiste à déposer un pois de selle (environ 50mg) sur une lame, puis d'étaler ce prélèvement en l'écrasant à l'aide d'une lamelle de cellophane préalablement imprégnée pendant 24 heures d'une solution glycinée (eau – glycérine - vert malachite) (Figure 12). Le montage ainsi réalisé est laissé 20 à 30 minutes à une température de 34 à 40°C. L'action combinée de la chaleur et de la glycérine entraîne alors l'éclaircissement de la matrice fécale, ce qui permet une meilleure visualisation des œufs (Bailenger 1982). La méthode de Kato (et ses variantes) montre cependant une sensibilité inférieure aux méthodes de concentration précédemment décrites comme la flottation (Habtamu *et al.* 2011). Il est toutefois possible d'augmenter la sensibilité de l'examen en réalisant plusieurs lames (Speich *et al.* 2014).

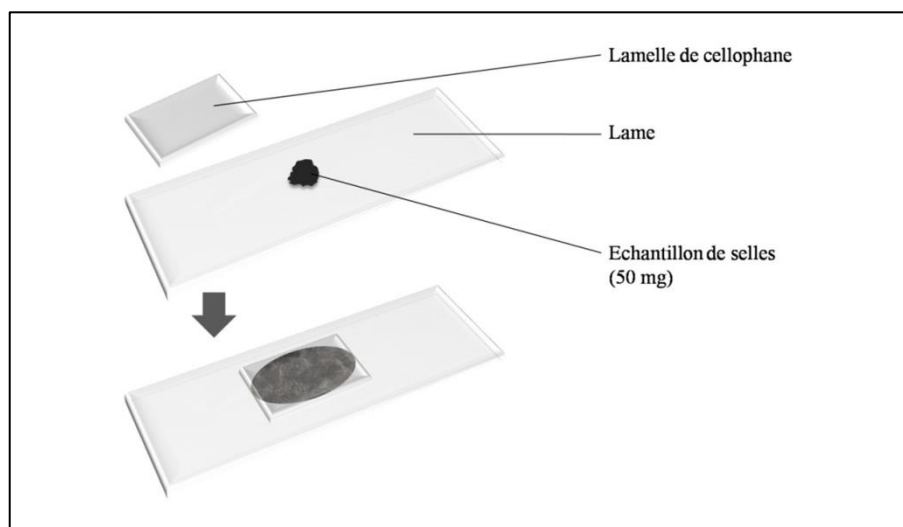


Figure 12 : Réalisation d'un frottis épais par la méthode de Kato et Miura

4.5. Colorations usuelles

L'observation des structures externes et éventuellement de la mobilité des trophozoïtes ne suffit souvent pas à poser un diagnostic d'espèce avec certitude. La coloration permet alors de révéler les structures internes du parasite et ainsi d'améliorer la spécificité de l'examen microscopique. Selon les réactifs et les méthodes employées, plusieurs types de coloration pourront être distingués.

• Colorations extemporanées

Ce type de coloration, réalisée entre lame et lamelle, est simple et rapide à mettre en œuvre. Toutefois les préparations réalisées, sujettes au dessèchement, ne peuvent être conservées sur le long terme. Cette technique consiste à mélanger (à l'aide de l'angle d'une lamelle) une goutte de colorant avec une goutte issue d'une dilution saline de l'échantillon, d'une solution de fixation ou d'un culot d'enrichissement (Bailenger 1982). Cette méthode est couramment employée en parallèle de l'examen direct à l'état frais.

Tableau V : Colorants utilisables pour un montage entre lame et lamelle
(d'après Bailenger 1982)

Coloration entre lame et lamelle		
Méthode	Réactifs	Notes
Coloration à l'iode	Lugol (et dérivés: lugol acétique, lugol + thionine)	Coloration des kystes (cytoplasme jaune, noyaux réfringents, vacuoles à glycogène brunes)
Coloration de Bailenger et Faraggi	Violet cristal, fuchsine, alcool 95°, phénol	Coloration des kystes et trophozoïtes (cytoplasme rouge, noyaux et résidus flagellaires noirs), pas de coloration des noyaux de <i>D. fragilis</i>
MIF (Sapero, Lawless et Strome)	Merthiolate, lugol, formol	Coloration des kystes et trophozoïtes (variable dans le temps: initialement jaunâtre, puis cytoplasme rouge et membrane nucléaire rouge foncé), ne colore pas <i>D. fragilis</i>
Méthode de Velat, Weinstein et Otto	Cristal violet, hématoxyline, tampon acéto-acétique	Préparation du réactif complexe Coloration des trophozoïtes (couleur violette du cytoplasme et des structures nucléaires)

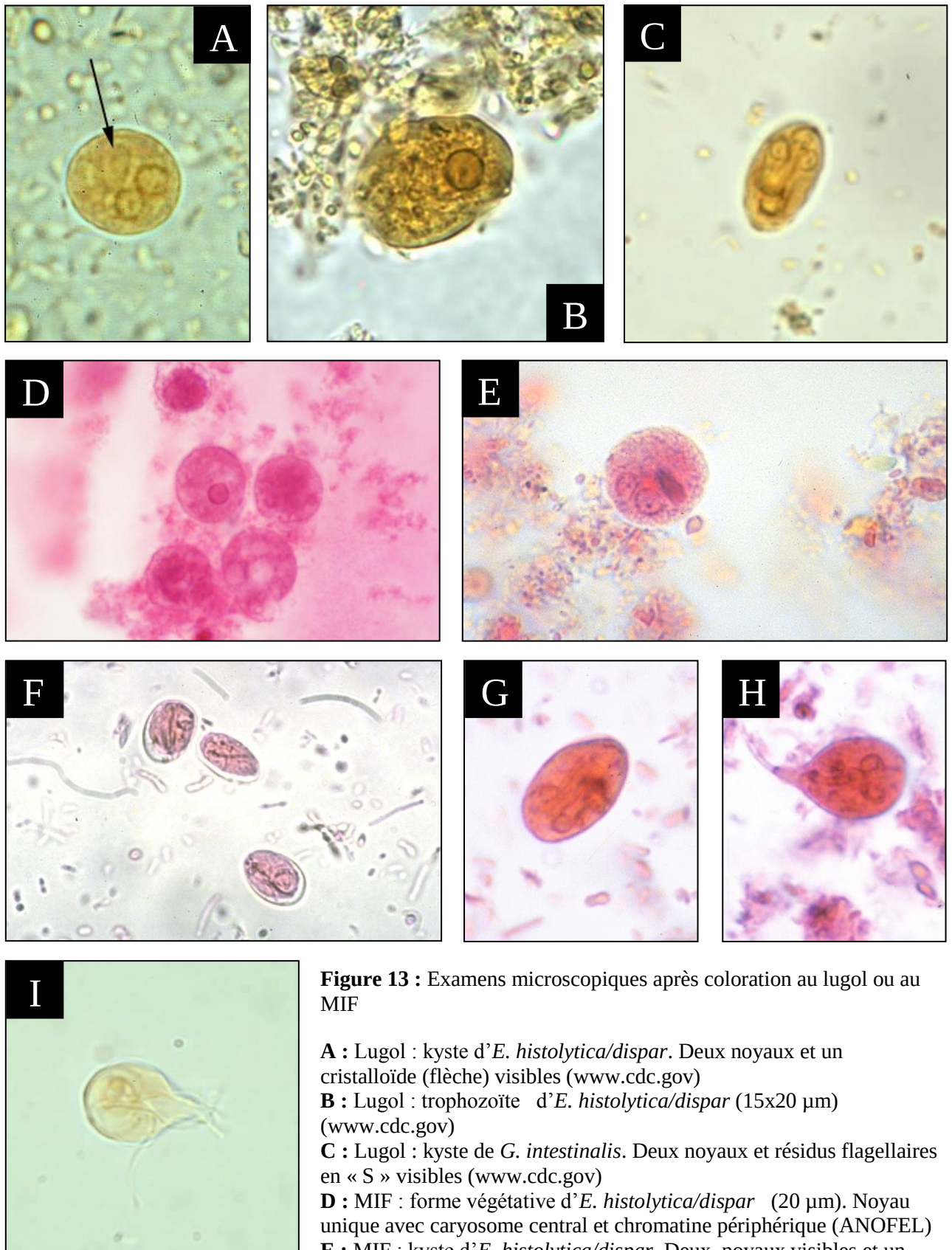


Figure 13 : Examens microscopiques après coloration au lugol ou au MIF

A : Lugol : kyste d'*E. histolytica/dispar*. Deux noyaux et un cristoïde (flèche) visibles (www.cdc.gov)

B : Lugol : trophozoïte d'*E. histolytica/dispar* (15x20 µm) (www.cdc.gov)

C : Lugol : kyste de *G. intestinalis*. Deux noyaux et résidus flagellaires en « S » visibles (www.cdc.gov)

D : MIF : forme végétative d'*E. histolytica/dispar* (20 µm). Noyau unique avec caryosome central et chromatine périphérique (ANOFEL)

E : MIF : kyste d'*E. histolytica/dispar*. Deux noyaux visibles et un corps sidérophile à bouts arrondis (ANOFEL)

F et G : MIF : kystes de *G. intestinalis* (ANOFEL)

H : MIF : trophozoïte de *G. intestinalis* (10x20 µm). Les deux noyaux sont bien visibles (ANOFEL)

I : Lugol : trophozoïte de *G. intestinalis* (www.cdc.gov)

• Colorations permanentes

Beaucoup plus longues et complexes, les colorations permanentes sur frottis fécal permettent toutefois d'obtenir une meilleure visualisation des structures intracellulaires des protozoaires (amibes notamment). Ces colorations utilisent l'hématoxyline ferrique (méthode de Heidenhain et dérivées), le trichrome (Gomori-Weathley) ou le noir chlorazol (Kohn). Le frottis est réalisé à partir d'un échantillon de selle préalablement dilué dans un peu de sérum physiologique, ou du culot d'enrichissement obtenu après une technique de concentration (Bailenger 1982). Le frottis ainsi réalisé, encore humide, est alors fixé par une solution fixatrice de Bouin (figure 14) avant coloration. Les lames préparées à partir d'échantillons déjà fixés (tableau II) sont simplement laissées à sécher à 37°C avant l'étape de coloration : on associe ainsi fréquemment la fixation au SAF avec une coloration à l'hématoxyline ferrique, ou la fixation PVA avec le trichrome (McHardy *et al.* 2014).

L'étape de coloration en elle-même comprend souvent plusieurs bains distincts. Ainsi les colorations à l'hématoxyline ferrique comprennent-elles mordantage, coloration puis différenciation. La coloration au trichrome, en une étape, simplifie les manipulations (tableau VI). L'utilisation du noir chlorazol (méthode de Kohn) présente l'intérêt de combiner simultanément la fixation et la coloration du frottis fécal ; les résultats sont toutefois moins bon qu'avec les techniques précédemment décrites (Bailenger 1982).

Au vu de la multiplicité des méthodes et des protocoles techniques, il semble difficile d'établir une classification des différentes méthodes de colorations permanentes en termes de performances analytiques. L'expérience du technicien et du biologiste est encore une fois fondamentale, et quel que soit la méthode utilisée, c'est surtout l'habitude de la coloration choisie (en terme de réalisation et de lecture) qui permettra d'établir un diagnostic parasitologique précis et sûr.

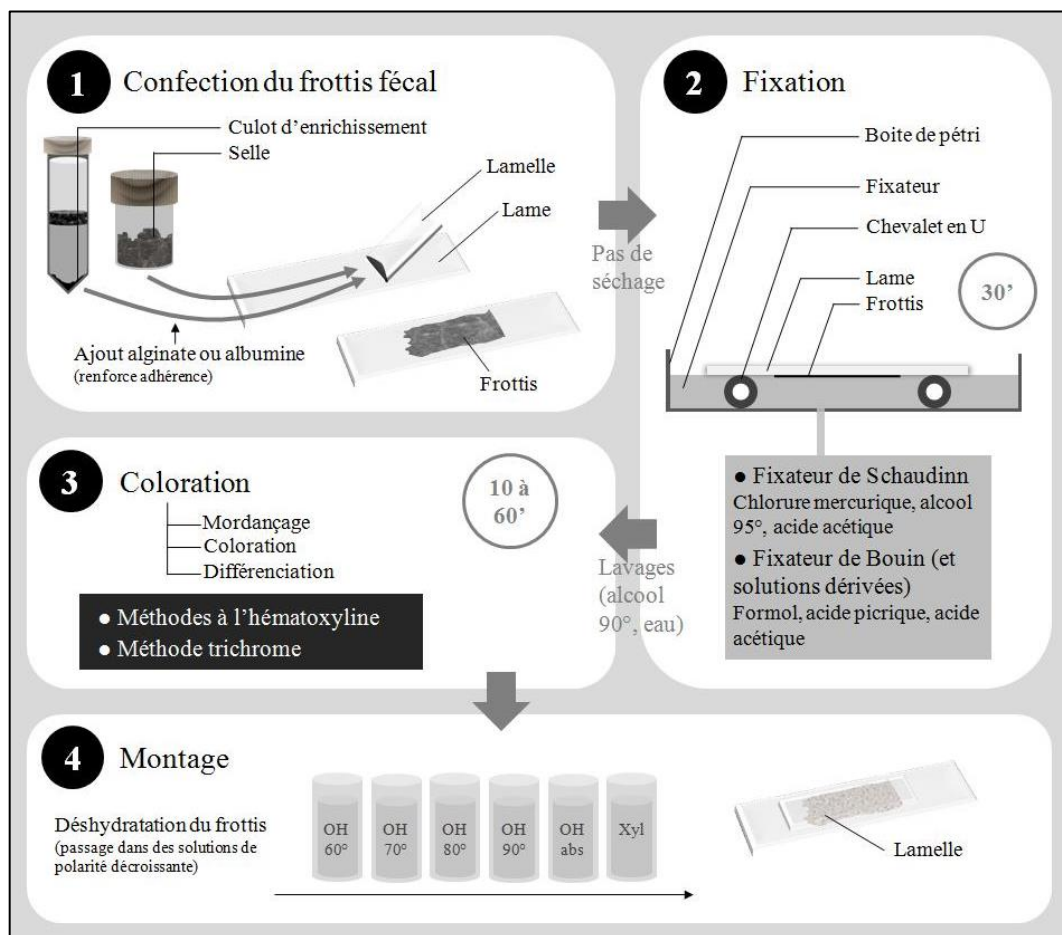


Figure 14 : Mise en œuvre d'une coloration sur frottis humide avec étapes de fixation et coloration différenciées

Tableau VI : Techniques de coloration permanente sur frottis fécal préalablement fixé (d'après Bailenger 1982)

Colorations sur frottis humide (fixation déjà effectuée)					
Méthode		Réactif 1	Réactif 2	Réactif 3	Notes
hématoxyline ferrique	Méthode de Heidenhain	Mordant: alun de fer 3% (37°C, 30')	Colorant: hématoxyline (37°C, 30')	Différenciateur: alun de fer 1,5%	Temps à adapter selon résultat souhaité. Coloration noire précise des noyaux, fond incolore/gris
	Méthode de Thompkins et Miller	Alun de fer 4% (5')	Hématoxyline (1')	Acide phospho-tungstique 2% (≥ 2')	Coloration noire des structures nucléaires, fond bleuté
	Méthode de Mallory	Lugol (30')	Solution Na ₂ S ₂ O ₃ 5% (lavage)	Hématoxyline phospho-tungstique (56°C, 30')	Coloration violette du cytoplasme (clair) et du noyau (foncé)
	Méthode de Dobell	Acide phospho-tungstique 2% (30')	Hématoxyline (15 - 30')	-	Coloration noire des structures nucléaires
trichrome	Méthode de Gomori-Weathley	Colorant trichrome (10' et rinçage ac. Acétique)	-	-	Coloration rouge de la chromatine. Meilleure que l'hématoxyline pour les flagellés

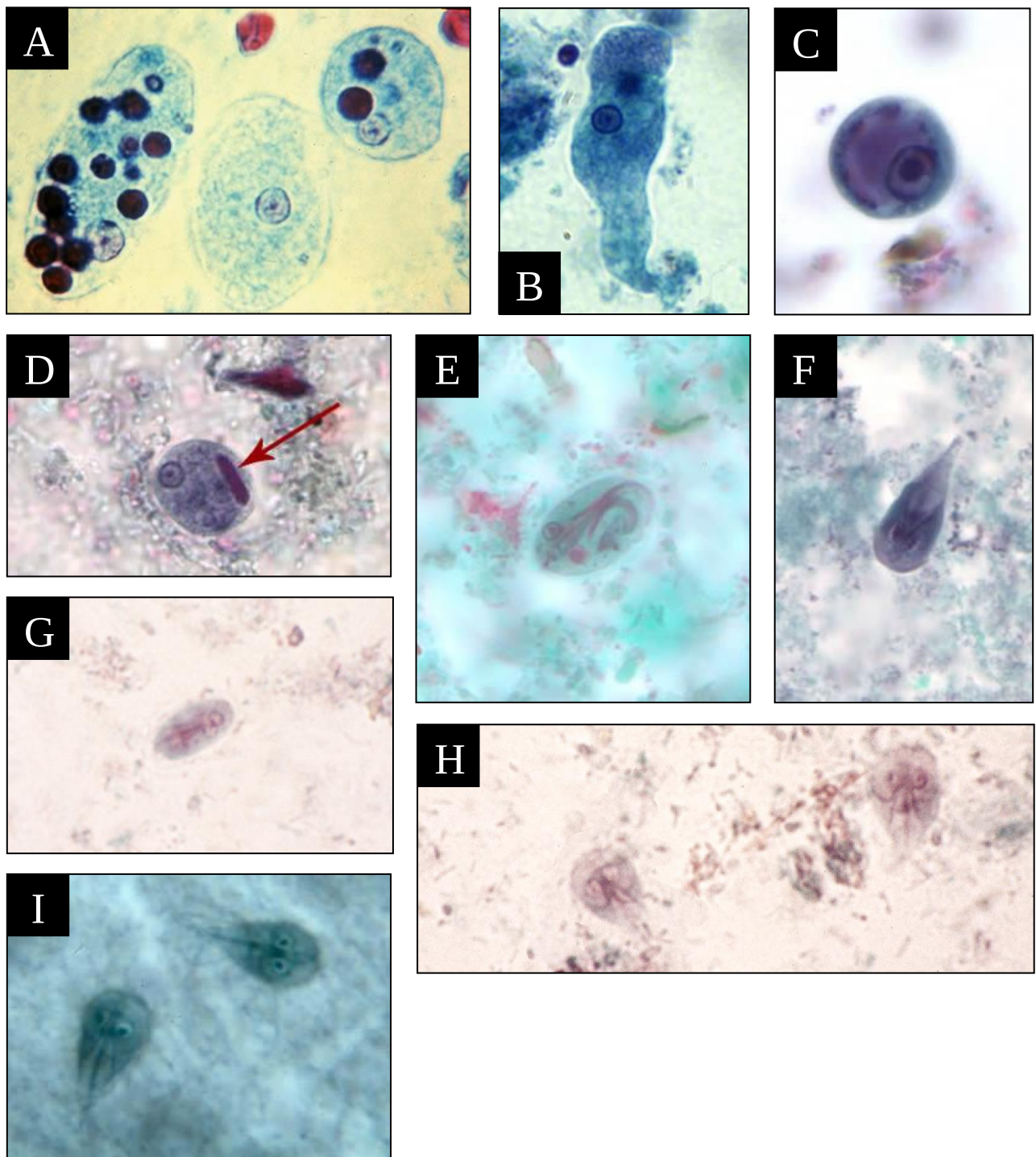


Figure 15 : Examens microscopiques après différentes colorations permanentes

A : Coloration trichrome : formes végétatives d'*E. histolytica* hématophages (hématies = inclusions sombres), structure nucléaire bien visible (www.cdc.gov)

B : Coloration trichrome : forme végétative d'*E. histolytica/ dispar* (www.cdc.gov)

C : Coloration trichrome : kyste immature d'*E. histolytica/ dispar* avec grande vacuole (www.cdc.gov)

D : Coloration trichrome : kyste d'*E. histolytica/dispar* avec cristalloïde (flèche) (www.cdc.gov)

E : Coloration trichrome : kyste de *G. intestinalis* (www.cdc.gov)

F : Coloration trichrome : trophozoïte de *G. intestinalis* (www.cdc.gov)

G : Coloration à l'hématoxyline : kyste de *G. intestinalis*. Résidus flagellaires en « S » visibles (ANOFEL)

H : Coloration à l'hématoxyline : formes végétatives de *G. intestinalis*. Flagelles et structure nucléaire bien visibles (ANOFEL)

I : Coloration au noir chlorazol : trophozoïtes de *G. intestinalis* (www.cdc.gov)

4.6. Techniques spécifiques

a. Détection de *Cryptosporidium* en microscopie

Les oocystes de *Cryptosporidium*, sphériques et mesurant trois à six micromètres de diamètre, sont difficilement mis en évidence dans l'environnement fécal. Leurs structures internes étant difficilement visibles, les oocystes ne se différencient pas des levures naturellement présentes dans le tube digestif. L'examen à l'état frais ou les colorations permanentes adaptées aux protozoaires, comme la coloration trichrome, ne permettent donc pas la détection spécifique des oocystes (Garcia *et al.* 1983).

- **Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée :** Initialement développée pour le diagnostic des mycobactérioses, la coloration de Ziehl-Neelsen utilise le caractère acido-résistant de la paroi de l'oocyste de *Cryptosporidium* pour en assurer une coloration spécifique. Le Ziehl-Neelsen modifié (ZNM) est habituellement considéré comme le « *gold standard* » pour la coloration des cryptosporidies (Garcia *et al.* 1983)(Rigo and Franco 2002)(Potters and Van Esbroeck 2010).

Un frottis fécal, réalisé à partir d'une simple dilution de selles ou mieux, d'un culot d'enrichissement, est fixé au méthanol avant d'être coloré par la fuchsine. Une différenciation est effectuée (acide nitrique, sulfurique ou mélange acide-alcool) avant une étape de contre-coloration au bleu de méthylène ou au vert malachite. Une coloration bien effectuée laisse apparaître les oocystes colorés en rose sur un fond bleu-vert (Potters and Van Esbroeck 2010), ce qui permet leur repérage aisé. La lecture de ce type de préparation nécessite toutefois une bonne expérience car, selon la qualité de la coloration et/ou de la différenciation, la distinction des oocystes avec les levures peut encore être délicate (Potters and Van Esbroeck 2010). Le temps de réalisation du ZNM est conséquent (30 à 45 minutes), mais la coloration permanente obtenue permet la conservation des préparations microscopiques.

La sensibilité de la coloration de ZNM varie de 75% à 100%, pour une spécificité de 100% (Khurana *et al.* 2012)(Chalmers *et al.* 2011)(Van den Bossche *et al.* 2015)(Garcia *et al.* 2000)(Johnston *et al.* 2003). Notons que les oocystes de *Cyclospora cayetanensis*, plus volumineux (environ 10µm), se colorent difficilement par le ZNM.

La coloration de Kinyoun modifiée, également basée sur l'acido-résistance, est aussi utilisée pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium*.

- **Coloration négative de Heine :** Cette technique simple, rapide et économique, permet la détection des coccidies intestinales dont *Cryptosporidium* (Potters and Van Esbroeck 2010)(Khanna *et al.* 2014). Elle consiste à mélanger un échantillon de la selle (ou d'un culot d'enrichissement) avec de la fuchsine, puis à réaliser un frottis qui sera séché à l'air libre. Les oocystes, isolés par leur épaisse paroi, apparaissent alors non colorés, réfringents, sur un fond rouge. L'absence de fixation et de différenciation permet de mieux respecter les dimensions véritables de l'oocyste (Khanna *et al.* 2014). La lecture microscopique doit s'effectuer dans les 15-30 minutes. Un microscope à contraste de phase est parfois préconisé, mais son utilisation ne semble pas indispensable (Potters and Van Esbroeck 2010). Si la coloration négative demande deux fois moins de temps de préparation que le ZNM, la lame ne peut être conservée. Dans une étude ayant pour référence une technique d'immunofluorescence, la coloration négative de Heine atteint une sensibilité de 76,7% pour une spécificité de 90,7% (Chartier *et al.* 2013). La sensibilité varie proportionnellement avec la charge parasitaire et avec le nombre de lames réalisée (mais ce constat est valable pour tous les types d'examens microscopiques) (Chartier *et al.* 2013), et semble équivalente à celle des colorations permanentes décrites précédemment (Amato Neto *et al.* 1996). En cas de doute, la réalisation d'un ZNM est toutefois préconisée (Potters and Van Esbroeck 2010).

- **Techniques de fluorescence :** Si la mise en œuvre de ce type de technologie nécessite l'acquisition d'un microscope adapté, la sensibilité de ces techniques est supérieure à celles des colorations optiques usuelles. La fixation spécifique du réactif fluorescent sur la paroi des oocystes rend en effet leur détection particulièrement aisée. Le temps de lecture s'en trouve de fait significativement raccourci : environ deux minutes, pour un temps de lecture de trois à six minutes avec une lame colorée au ZNM (Alles *et al.* 1995)(Tortora *et al.* 1992).

La coloration à l'**auramine phénol** (AP) permet l'obtention d'une sensibilité variant entre 92,1% et 100% (Chalmers *et al.* 2011)(Khurana *et al.* 2012). La spécificité est également très bonne (99,6%) (Khurana *et al.* 2012). Les techniques d'**immunofluorescence directe** utilisent un anticorps marqué reconnaissant spécifiquement des épitopes présents sur la paroi de l'oocyste. Les performances analytiques obtenues sont similaires à l'AP. La sensibilité analytique obtenue avec le kit DFA Merifluor (Meridian®) est de 93%, contre 54,8% pour la coloration de Kinyoun modifiée (Alles *et al.* 1995).

NB : L'immunofluorescence directe peut également être adaptée à la détection d'autres parasites. Ainsi le kit DFA Merifluor (Meridian®) permet aussi la visualisation des kystes de *G. intestinalis*, avec une sensibilité de 99,2% contre 66,4% pour la coloration au noir chlorazol (Alles *et al.* 1995). Dans une autre étude, le kit DFA Merifluor présentait une sensibilité de 93% et une spécificité de 99% pour la détection de *G. intestinalis*, et une sensibilité/spécificité de 88% et 100% respectivement pour la détection de *Cryptosporidium* (Weitzel *et al.* 2006).

- **Autres techniques :** Diverses méthodes existent pour la détection microscopique de *Cryptosporidium*, mais leurs performances ne permettent pas de s'affranchir de la coloration de ZNM. Ainsi les colorations utilisant le trichrome (AFT : *Acid Fast Trichrome*), qui permettent la mise en évidence simultanée des coccidies et des microsporidies, n'offrent qu'une sensibilité de 42,1% par rapport au ZNM (Rigo and Franco 2002)(Ignatius *et al.* 1997).

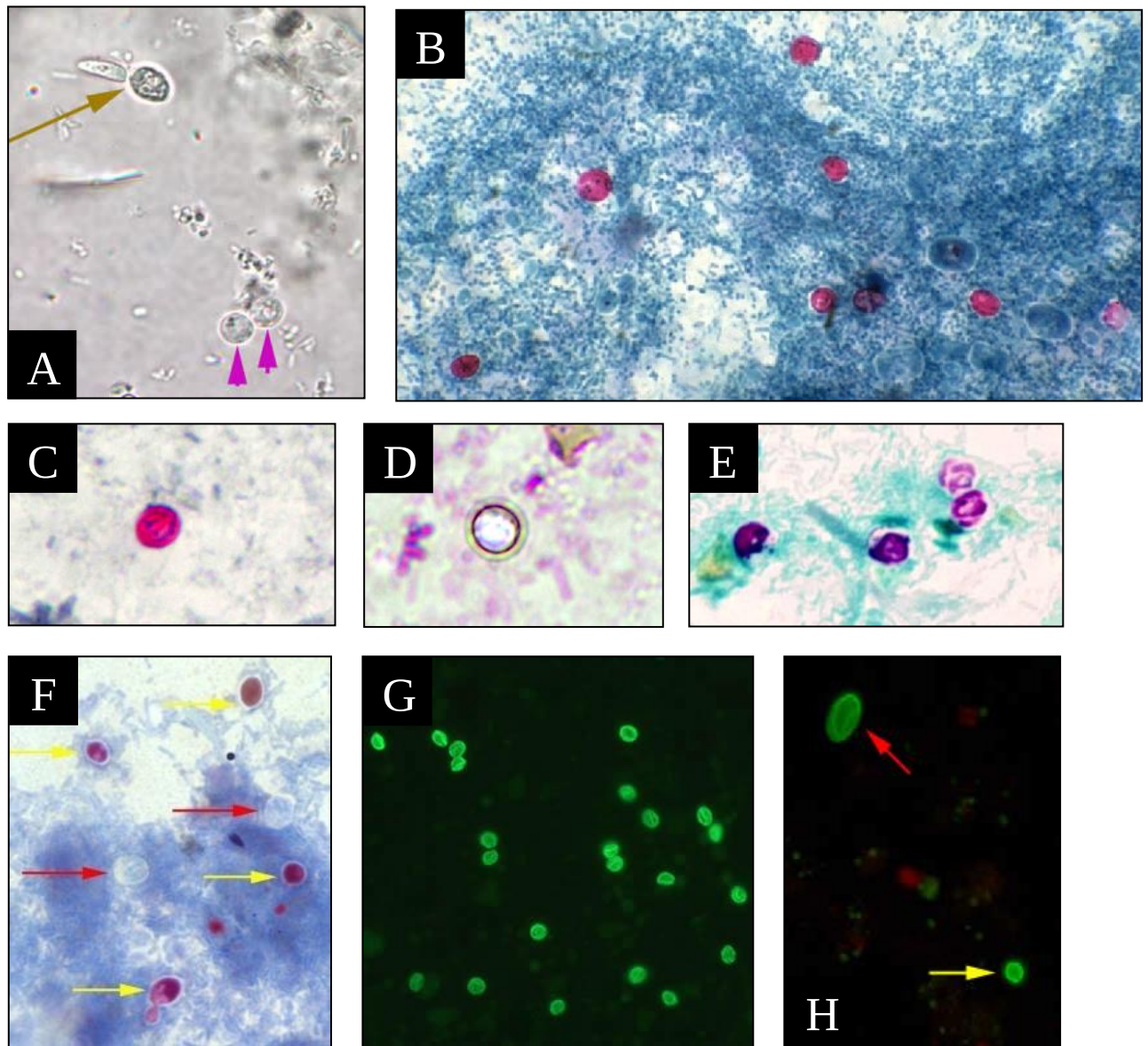


Figure 16 : Examens microscopiques avec techniques adaptées à la détection de *Cryptosporidium* spp.

A : Etat frais : oocystes de *Cryptosporidium* (flèches roses) difficilement différenciables des levures (flèche marron) (www.cdc.gov)

B : Ziehl-Neelsen modifié : oocystes de *Cryptosporidium* colorés en rose sur fond bleu (spores de *Geotrichum* non colorées à droite) (ANOFEL)

C : Ziehl-Neelsen modifié : oocyste de *Cryptosporidium* (Potters et al. *The Open Parasitology Journal* 2010)

D : Coloration de Heine : oocyste réfringent de *Cryptosporidium* (Potters et al. *The Open Parasitology Journal* 2010)

E : Ziehl-Neelsen modifié : la coloration met en évidence les sporozoïtes dans les deux oocystes de droite (www.cdc.gov)

F : Ziehl-Neelsen modifié : oocystes non colorés (flèches rouges), intégration de la fuchsine dans des levures (flèches jaunes) (www.cdc.gov)

G : Immunofluorescence directe : oocystes de *Cryptosporidium* (www.cdc.gov)

H : Immunofluorescence directe : oocystes de *Cryptosporidium* (flèches jaunes) et kyste de *Giardia* (flèche rouge) (www.cdc.gov)

b. Technique de Baermann

Il est possible de mettre à profit l'hygrotropisme et le thermotropisme de certains parasites pour effectuer une concentration biologique. La technique de Baermann permet ainsi l'extraction des larves de *Strongyloides stercoralis* (et éventuellement d'ankylostomidés) dans une pipette remplie d'eau située sous un entonnoir dans lequel a été placé un échantillon de selles (figure 17). Après deux à trois heures de migration, l'eau est alors analysée. L'observation se fait à la loupe binoculaire ou entre lame et lamelle, l'eau récupérée pouvant être centrifugée à basse vitesse afin de concentrer encore les larves (Bailenger 1982). La méthode de Baermann permet d'obtenir, selon la méthode de référence utilisée, une sensibilité variant de 28 à 84% (Buonfrate *et al.* 2015).



Figure 17 : Montage effectué pour la méthode de Baermann

La culture sur gélose permet également de mettre en évidence les larves vivantes de nématodes (*Strongyloides*, *Ancylostoma*). Utilisant également l'hygrotropisme et le cycle long sexué de ces helminthes, la **méthode d'Arakaki** consiste à placer un fragment de selle au centre d'une gélose (agar). La boîte contenant la gélose est alors disposée dans une boîte de dimension supérieure contenant de l'eau (figure 18). L'observation régulière de la gélose, maintenue à 26°C, permet de mettre en évidence le passage des larves sur le milieu de culture à la loupe binoculaire. Les nématodes peuvent également être mis en évidence après centrifugation d'une solution de rinçage préalablement passée sur la gélose. La sensibilité de la culture atteint 87,5 à 96,4%. Celle-ci varie notablement selon le nombre de jours d'observations et le nombre d'examens réalisés. Une observation unique et une observation sur 3 jours donnent respectivement une sensibilité de 70,3% et 90,2% (Hirata *et al.* 2007), donc supérieure à la technique de Baermann.

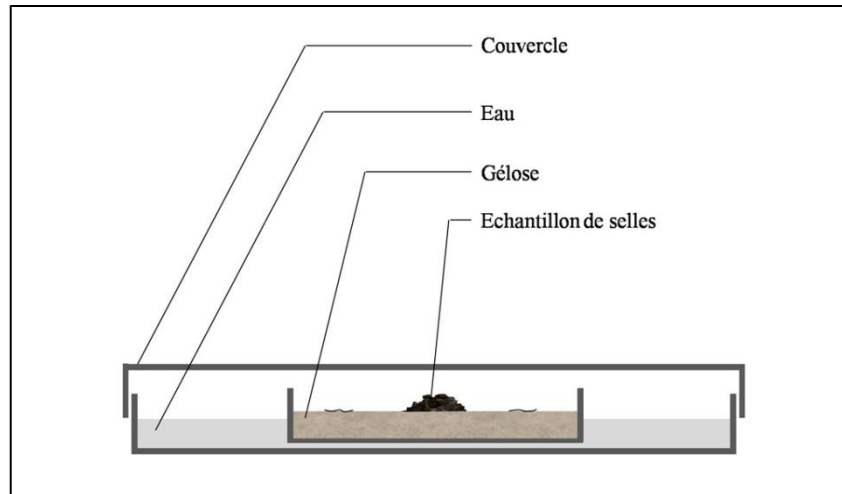


Figure 18 : Montage de la méthode d'Arakaki

c. Techniques adaptées à la détection des microsporidies

A l'instar des Cryptosporidies, la détection des microsporidies (*Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bienersi*) nécessite l'application de techniques microscopiques spécifiques. Des méthodes basées sur la fluorescence directe (Uvitex 2B de van Gool), l'immunofluorescence indirecte, ou des colorations spécifiques (trichrome de Weber) ont ainsi été développées. A l'heure actuelle, les techniques de biologie moléculaire semblent être une alternative intéressante aux méthodes microscopiques nécessitant un œil fortement expérimenté. Toutefois, une seule PCR est actuellement commercialisée pour la détection de ces pathogènes (Bio-Evolution®).

L'examen microscopique de selles s'appuie sur de multiples techniques de concentration et de coloration. A titre d'exemple, au CHU de Nantes, l'EPS s'appuie sur les techniques suivantes :

- Solution de fixation au M.I.F (Para-Selles Kop-Color, Fumouze®)
- Examen direct entre lame et lamelle (dilution saline et coloration au lugol)
- Examen microscopique après concentration diphasique de Bailenger (Para-Selles Kop-Color, Fumouze®)
- Examen microscopique après M.I.F concentration de Blagg et coll. (Para-Selles Kop-Color, Fumouze®)

Selon le contexte clinique et/ou épidémiologique :

- Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée sur frottis fécal (culot de concentration du Bailenger)
- Cultures d'helminthes par la méthode d'Arakaki

5. Détection des copro-antigènes

Largement employée dans les tests de biologie médicale, la liaison antigène-anticorps est mise à profit dans de nombreux kits commercialisés destinés à la détection de parasites intestinaux. Reposant sur le principe de l'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) ou de l'immunochromatographie, différents tests permettent ainsi la détection de *G. intestinalis*, *E. histolytica* et/ou *Cryptosporidium*. Ces kits, s'ils ne peuvent remplacer l'examen microscopique, permettent toutefois d'apporter une aide complémentaire pouvant s'avérer précieuse en cas de doute à l'examen microscopique. Par ailleurs, l'EPS ne permettant pas (dans la majorité des cas) de distinguer *E. histolytica* des amibes non pathogènes *E. dispar* et *E. moshkovskii*, la détection de l'adhésine spécifique d'*E. histolytica* est un véritable atout.

Notons que la détection d'antigènes parasitaires peut également être effectuée dans d'autres milieux biologiques. Ainsi, le test immunochromatographique urine-CCA (*Circulating Cathodic Antigen*, Rapid Medical Diagnostics®) permet la détection des antigènes de *Schistosoma* spp. dans les urines (Becker *et al.* 2015).

5.1. Techniques ELISA

Le principe général du test ELISA est présenté à la figure 19. Les kits actuellement commercialisés permettent la détection de *G. intestinalis*, *E. histolytica* (ou *E. histolytica/dispar*) ou *Cryptosporidium* spp. (tableau VII). Certains kits, comme Techlab® *Giardia/Cryptosporidium* Chek ou R-Biopharm® *Ridascreen Giardia/Cryptosporidium*, fournissent les réactifs adaptés à la détection des deux parasites éponymes. Le kit Techlab® Tri-Combo Parasite Screen permet quant à lui la détection simultanée des trois pathogènes. Le test Savyon Diagnostics® CoproELISA *Blastocystis* détecte spécifiquement *Blastocystis hominis*, mais il s'agit d'une exception.

Les tests ELISA commercialisés se présentent sous la forme de plaques 96 puits (12 x 8). Ce type de présentation nécessite la réunion d'un nombre suffisant d'échantillons pour pouvoir effectuer le test sans gaspillage de réactifs. Le délai nécessaire à la constitution d'une série peut donc retarder le diagnostic parasitologique. Dans certains cas les plaques ELISA se présentent sous la forme de barrettes séparées et il est alors possible d'ajuster grossièrement le nombre de puits au nombre d'échantillons et ainsi de limiter la taille des séries et le délai de réalisation du test. Les techniques ELISA nécessitent des manipulations relativement conséquentes. L'utilisation de certains automates peut faciliter certaines étapes (notamment les étapes de lavages : voir figure 19), mais leur usage doit être justifié par un échantillonnage conséquent.

La technique ELISA nécessitant diverses phases d'incubation (figure 19), le temps de réalisation d'une technique est de 60 à 90 minutes. La lecture finale des puits nécessite une lecture d'absorbance, et le laboratoire doit donc être doté d'un spectrophotomètre UV-visible.

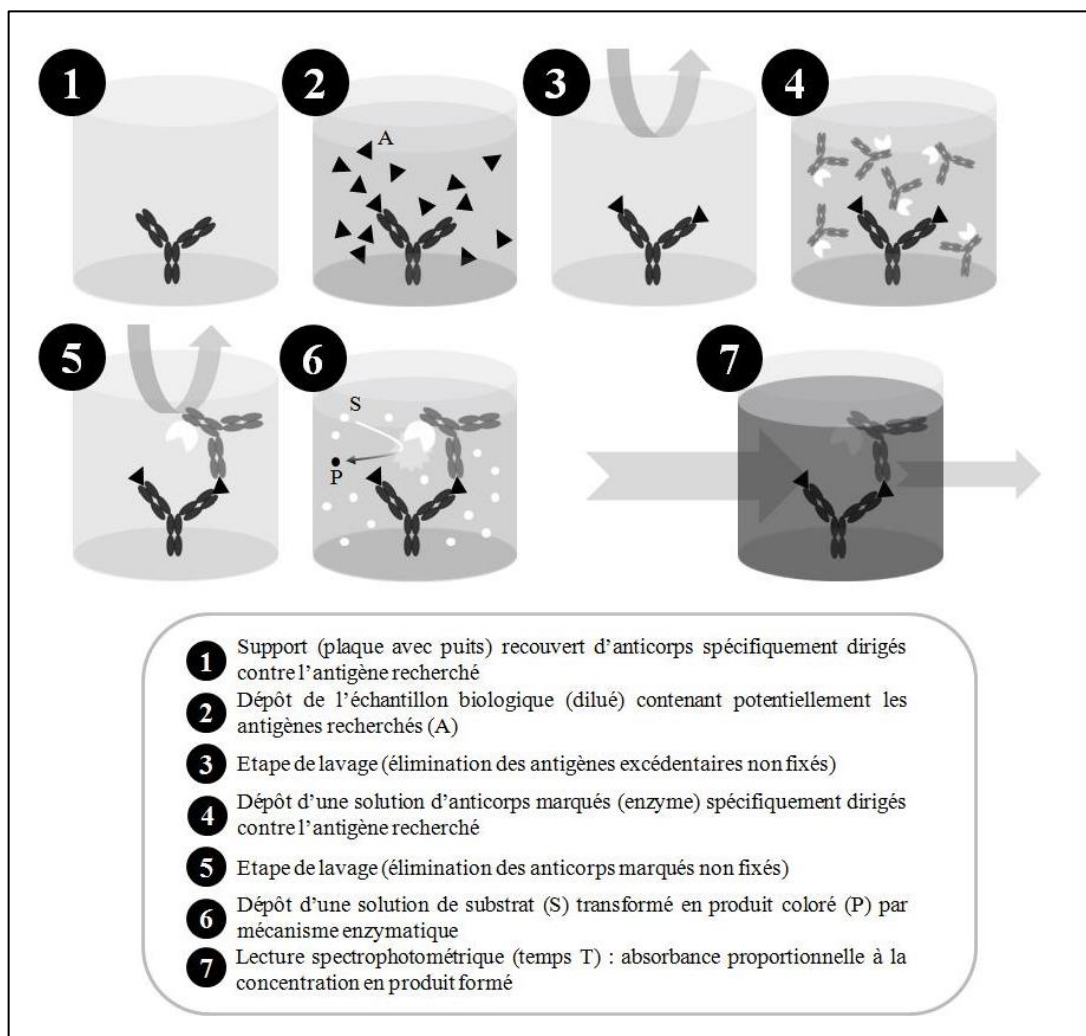


Figure 19 : Principe du test ELISA

Tableau VII: Tests commercialisés pour la détection des copro-antigènes parasitaires à partir d'échantillons de selles par méthode ELISA.

Fabriquant	Nom du test	Parasite(s) ciblé(s)
Techlab®	<i>E. histolytica</i> II	<i>E. histolytica</i>
	<i>Giardia</i> II	<i>G. intestinalis</i>
	<i>Cryptosporidium</i> II	<i>Cryptosporidium</i> spp.
	Tri Combo parasite Screen (détection simultanée)	<i>G. intestinalis</i> <i>E. histolytica</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.
	<i>Giardia</i> /Crypto Chek	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.
Remel®	ProSpecT <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>
	ProSpecT <i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
	ProSpecT <i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
R-Biopharm®	RidaScreen <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>
	RidaScreen <i>Cryptosporidium</i>	<i>C. parvum</i> / <i>C. hominis</i>
	RidaScreen <i>Giardia</i> /Cryptosporidium	<i>G. intestinalis</i> <i>C. parvum</i> / <i>C. hominis</i>
	RidaScreen <i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>
Cellabs®	<i>Entamoeba</i> CELISA Path	<i>E. histolytica</i>
	<i>Giardia</i> CELISA	<i>G. intestinalis</i>
Savyon Diagnostics®	CoproELISA <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>
	CoproELISA <i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
	CoproELISA <i>Giardia</i> /Cryptosporidium	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.
	CoproELISA <i>Blastocystis</i>	<i>B. hominis</i>
	CoproELISA <i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>
apDia®	apDia <i>Giardia lamblia</i> ELISA	<i>G. intestinalis</i>

5.2. Techniques immuno-chromatographiques

Les tests basés sur le principe de l'immuno-chromatographie (figure 20) sont aujourd'hui largement démocratisés dans la plupart des disciplines de la biologie médicale. Leur simplicité d'utilisation permet même une utilisation directe par les patients (détection de la β -hCG urinaire, etc.). A l'instar des kits ELISA, les tests immuno-chromatographiques (ICT : *Immuno-Chromatographic Test*) destinés au diagnostic parasitologique des selles sont orientés sur la détection des trois protozoaires les plus fréquemment rencontrés : *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* et *E. histolytica* (voire *E. histolytica/dispar*). Les tests actuellement commercialisés (tableau VIII) permettent la détection de un, deux, voire des trois pathogènes précédemment cités de façon simultanée. Ainsi le test Biosite® Triage Micro Parasite Panel détecte sur la même bande chromatographique les antigènes pariétaux de *G. intestinalis* et *Cryptosporidium* ainsi que l'adhésine spécifique d'*E. histolytica* (figure 21).

Les tests immuno-chromatographiques sont d'une mise en œuvre particulièrement aisée, la seule manipulation consistant le plus souvent à une simple dilution de la selle avant le dépôt sur la bande chromatographique. La présentation des tests sous forme de cassettes, avec une zone de dépôt et une zone de lecture, simplifie d'autant plus l'opération (figures 21 et 22). La lecture des résultats est effectuée rapidement, quelques minutes après l'initiation de la migration. L'interprétation, basée sur l'apparition de bandes colorées, est généralement aisée et se fait à l'œil nu. Au total, les tests immuno-chromatographiques nécessitent très peu de manipulations et un temps technique restreint. L'utilisation de ce type de méthode ne requiert en outre aucun appareillage particulier au sein du laboratoire. Ces caractéristiques en font un outil très intéressant pour une pratique « de terrain », mais présente aussi nombre de qualités appréciables pour une utilisation au laboratoire.

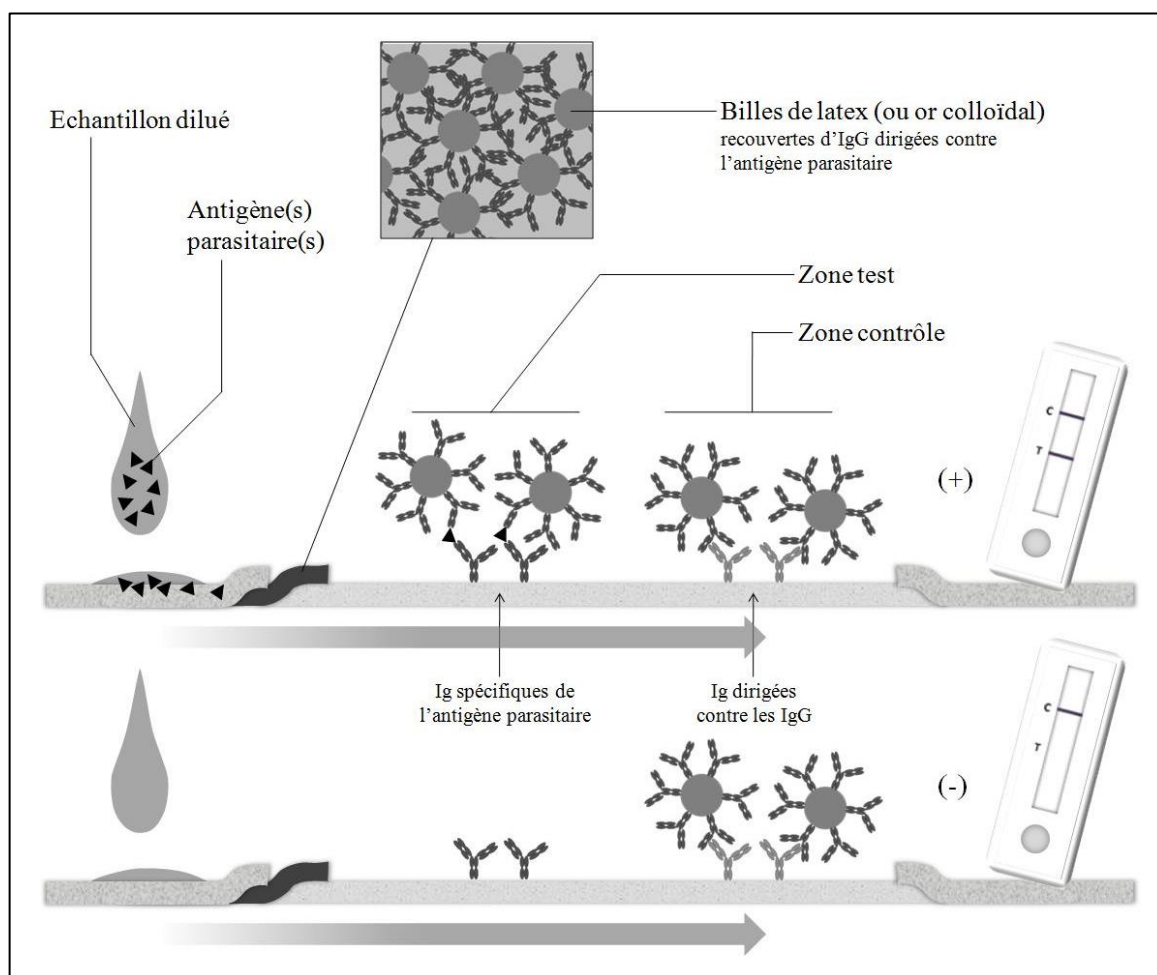


Figure 20 : Principe d'un test immunochromatographique

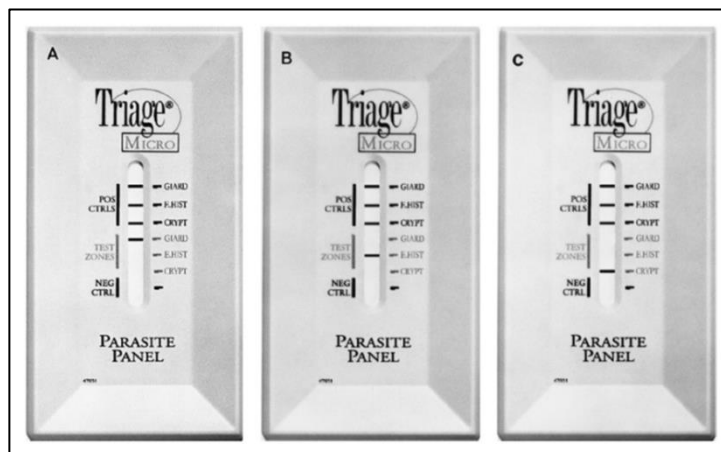
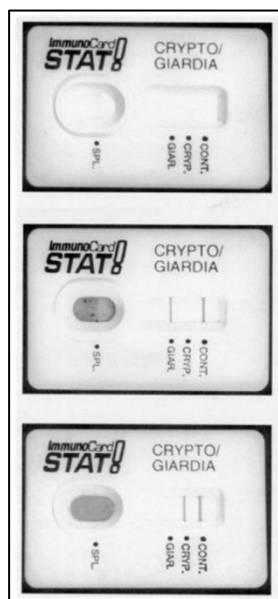


Figure 21 : Biosite® Triage Micro Parasite Panel : test positif pour *G. intestinalis* (A), *E. histolytica* (B) et *Cryptosporidium* spp. (C) (Swierczewski et al. 2012)

Figure 22 : Meridian® Immunocard STAT! : test positif pour *G. intestinalis* (milieu) et *Cryptosporidium* spp. (bas) (Van den Bossche et al. 2015)

Tableau VIII : Tests commercialisés pour la détection des copro-antigènes parasitaires à partir d'échantillons de selles par méthode immuno-chromatographique

Fabriqueur	Nom du test	Parasite(s) ciblé(s)
Techlab®	<i>Giardia/Cryptosporidium</i> Quik Chek	<i>G. intestinalis</i>
		<i>Cryptosporidium</i> spp.
	<i>E. histolytica</i> Quik Chek	<i>E. histolytica</i>
Meridian Bioscience®	Immunocard STAT!	<i>G. intestinalis</i>
		<i>Cryptosporidium</i> spp.
	Immunocard STAT! CGE	<i>G. intestinalis</i> <i>C. parvum</i> <i>E. histolytica</i>
Coris Bioconcept®	<i>Giardia</i> -strip	<i>G. intestinalis</i>
	<i>Crypto</i> -strip	<i>Cryptosporidium</i> spp.
	<i>Crypto/Giardia</i> Duo-strip	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.
	<i>Giardia</i> K-set	<i>G. intestinalis</i>
Biosite Diagnostics®	Triage Parasite Panel	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>E. histolytica/E. dispar</i>
R-Biopharm®	RidaQuick <i>Crypto/Giardia</i> Combi	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.
Savyon Diagnostics®	CoproStrip <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>
	CoproStrip <i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
	CoproStrip <i>Giardia/Cryptosporidium</i>	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.
Remel®	Xpect <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>
	Xpect <i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
	Xpect <i>Giardia/Crypto</i>	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.
Cypress Diagnostics®	<i>Giardia</i> kit	<i>G. intestinalis</i>
	<i>Crypto</i> kit	<i>Cryptosporidium</i> spp.
BD Diagnostics®	ColorPac <i>Giardia/Crypto</i>	<i>G. intestinalis</i>
	Rapid Assay	<i>Cryptosporidium</i> spp.

5.3. Performances analytiques : revue de la littérature

Si l'utilisation des tests de détection antigénique est relativement aisée et ne nécessite pas une expérience technique élevée, leur mise en œuvre, du fait du coût engendré, doit cependant être justifiée par de bonnes performances analytiques.

De nombreuses études ont ainsi cherché à évaluer les différents kits commerciaux (ELISA ou immuno-chromatographiques) disponibles en coprologie parasitaire (tableau XI en fin de sous-chapitre, pages 66 à 70). Les études présentent une grande hétérogénéité, tant du point de vue de la méthode, des effectifs disponibles, que des résultats obtenus. Un certain nombre d'études ne réunissent qu'un nombre limité d'échantillons positifs (Van den Bossche *et al.* 2015)(Swierczewski *et al.* 2012)(Vidal and Catapani 2005)(Sadaka *et al.* 2015)(Pillai and Kain 1999). Ceci est particulièrement vrai pour *Cryptosporidium* et *E. histolytica*. Dans ce contexte, les résultats présentés par les auteurs sont alors à interpréter avec précaution.

Il convient donc, afin d'appréhender chaque étude, de prendre en compte : i) la (ou les) méthode(s) de référence utilisée(s) ; ii) les espèces parasitaires recherchées par le kit testé ; iii) le nombre d'échantillons étudiés. Les résultats de sensibilité et de spécificité, classés par kit et par pathogène, sont présentés à travers les figures 23 à 26.

Selon les études considérées, il existe une forte hétérogénéité dans les valeurs de sensibilité. Les méthodes utilisées en référence varient entre chaque article (techniques microscopiques & tests antigéniques & PCR). Nous ne nous pencherons pas en détail sur les résultats de chaque publication (voir tableau XI). Toutefois, nous pouvons affirmer que de nombreuses études mettent en évidence des sensibilités analytiques modestes (entre 60 et 90%), et ce quel que soit le kit testé, le parasite concerné et/ou la méthode de référence utilisée.

Afin de simplifier notre propos, les sensibilités moyennes ont été calculées pour chaque pathogène et pour chaque kit commercialisé ayant fait l'objet d'une évaluation dans au moins trois études distinctes. Le *gold standard* utilisé repose généralement sur la microscopie ou, dans le cas d'*E. histolytica*, sur une PCR spécifique.

a. *Giardia intestinalis*

A l'exception de deux études (Vidal and Catapani 2005)(Pillai and Kain 1999), les effectifs d'échantillons positifs à *G. intestinalis* sont généralement satisfaisants dans les panels étudiés, le nombre de selles positives atteignant ainsi fréquemment 20 à 30 échantillons voire beaucoup plus (Garcia *et al.* 2000)(Garcia *et al.* 2003)(Nguyen *et al.* 2012)(Garcia and Shimizu 1997)(Strand *et al.* 2008).

Les méthodes de références utilisées reposent essentiellement sur la microscopie optique, mais aussi sur l'immunofluorescence indirecte (Weitzel *et al.* 2006)(Garcia *et al.* 2003)(Garcia and Garcia 2006)(Garcia and Shimizu 1997)(Johnston *et al.* 2003). Notons que l'utilisation d'une technique de détection antigénique comme méthode de référence pour l'évaluation d'un autre kit employant une technologie similaire semble peu pertinente (Minak *et al.* 2012)(Christy *et al.* 2012)(Oster *et al.* 2006). L'association de plusieurs techniques est une option intéressante afin de définir le panel de référence. Ainsi, de nombreuses études associent la microscopie avec une autre méthode de détection comme une PCR ciblée (Van den Bossche *et al.* 2015)(Stark *et al.* 2008)(Elsafi *et al.* 2013)(Nguyen *et al.* 2012)(L.Alexander *et al.* 2013).

Malgré les différences méthodologiques, le nombre d'études prises en compte dans notre revue permet toutefois de mettre en évidence de véritables tendances concernant les performances analytiques. Nous présenterons les sensibilités et les spécificités calculées de sept kits commerciaux, ayant pour chacun d'entre eux fait l'objet d'une évaluation dans au moins trois études distinctes. Notons que les performances d'autres tests antigéniques, comme Remel® Xpect, apDia® *G. lamblia* ELISA, ou Cellabs® *Giardia* CELISA, qui ne font l'objet que d'une seule étude d'évaluation, ne seront pas présentées dans les figures 23 et 24. Les résultats des études correspondantes sont toutefois disponibles dans le tableau XI. Notons que ces derniers semblent en accord avec la tendance établie.

La **sensibilité** de la détection de *G. intestinalis* varie entre 61% et 100% (**85%** en moyenne) pour Meridian® ImmunocardSTAT! (8 études), de 44% à 96% (**64%** en moyenne) pour Coris® Strip (5 études), de 80% à 97% (**88%** en moyenne) pour R-Biopharm® RidaQuick (4 études), de 93% à 100% (**96%** en moyenne) pour Techlab® Quik Chek (4 études), de 83% à 100% (**94%** en moyenne) pour Biosite® Triage Micro Parasite Panel (3 études), de 71% à 100% (**89%** en moyenne) pour Remel® Prospect (5 études) et de 82% à 93% (**88%** en moyenne) avec R-Biopharm® Ridascreen (3 études). Les résultats sont compilés sur la figure 23.

Au vu de ces données, les tests antigéniques Meridian® ImmunocardSTAT!, Coris® Strip, R-Biopharm® RidaQuick, Remel® Prospect, R-Biopharm® Ridascreen, semblent présenter des sensibilités inférieures (64% à 89%) pour la détection de *G. intestinalis*, aux tests Techlab® Quik Chek et Biosite® Triage Micro Parasite Panel (96% et 94% respectivement).

La **spécificité** de la détection de *G. intestinalis* varie entre 94% et 100% (**98%** en moyenne) pour Meridian® ImmunocardSTAT! (8 études), de 96% à 100% (**99%** en moyenne) pour Coris® Strip (5 études), de 99% à 100% (**100%** en moyenne) pour R-Biopharm® RidaQuick (4 études), de 93% à 100% (**98%** en moyenne) pour Techlab® Quik Chek (4 études), de 91% à 100% (**96%** en moyenne) pour Biosite® Triage Micro Parasite Panel (3 études), de 95% à 100% (**97%** en moyenne) pour Remel® Prospect (5 études) et de 97% à 99% (**98%** en moyenne) avec R-Biopharm® Ridascreen (3 études). Les résultats sont compilés sur la figure 24.

L'ensemble des tests étudiés affichent de bonnes spécificités analytiques (96% à 100%), qui peuvent justifier une utilisation de ces techniques en seconde intention.

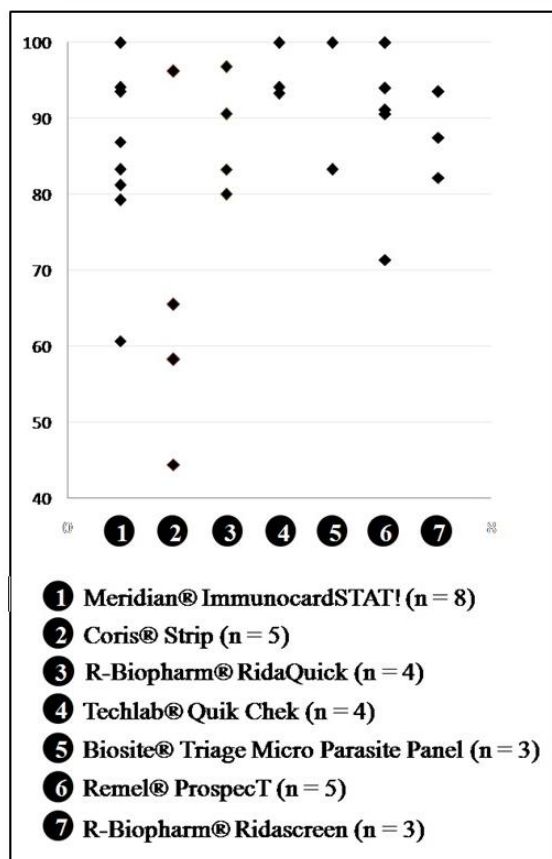


Figure 23 : Sensibilité (%) des tests de détection antigénique vis-à-vis de *G. intestinalis* dans différentes études (tableau XI)

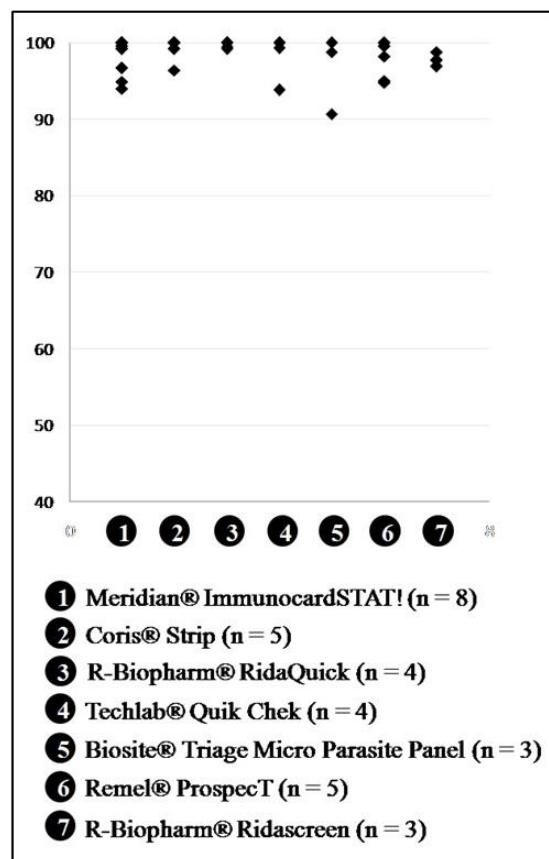


Figure 24 : Spécificité (%) des tests de détection antigénique vis-à-vis de *G. intestinalis* dans différentes études (tableau XI)

b. *Cryptosporidium* spp.

La très grande majorité des tests ELISA et immuno-chromatographiques sont adaptés, selon les données de leurs fabricants respectifs, à la détection du genre *Cryptosporidium*. Toutefois il a été démontré, notamment avec les ICT, que le spectre de reconnaissance couvre essentiellement *C. parvum* et *C. hominis*. Dans une étude française, la sensibilité des ICT testés variait de 50% à 73% pour *C. parvum*, et de 59% à 87% pour *C. hominis* (Agnamey *et al.* 2011). Bien que les effectifs soient faibles, ces kits ne permettent pas *a priori* la détection fiable de *C. felis*, *C. meleagridis* ou *C. canis* (tableau IX). Il est très probable, quoique non démontré, qu'il en soit de même pour les autres espèces du genre *Cryptosporidium*.

Notons que dans notre revue, aucune étude ne s'attache à l'identification des espèces de *Cryptosporidium* dans leur panel de référence. Les données des fournisseurs étant nulles à ce sujet, il est donc impossible de connaître les performances des tests antigéniques vis-à-vis des différentes espèces de *Cryptosporidium*, à l'exception des kits testés dans la publication d'Agnamey *et al.* (tableau IX). Il est cependant probable que la sensibilité vis-à-vis des *Cryptosporidium* non *parvum* & *hominis*, pour l'ensemble des kits actuellement commercialisés, soit limitée voire nulle.

Tableau IX : Sensibilité des tests immunochromatographiques vis-à-vis des différentes espèces du genre *Cryptosporidium* (Agnamey *et al.* 2011)

Kit testé	Taux de détection (%) selon espèce				
	<i>C. parvum</i>	<i>C. hominis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. canis</i>
R-Biopharm® RidaQuick	73,3%	73,3%	20%	<20%	0%
Remel® Xpect	74,1%	83,3%	30%	<40%	0%
Meridian® Immunocard STAT!	73,3%	86,7%	33,3%	<40%	0%
Coris® <i>Crypto</i> strip	50,1%	59,3%	10%	0%	0%

Nous constatons, dans notre revue de la littérature, que la constitution d'un large panel d'échantillons positifs à *Cryptosporidium* est difficile. De nombreuses publications présentent ainsi un échantillonnage inférieur à 20 échantillons positifs (Van den Bossche *et al.* 2015)(Swierczewski *et al.* 2012)(Weitzel *et al.* 2006)(Elsafi *et al.* 2013)(Sadaka *et al.* 2015). Si l'ensemble des données disponibles seront exploitées pour notre analyse, il conviendra de pondérer les résultats par la taille des panels utilisés. A titre d'exemple, le kit Biosite® Triage Micro Parasite Panel a été évalué dans deux études présentant une grande différence en terme d'échantillonnage (n=8 et n=58 échantillons positifs par une méthode de référence basée sur la microscopie). Dans ces deux travaux, la sensibilité calculée varie de 50% (Swierczewski *et al.* 2012) à 100% (Garcia *et al.* 2000). L'étude de Garcia *et al.*, possédant le plus large panel, offre logiquement une fiabilité plus importante.

La majorité des études utilisent la microscopie (coloration de ZNM ou de kinyoun modifiée) et/ou l'immunofluorescence indirecte comme méthode de référence. L'association de plusieurs techniques est, comme dans le cas de *Giardia*, une méthodologie intéressante pour constituer un panel validé d'échantillons positifs (Van den Bossche *et al.* 2015)(Weitzel *et al.* 2006)(Elsafi *et al.* 2013)(L.Alexander *et al.* 2013). Comme évoqué précédemment, l'évaluation d'un ICT avec une méthode de référence utilisant le même principe ne semble pas pertinent (Christy *et al.* 2012).

La **sensibilité** de la détection de *Cryptosporidium* varie entre 68% et 100% (**93%** en moyenne) pour Meridian® ImmunocardSTAT! (8 études), de 67% à 92% (**76%** en moyenne) pour Coris® Strip (3 études), de 64% à 100% (**80%** en moyenne) pour R-Biopharm® RidaQuick (8 études), de 88% à 100% (**97%** en moyenne) pour Techlab® Quik Chek (4 études), de 70% à 100% (**91%** en moyenne) pour Remel® Prospect (4 études) et de 65% à 82% (**73%** en moyenne) avec R-Biopharm® Ridascreen (3 études). Les résultats sont compilés sur la figure 25.

Les sensibilités analytiques des tests Coris® Strip, R-Biopharm® RidaQuick et R-Biopharm® Ridascreen sont modestes (73% à 80%), en accord avec l'étude d'Agnamey *et al.* (tableau IX). D'autres tests, comme Techlab® Quik Chek, montrent une sensibilité appréciable pour *Cryptosporidium* spp. L'absence de données concernant les performances vis-à-vis des espèces non *parvum* & *hominis* constitue toutefois une lacune.

La **spécificité** de la détection de *Cryptosporidium* varie entre 95% et 100% (**98%** en moyenne) pour Meridian® ImmunocardSTAT! (8 études), de 95% à 100% (**98%** en moyenne) pour Coris® Strip (3 études), de 94% à 100% (**97%** en moyenne) pour R-Biopharm® RidaQuick (8 études), de 99% à 100% (**100%** en moyenne) pour Techlab® Quik Chek (4 études), de 99% à 100% (**100%** en moyenne) pour Remel® Prospect (4 études) et de 93% à 100% (**96%** en moyenne) avec R-Biopharm® Ridascreen (3 études). Les résultats sont compilés sur la figure 26.

A l'instar des kits adaptés à la détection de *G. intestinalis*, les tests décrits dans notre revue possèdent une bonne spécificité pour *Cryptosporidium* spp.

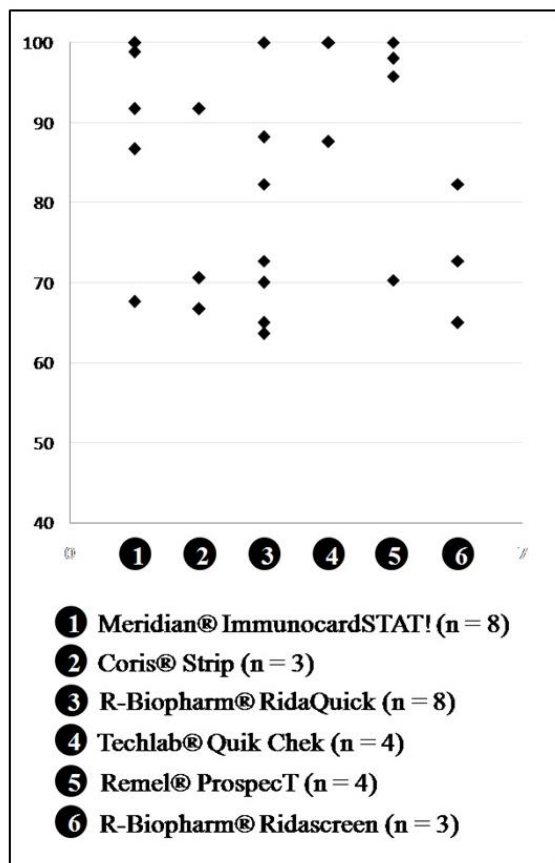


Figure 25 : Sensibilité (%) des tests de détection antigénique vis-à-vis de *Cryptosporidium* spp. dans différentes études (tableau XI)

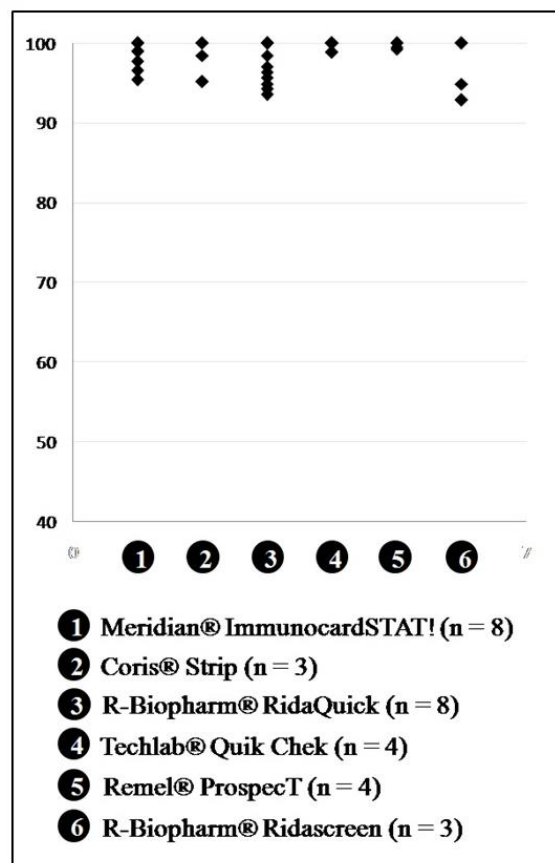


Figure 26 : Spécificité (%) des tests de détection antigénique vis-à-vis de *Cryptosporidium* spp. dans différentes études (tableau XI)

c. *Entamoeba histolytica*

L'évaluation des kits destinés à la détection antigénique d'*E. histolytica* pose de nombreux problèmes, notamment en termes d'effectifs inclus dans les études publiées et dans le choix des méthodes utilisées comme référence. En effet, la méthode de référence, considérée comme le *gold standard*, doit permettre l'établissement d'un panel d'échantillons « vrais positifs » pour *E. histolytica*. Comme évoqué antérieurement, il paraît peu judicieux de choisir un test antigénique pour établir les performances d'une autre technique similaire. Dans ces conditions, nous écarterons les études concernées (Christy *et al.* 2012)(Korpe *et al.* 2012). L'utilisation d'une PCR spécifique est préférable (Van den Bossche *et al.* 2015)(Stark *et al.* 2008). L'association avec une PCR permettant la détection d'*E. dispar* est tout à fait intéressante, et permet de mettre en évidence d'éventuelles réactions croisées avec cette espèce non pathogène (Formenti *et al.* 2015)(Verkerke *et al.* 2015).

De façon surprenante, les tests Biosite® Triage Micro Parasite Panel, R-Biopharm® RidaQuick et Ridascreen ne permettent pas la distinction d'*E. histolytica* de *E. dispar*, s'avérant ainsi positifs pour ces deux espèces. De fait, l'utilisation de tels tests (voir tableau XI) qui, à l'instar de la microscopie, ne peuvent pas détecter spécifiquement *E. histolytica*, ne présente que peu d'intérêt pour le biologiste. L'évaluation de ces tests ne sera donc pas discutée ici (Goñi *et al.* 2012)(Swierczewski *et al.* 2012)(Garcia *et al.* 2000).

Pour notre analyse nous avons donc uniquement retenu les études évaluant des tests antigéniques adaptés à la détection de l'espèce *E. histolytica* et comparés à une méthode de référence employant une technique de PCR (Van den Bossche *et al.* 2015)(Stark *et al.* 2008)(Formenti *et al.* 2015)(Verkerke *et al.* 2015). Les performances analytiques pour les kits commerciaux concernés sont présentées dans le tableau X (chaque kit n'a fait l'objet que d'une seule étude validée par nos critères). Notons que l'étude évaluant les tests Meridian® ImmunocardSTAT! Et Remel® Prospect ne présente qu'un nombre très limité d'échantillons positifs devant amener à relativiser les résultats obtenus (Van den Bossche *et al.* 2015).

Tableau X : Performances analytiques de différents tests antigéniques dédiés à la détection spécifique d'*E. histolytica*

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Meridian® ImmunocardSTAT!	100	80
Meridian® ImmunocardSTAT! CGE	88,9	61,4
Remel® Prospect	100	68,1
Cellabs® CELISA Path	27,8	100
Techlab® <i>E. histolytica</i> II	0	98,8
Techlab® Quik Chek	97,5	100

Au vu de notre analyse, les deux tests **ELISA Techlab® *E. histolytica* II** et **Cellabs® CELISA Path** présentent une très **faible sensibilité pour *E. histolytica*** (0% et 28% respectivement) par comparaison avec la PCR (Stark *et al.* 2008). L'utilisation au laboratoire de ces deux kits ne paraît donc pas à recommander. Le test Meridian® ImmunocardSTAT! CGE (ICT) présente une sensibilité analytique supérieure (89%) mais aussi un défaut de spécificité avec une réactivité croisée vis-à-vis d'*E. dispar* (Formenti *et al.* 2015). Cette faible spécificité est également observée pour l'ELISA Remel® Prospect (Van den Bossche *et al.* 2015)(Verkerke *et al.* 2015). **Le kit Techlab® Quik Chek présente de bonnes performances analytiques, et a en outre été évalué sur un large panel d'échantillons positifs** (Verkerke *et al.* 2015).

La grande majorité des tests antigéniques étudiés présentent des sensibilités insuffisantes pour la détection de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. et/ou *E. histolytica*. La bonne spécificité vis-à-vis de *Giardia* et de *Cryptosporidium* peut toutefois faire envisager leur utilisation en seconde intention.

Notre revue de la littérature permet de mettre en évidence de bonnes performances analytiques pour le test **Techlab® Quik Chek**. Pour la détection de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. et *E. histolytica*, les sensibilités respectives sont de 96%, 97% et 97% ; et les spécificités respectives 98%, 100% et 100%. Il s'agit ainsi du seul test de détection antigénique affichant des performances suffisantes pour envisager une utilisation en première intention, notamment pour la détection d'*E. histolytica*.

Tableau XI : Performances analytiques des tests antigéniques (ELISA et immuno-chromatographie) utilisés en coprologie parasitaire : revue de la littérature

Référence	Méthode de référence	Kit testé	Parasite(s) ciblé(s)	Réf+/test+	Réf-/test-	Réf+/test-	Réf-/test+	Sensibilité	Spécificité
(Van den Bossche <i>et al.</i> 2015)	Sélection rétrospective : microscopie + ELISA (Remel® ProsPecT) + PCR spécifique	Meridian® ImmunocardSTAT!	<i>G. intestinalis</i>	10	18	2	0	83,3%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	12	18	0	0	100%	100%
			<i>E. histolytica</i>	5	20	0	5	100%	80%
		Coris® Duo Strip	<i>G. intestinalis</i>	7	18	5	0	58,3%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	11	18	1	0	91,7%	100%
		R-Biopharm® RidaQuick	<i>G. intestinalis</i>	10	18	2	0	83,3%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	12	18	0	0	100%	100%
			<i>E. histolytica</i>	5	22	0	3	100%	88%
		Techlab® Quik Chek	<i>G. intestinalis</i>	12	18	0	0	100%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	12	18	0	0	100%	100%
	Sélection prospective : microscopie + ELISA (Remel® ProsPecT) + PCR spécifique	Meridian® ImmunocardSTAT!	<i>G. intestinalis</i>	23	39	6	0	79,3%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	62	0	3	100%	95,4%
			<i>E. histolytica</i>	1	54	0	13	100%	80,6%
		Coris® Duo Strip	<i>G. intestinalis</i>	19	16	10	0	65,5%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	40	1	2	66,7%	95,2%
		R-Biopharm® RidaQuick	<i>G. intestinalis</i>	25	40	5	0	83,3%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	66	0	1	100%	98,5%
			<i>E. histolytica</i>	1	60	0	9	100%	87%
		Techlab® Quik Chek	<i>G. intestinalis</i>	29	15	0	1	100%	93,8%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	42	0	0	100%	100%
		Remel® Prospect ELISA	<i>G. intestinalis</i>	30	38	0	2	100%	95%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	67	0	0	100%	100%
			<i>E. histolytica</i>	1	47	0	22	100%	68,1%
(Stark <i>et al.</i> 2008)	Microscopie + PCR spécifique	Cellabs® CELISA Path	<i>E. histolytica</i>	5	261	13	0	27,8%	100%
		Techlab® <i>E. histolytica</i> II	<i>E. histolytica</i>	0	258	18	3	0%	98,8%

(Swierczewski <i>et al.</i> 2012)	Microscopie (relecture par un second opérateur si discordance)	Biosite® Triage Micro Parasite Panel	<i>G. intestinalis</i>	20	243	0	3	100%	98,8%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	4	258	4	0	50%	100%
			<i>E. histolytica/dispar</i>	11	254	1	0	91,7%	100%
(Garcia <i>et al.</i> 2000)	Microscopie (Remel® ProsPecT et Meridian® Merifluor si discordance)	Biosite® Triage Micro Parasite Panel	<i>G. intestinalis</i>	142	274	0	28	100%	90,7%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	58	384	0	2	100%	99,5%
			<i>E. histolytica/dispar</i>	41	346	1	56	97,6%	86,1%
(Minak <i>et al.</i> 2012)	Techlab® <i>E.histolytica</i> II et <i>Giardia</i> II + PCR spécifique	Techlab® Quik Chek	<i>G. intestinalis</i>	32	83	2	0	94,1%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	28	89	0	0	100%	100%
		Meridian® ImmunocardSTAT!	<i>G. intestinalis</i>	32	78	2	5	94,1%	94%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	28	86	0	3	100%	96,6%
		Remel® Xpect	<i>G. intestinalis</i>	30	81	4	2	88,2%	97,6%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	23	89	5	0	82,1%	100%
(Weitzel <i>et al.</i> 2006)	Microscopie + Meridian® merifluor IFD (Remel® ProsPecT si discordance)	R-Biopharm® RidaQuick <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	36	174	9	1	80%	99,4%
		R-Biopharm® RidaQuick <i>Crypto</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	15	203	2	0	88,2%	100%
		R-Biopharm® RidaQuick Combi	<i>G. intestinalis</i>	36	175	9	0	80%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	14	203	3	0	82,3%	100%
		R-Biopharm® Ridascreen <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	37	173	8	2	82,2%	98,8%
		R-Biopharm® Ridascreen <i>Crypto</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	14	203	3	0	82,3%	100%
		Coris® <i>Giardia</i> Strip	<i>G. intestinalis</i>	20	175	25	0	44,4%	100%
		Coris® <i>Crypto</i> Strip	<i>Cryptosporidium</i> spp.	12	200	5	3	70,6%	98,5%
(Shimelis and Tadesse 2014)	Microscopie (ZNM)	Savyon® Coprostrip <i>Crypto</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	31	49	19	1	62%	98%
(Christy <i>et al.</i> 2012)	Techlab® <i>E.histolytica</i> II, <i>Giardia</i> II, <i>Cryptosporidium</i> II	Techlab® Tri-Combo parasite screen	<i>G. intestinalis</i>						
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	183	418	4	13	97,9%	97%
			<i>E. histolytica</i>						
(Garcia <i>et al.</i> 2003)	Microscopie + Meridian® Merifluor (retesté si discord.)	Meridian® ImmunocardSTAT!	<i>G. intestinalis</i>	159	231	11	0	93,5%	100%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	84	316	1	0	98,8%	100%
(Elsafi <i>et al.</i> 2013)	Microscopie + PCR spécifique	Meridian® ImmunocardSTAT!	<i>G. intestinalis</i>	20	124	3	1	86,9%	99,2%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	13	133	2	0	86,7%	100%

(Garcia and Garcia 2006)	Microscopie + Meridian® Merifluor IFD + Para-Tect IFD	Medical Chemical Corporation® Simple Read <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	103	104	3	0	97,2%	100%
(Vidal and Catapani 2005)	Microscopie	Remel® Prospect <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	5	128	2	7	71,4%	94,8%
(Korpe <i>et al.</i> 2012)	Microscopie + techlab® tri-Combo et <i>E. histolytica</i> II	techlab® <i>E. histolytica</i> Quik Chek	<i>E. histolytica</i>	56	172	0	0	100%	100%
(Nguyen <i>et al.</i> 2012)	Microscopie (PCR spécifique si discordance)	Coris Bioconcept® <i>Giardia</i> -Strip	<i>G. intestinalis</i>	77	269	3	10	96,2%	96,4%
(Goñi <i>et al.</i> 2012)	Microscopie	RidaQuick <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	NR	NR	NR	NR	96,8%	>99,5%
		RidaQuick <i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR	NR	NR	NR	63,6%	97,1%
		RidaQuick <i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i> /dispar	NR	NR	NR	NR	19,5%	95,8%
		RidaQuick <i>Giardia</i> /Crypto	<i>G. intestinalis</i>	NR	NR	NR	NR	96,8%	>99,5%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.					72,7%	95,7%
		RidaQuick <i>Giardia</i> /Crypto/ <i>Entamoeba</i>	<i>G. intestinalis</i>	NR	NR	NR	NR	96,8%	>99,5%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.					72,7%	94,9%
			<i>E. histolytica</i> /dispar					17,1%	96,6%
	PCR spécifiques (<i>G. intestinalis</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>E. histolytica</i>)	Ridascreen <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	NR	NR	NR	NR	93,5%	97,7%
		Ridascreen Crypto	<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR	NR	NR	NR	72,7%	94,9%
		Ridascreen <i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i> /dispar	NR	NR	NR	NR	24,4%	97,5%
		RidaQuick <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	NR	NR	NR	NR	90,6%	99,20%
		RidaQuick <i>Cryptosporidium</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR	NR	NR	NR	70%	94,3%
		RidaQuick <i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i> /dispar	NR	NR	NR	NR	62,5%	94,7%
		RidaQuick <i>Giardia</i> /Crypto	<i>G. intestinalis</i>	NR	NR	NR	NR	90,6%	99,2%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.					65%	96,4%
		RidaQuick <i>Giardia</i> /Crypto/ <i>Entamoeba</i>	<i>G. intestinalis</i>	NR	NR	NR	NR	90,6%	99,2%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.					70%	93,6%
			<i>E. histolytica</i> /dispar					62,5%	96,1%
		Ridascreen <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	NR	NR	NR	NR	87,5%	96,9%
		Ridascreen Crypto	<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR	NR	NR	NR	65%	92,9%
		Ridascreen <i>Entamoeba</i>	<i>E. histolytica</i> /dispar	NR	NR	NR	NR	75%	92,8%

(Maraha and Buiting 2000)	Microscopie	Remel® Prospect <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	51	110	5	2	91,1%	98,2%
		Cellabs® <i>Giardia</i> CELISA	<i>G. intestinalis</i>	36	106	20	6	64,3%	96%
		DSL® <i>Giardia</i> -ELISA	<i>G. intestinalis</i>	45	110	11	2	80,3%	98,2%
		Melotec® Melotest Giardiasis Ag	<i>G. intestinalis</i>	45	107	11	5	80,3%	95,5%
(Sadaka <i>et al.</i> 2015)	Microscopie	Meridian® ImmunocardSTAT!	<i>G. intestinalis</i>	12	74	0	4	100%	94,9%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	86	0	2	100%	97,7%
		apDia® <i>G. lamblia</i> ELISA	<i>G. intestinalis</i>	12	75	0	3	100%	96,1%
		Diag. Automation® <i>Crypto</i> ELISA	<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	87	0	1	100%	98,9%
(Garcia and Shimizu 1997)	Meridian® Merifluor IFD	Remel® Prospect <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	94	50	6	0	94%	100%
		Remel® Prospect <i>Crypto</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	98	50	2	0	98%	100%
		Cambridge® <i>G. lamblia</i> ELISA	<i>G. intestinalis</i>	99	50	1	0	99%	100%
		Meridian® Premier <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	98	50	2	0	98%	100%
		Meridian® Premier <i>Crypto</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	99	50	1	0	99%	100%
		Techlab® <i>Giardia</i> CELISA	<i>G. intestinalis</i>	96	50	4	0	96%	100%
(Oster <i>et al.</i> 2006)	Remel® Prospect <i>Giardia</i>	Coris® <i>Giardia</i> Strip	<i>G. intestinalis</i>	14	133	10	1	58,3%	99,2%
(Formenti <i>et al.</i> 2015)	PCR spécifiques (<i>E. histolytica</i> et <i>E. dispar</i>)	Meridian® ImmunocardSTAT! CGE	<i>E. histolytica</i>	16	54	2	34	88,9%	61,4%
(Johnston <i>et al.</i> 2003)	Meridian® Merifluor IFD	Meridian® ImmunocardSTAT!	<i>G. intestinalis</i>	26	213	6	1	81,2%	99,5%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	25	207	12	2	67,6%	99%
		Remel® Prospect <i>Giardia</i>	<i>G. intestinalis</i>	29	213	3	1	90,6%	99,5%
		Remel® Prospect <i>Crypto</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	26	208	11	1	70,3%	99,5%
(El-Moamly and El-Sweify 2012)	Microscopie (Kinyoun modifié)	Meridian® ImmunocardSTAT!	<i>Cryptosporidium</i> spp.	22	288	2	3	91,7%	99%
		Remel® Prospect <i>Crypto</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	23	289	1	2	95,8%	99,3%
(Pillai and Kain 1999)	Microscopie	Biosite® Triage Parasite Panel	<i>G. intestinalis</i>	5	65	1	0	83,3%	100%
	Remel® Prospect		<i>E. histolytica/dispar</i>	28	30	13	0	68,3%	100%

(Verkerke <i>et al.</i> 2015)	Techlab® <i>E. histolytica</i> II		<i>E. histolytica</i>	94	349	3	3	96,9%	99,1%
	Remel® Prospect <i>E. histo</i>		<i>E. histolytica</i>	87	328	24	10	78,4%	97%
	Techlab® <i>E. histolytica</i> II + PCR multiplex	Techlab® <i>E. histolytica</i> Quik Chek	<i>E. histolytica</i>	97	350	2	0	98%	100%
	Remel® Prospect <i>E. histolytica</i> + PCR multiplex		<i>E. histolytica</i>	97	349	3	0	97%	100%
(Strand <i>et al.</i> 2008)	Microscopie	Meridian® Immunocard STAT!	<i>G. intestinalis</i>	68	609	44	21	60,7%	96,7%
(L.Alexander <i>et al.</i> 2013)	Microscopie (PCR spécifique si discordance)	Techlab® <i>Giardia/Crypto</i> Quik Chek	<i>G. intestinalis</i>	42	154	3	1	93,3%	99,3%
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	92	94	13	1	87,6%	98,9%

6. Détection d'ADN parasitaire par PCR à partir d'échantillons de selles

Les techniques de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ont révolutionnées de nombreux domaines de la biologie médicale notamment en microbiologie. Très sensible, la PCR est ainsi devenue un pilier fondateur de la virologie moderne. L'utilisation de la PCR en coprologie parasitaire est possible depuis de nombreuses années mais l'intérêt potentiel en routine de ce type de technologie a longtemps été négligé. L'application de la PCR nécessite en effet un personnel formé, des locaux adaptés, et le surcoût engendré ne peut justifier le remplacement des techniques microscopiques. D'autre part, le spectre de parasites décelables en microscopie étant très large, une PCR ciblée ne peut être appliquée qu'en seconde intention, à l'instar des tests de détection antigénique. A l'heure actuelle, la commercialisation de nombreux kits de PCR multiplex, performants, capables de détecter un vaste panel de pathogènes, et d'une simplicité de mise en œuvre inégalable, semble en passe de remettre en cause les techniques habituellement usitées en microbiologie. Deux étapes sont critiques et susceptibles d'impacter les performances des méthodes reposant sur la PCR : l'extraction des acides nucléiques contenus dans les échantillons et l'amplification.

6.1. Extraction des acides nucléiques à partir d'échantillons de selles

L'objectif de l'extraction vise à purifier les acides nucléiques présents dans l'échantillon biologique, avec un rendement suffisant (van Zanten *et al.* 2011a). La complexité de la matrice fécale complique notablement l'extraction. Il est ainsi difficile d'obtenir un degré de pureté élevée, et d'autres molécules extraites conjointement peuvent alors jouer le rôle d'inhibiteurs de PCR. Une lyse cellulaire incomplète ou une altération des acides nucléiques présents dans l'échantillon peuvent également altérer le rendement de l'extraction et affecter la sensibilité de la PCR (Claassen *et al.* 2013).

La paroi épaisse des oocystes de *Cryptosporidium*, qui protège les sporozoïtes des conditions environnementales, complique aussi l'extraction du matériel génétique du parasite. Il s'agit d'une spécificité de ce protozoaire, car cette difficulté n'est pas observée avec les kystes de *Giardia* ou d'*Entamoeba* (Hawash 2014). L'extraction des acides nucléiques de *Cryptosporidium* nécessite ainsi un prétraitement destiné à rompre la paroi de l'oocyste. Plusieurs études soulignent l'intérêt de traitements chimiques (protéinase), mécaniques (broyage avec microbilles) et/ou thermiques (ébullition, cycles de congélations/décongélations) (van Zanten *et al.* 2011a)(Claassen *et al.* 2013)(Elwin *et al.* 2012).

Les méthodes d'extraction manuelles (colonnes) permettent souvent d'obtenir les meilleurs rendements (Elwin *et al.* 2012). A l'opposé, les techniques d'extraction (semi)automatisées permettent de réduire significativement le temps technique (Halstead *et al.* 2013)(van Zanten *et al.* 2011b). Plusieurs études démontrent la possible utilisation d'automates d'extraction, avec des rendements compatibles avec la recherche de parasites intestinaux tels que *Cryptosporidium*. Associé à un prétraitement par broyage mécanique, l'automate QiaSymphony (Qiagen®) a ainsi été évalué favorablement dans plusieurs études (van Zanten *et al.* 2011a)(Claassen *et al.* 2013)(van Zanten *et al.* 2011b).

Le tableau XII synthétise les principales caractéristiques des méthodes d'extraction employées dans différentes études d'évaluation de PCR multiplex destinées notamment à la détection de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* et *Entamoeba histolytica/dispar*. Comme nous pouvons le constater à la lecture de ces données, il n'existe pas de protocole d'extraction consensuel. La prise d'essai initiale, notamment, varie de 50 mg à 600 mg de selles selon les études. La majorité des études emploient un prétraitement de l'échantillon (probablement afin d'améliorer le rendement d'extraction des acides nucléiques de *Cryptosporidium*). Celui-ci peut associer une lyse chimique, thermique et/ou mécanique. Notons que certaines études n'emploient aucun prétraitement ce qui simplifie notablement l'extraction.

Comme nous le constaterons par la suite, il est difficile de tirer des conclusions quant à l'impact des différents protocoles d'extraction sur les performances des PCR multiplex testées, les effectifs d'échantillons positifs étant souvent très restreints.

Tableau XII : Protocoles d'extraction étudiés dans différentes études d'évaluation de PCR multiplex destinées à la détection de parasites dans les selles

Référence	Quantité de selles	Prétraitement			Extraction
		Chimique	Thermique	Mécanique	
(Mejia <i>et al.</i> 2013)	50 mg	-	-	-	Kit MP FastDNA (MP Biochemicals®)
(Stensvold and Nielsen 2012)	250 mg	-	-	-	NucliSENS easyMag DNA (Biomérieux®)
(Stark <i>et al.</i> 2011)	NR	-	-	-	QiaAmp DNA stool Minikit (Qiagen®)
(Stark <i>et al.</i> 2014)	NR	-	-	-	EZI Virus Mini Kit (Qiagen®)
(Nazeer <i>et al.</i> 2013)	200 mg	-	-	-	QiaAmp DNA stool Minikit (Qiagen®)
(Liu <i>et al.</i> 2013)	200 mg	Tampon de lyse QiaAmp ASL (Qiagen®)	Ebullition 5'	Broyage avec billes (212 - 300µm) 3'	Protocole QiaAmp stool DNA (Qiagen®)
(Wessels <i>et al.</i> 2014)	50 mg	Tampon de lyse NucliSENS EasyMAG (Biomérieux®) 10'	-	Tubes avec microbilles SK38 (Bertin corp.®)	QIAsymphony Virus/Bacteria Minikit (Qiagen®) après centrifugation
(Zboromyrska <i>et al.</i> 2014)	100 µL	Tampon de lyse NucliSENS EasyMAG (Biomérieux®) 15'	-	Tubes avec microbilles SK38 (Bertin corp.®)	EZI Virus Mini Kit (Qiagen®) après centrifugation
(Hove <i>et al.</i> 2007)	NR	Tampon de lyse (kit Biomérieux®) 10'	-	-	Semi automatisée: NucliSENS MiniMAG (Biomérieux®)
(Hove <i>et al.</i> 2009)	200 µL suspension	SDS-protéinase K (12h à 55°C)	100°C (10')	-	QiaAmp Tissue Kit spin columns (Qiagen®)
(Haque <i>et al.</i> 2007)	200 mg	Tampon de lyse (kit Qiagen®) à 95°C	azote liquide (6 passages rapides)	-	QiaAmp DNA stool Minikit (Qiagen®)
(Verweij <i>et al.</i> 2004)	200 µL suspension	SDS-protéinase K (2h à 55°C)	100°C (10')	-	QiaAmp Tissue Kit spin columns (Qiagen®)
(Basuni <i>et al.</i> 2012)	100 mg	Protéinase K (3h à 55°C)	100°C (10')	-	QiaAmp DNA stool Minikit (Qiagen®)
(McAuliffe <i>et al.</i> 2013)	60 µL surnageant	Tampon de lyse NucliSENS	-	-	NucliSENS easyMag DNA (Biomérieux®)
(Van Lint <i>et al.</i> 2013)	300 - 600 mg	-	-70°C au moins 24h (surnageant)	Disruptor Genie (Scientific Industries®)	QIAsymphony Virus/Bacteria Minikit (Qiagen®)

6.2. PCR multiplex : principe et parasites ciblés

La PCR conventionnelle n'est pas adaptée au diagnostic de routine. Celle-ci est désormais supplantée par la PCR en temps réel qui offre de nombreux avantages.

• **Principe de la PCR en temps réel :** Nous nous contenterons ici d'une description succincte. La PCR consiste en l'amplification exponentielle d'une région génique spécifique du pathogène recherché. Après dénaturation du double brin d'ADN, les amorces spécifiques vont alors s'apparier spécifiquement à l'ADN et permettre à la Taq polymérase d'initier l'élongation du brin complémentaire. Les brins néo-synthétisés seront à leur tour dénaturés et recopiés à chaque nouveau cycle. Après plusieurs dizaines de cycles, un très grand nombre de copies de la région ciblée sont présentes dans le milieu réactionnel.

En PCR en temps réel, une sonde spécifique de la région à amplifier, marquée à ses extrémités avec deux fluorochromes, est ajoutée au mélange réactionnel. Le principe de la PCR en temps réel (*Real-Time PCR*) utilisant la technologie Taqman est rappelé à la figure 27. Lorsque la sonde Taqman est intacte (les deux molécules sont physiquement proches) le fluorochrome émetteur (*Reporter*), voit sa fluorescence inhibée par le fluorochrome suppresseur (*Quencher*). Lors de l'élongation, l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase dégrade la sonde précédemment appariée, libérant ainsi le *Reporter*. Sans l'inhibition induite par la proximité du *Quencher*, la fluorescence émise par le fluorochrome peut alors être détectée. Son intensité étant proportionnelle au nombre d'amplicons présents dans le milieu réactionnel, celle-ci suit donc une évolution exponentielle et peut donc permettre une quantification en temps réel (figure 28).

Le « multiplexage » de la PCR est rendu possible par l'utilisation de différents couples d'amorces et de sondes spécifiques possédant des fluorochromes (*Reporter*) ayant des longueurs d'émission différentes pour chaque cible. La PCR multiplex offre ainsi la possibilité de détecter simultanément plusieurs espèces parasitaires (protozoaires, helminthes, champignons tels que les microsporidies). A la différence des techniques dites « maison », les kits commercialisés sont toutefois surtout axés sur les protozoaires les plus fréquents : *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* et *E. histolytica* (Tableau XIII).

Les cibles des méthodes de diagnostic reposant sur la PCR sont principalement les régions codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal (*Giardia*, *E. histolytica*, *Cryptosporidium*) dont les répétitions en de nombreuses copies permettent d'augmenter la sensibilité de la PCR. Les gènes codant pour les protéines de la paroi de *Cryptosporidium* (COWP : *Cryptosporidium* Oocyste Wall Protein) peuvent également être ciblés (Vasoo and Pritt 2013).

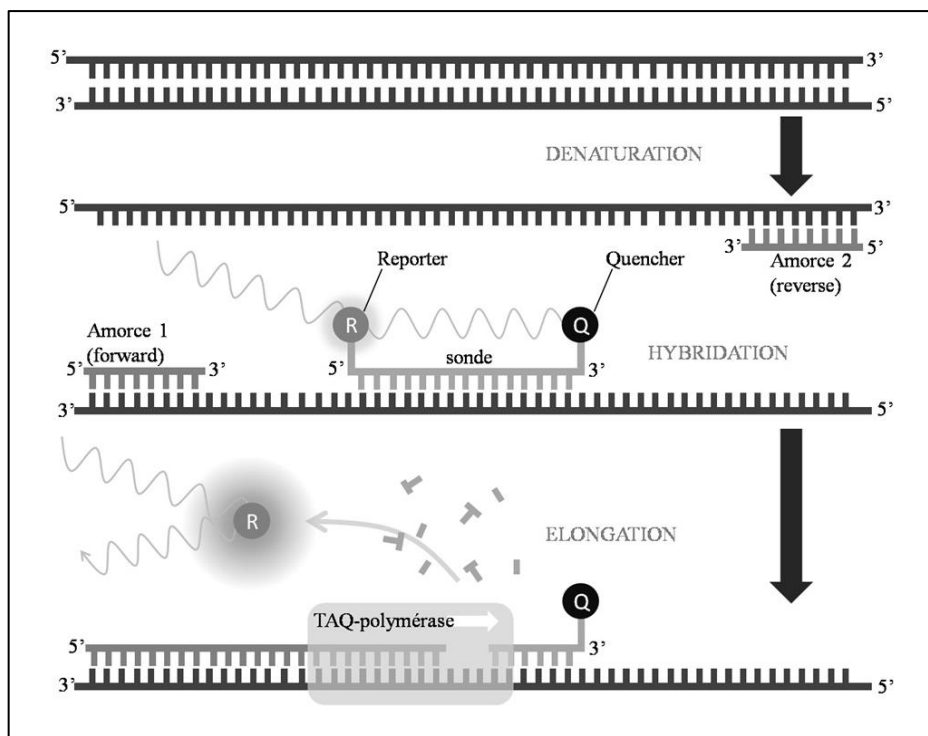


Figure 27 : Principe de la PCR en temps réel (*real-time PCR*) : technologie Taqman

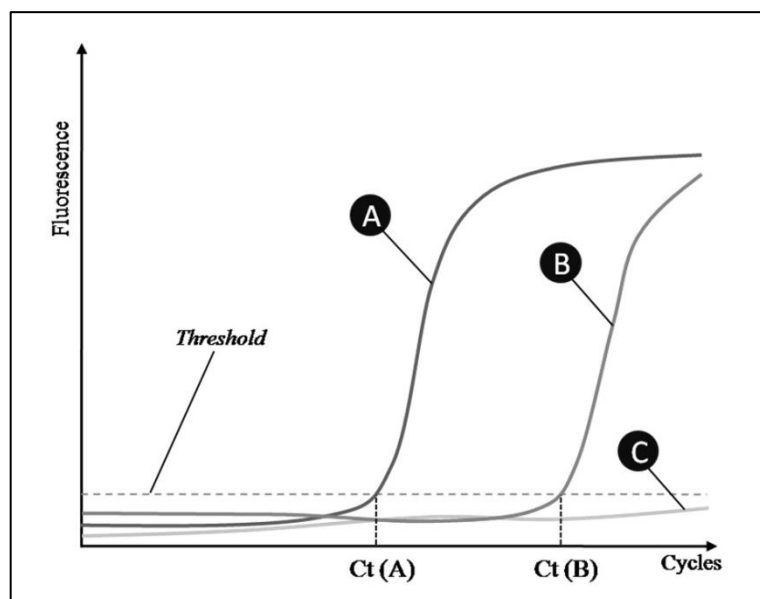


Figure 28 : courbes réactionnelles de PCR en temps réel. La figure représente 3 courbes réactionnelles correspondant à 3 échantillons biologiques. Les échantillons A et B sont positifs. L'échantillon A présente une quantité d'ADN cible plus élevée que le B. L'échantillon C est négatif.

Tableau XIII : Diversité des panels de parasites (et autres pathogènes) détectés simultanément par PCR multiplex dans différentes études publiées dans la littérature

Pathogènes ciblés	Références bibliographiques													
	(Mejia <i>et al.</i> 2013)	(Stark <i>et al.</i> 2011)	(Stark <i>et al.</i> 2014)	(Liu <i>et al.</i> 2013)	(Zboromyrska <i>et al.</i> 2014)	(de Boer <i>et al.</i> 2010)	(Buss <i>et al.</i> 2015)	(McAuliffe <i>et al.</i> 2013)	(Santos <i>et al.</i> 2013)	(Lee <i>et al.</i> 2010)	(Basuni <i>et al.</i> 2011)	(Le <i>et al.</i> 2012)	(Taniuchi <i>et al.</i> 2011b)	(Verweij <i>et al.</i> 2007)
<i>Giardia intestinalis</i>	•	•	•	•	•	•	•	•		•				
<i>Cryptosporidium</i> sp.	•	•	•	•	•		•	•						
<i>Entamoeba histolytica</i>	•	•		•	•		•	•	•					
<i>Entamoeba</i> spp.			•											
<i>Entamoeba dispar</i>									•					
<i>Entamoeba hartmanni</i>									•					
<i>Entamoeba coli</i>									•					
<i>Entamoeba moshkovskii</i>									•					
<i>Cyclospora cayentanensis</i>							•			•			•	
<i>Cystoisospora belli</i>													•	
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>										•			•	
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>										•			•	
<i>Dientamoeba fragilis</i>		•	•											
<i>Blastocystis hominis</i>			•											
<i>Ascaris lumbricoides</i>	•			•							•			
<i>Trichuris trichiura</i>				•										
<i>Ancylostoma duodenale</i>	•										•			
<i>Necator americanus</i>	•										•			•
<i>Oesophagostomum bifurcum</i>											•			•
<i>Strongyloides stercoralis</i>	•													
<i>Fasciola hepatica</i>												•		
<i>Fasciola gigantica</i>												•		
<i>Salmonella enterica</i>				•	•	•	•	•						
<i>Campylobacter jejuni</i>				•	•	•	•	•						
<i>Yersinia enterocolitica</i>					•		•	•						
<i>Shigella</i> spp.				•		•	•							
<i>Shigella</i> /EIEC							•							
EHEC								•						
ETEC				•	•		•							
EPEC				•			•							
STEC				•	•	•	•							
EAEC				•			•							
<i>E. coli</i> H7O157					•		•							
<i>Vibrio</i> spp.				•	•		•							
<i>Vibrio cholerae</i>				•			•							
<i>Clostridium difficile</i>				•	•			•						
<i>Plesiomonas shigelloides</i>							•							
Norovirus				•	•		•	•						
Rotavirus				•	•		•	•						
Adénovirus				•			•	•						
Astrovirus				•			•							
Sapovirus				•			•							

• **Kits commerciaux disponibles** : Bien que de nombreuses PCR « maison » aient été développées pour la coprologie parasitaire, le nombre de PCR multiplex commercialisées est encore restreint (Yansouni *et al.* 2014). Toutes sont adaptées à la détection de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* et *E. histolytica*. Le kit RIDA-GENE (R-Biopharm®) propose la détection supplémentaire de *Dientamoeba fragilis*, le FilmArray GI (Biofire®) la détection de *Cyclospora cayetanensis*, et le kit Easyscreen Enteric Protozoan Detection (Genetic Signatures®) la détection de *Dientamoeba fragilis* et de *Blastocystis hominis*. Si certains kits nécessitent une étape d'extraction préalable avant l'amplification, d'autres PCR multiplex sont conçues en une seule étape, l'extraction et l'amplification étant réalisées au sein du même automate (Luminex®, Biofire®, BD®). La simplicité de mise en œuvre de ces PCR multiplex « tout en un » est alors inégalée. Toutefois, ce type de système est totalement fermé, et le biologiste ne peut choisir, à la différence des autres kits de PCR multiplex (R-Biopharm®, Diagenode®, FastTracks Diagnostics®), les conditions d'extraction et d'amplification.

Tableau XIV : PCR multiplex actuellement commercialisées pour la détection de parasites intestinaux

Kit	Parasites ciblés	Extraction incluse	Marquage CE/IVD
Luminex® xTAG GPP	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.* <i>E. histolytica</i>	oui	non
R-Biopharm® RIDA GENE Parasitic Stool Panel	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.* <i>E. histolytica</i> <i>Dientamoeba fragilis</i>	non	non
Biofire Diagnostics® FilmArray GI	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.* <i>E. histolytica</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i>	oui	non
FastTracks Diagnostics® FTD Stool Parasites	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.* <i>E. histolytica</i>	non	oui
Diagenode® G-DiaPara	<i>G. intestinalis</i> <i>C. parvum</i> <i>E. histolytica</i>	non	oui
BD® BD MAX Enteric Parasite Panel	<i>G. intestinalis</i> <i>C. parvum/hominis</i> <i>E. histolytica</i>	oui	oui
Genetic Signatures® Easyscreen Enteric Protozoan Detection	<i>G. intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.* <i>E. histolytica</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Blastocystis hominis</i>	non	oui

* : espèces détectées non précisées par le fabricant

6.3. Performances analytiques : revue de la littérature

Les techniques de PCR multiplex connaissent actuellement un véritable essor. Des kits commerciaux, simples à mettre en œuvre, proposent aujourd'hui la détection simultanée de vastes panels de pathogènes et peuvent remettre en question la nécessité de recourir aux méthodes traditionnelles. L'examen parasitologique des selles n'échappe pas à ce phénomène.

Le tableau XVIII (page 86 à 88) synthétise les résultats d'évaluations de PCR multiplex destinées à la détection simultanée de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. et *E. histolytica*. Cette revue bibliographique a pour objectif de comparer les performances des PCR multiplex vis-à-vis de ces trois protozoaires par comparaison avec les techniques de référence basées sur la microscopie, mises en œuvre dans la plupart des laboratoires de parasitologie. Ainsi, les études utilisant des méthodes de référence basées sur d'autres PCR n'ont pas été considérées (Taniuchi *et al.* 2011a)(Wessels *et al.* 2014)(Buss *et al.* 2015).

L'évaluation des PCR multiplex est souvent limitée par la taille de l'échantillonnage. En effet, la majorité des études (15 sur 18) sont prospectives ; si elles permettent d'appréhender les différentes techniques dans un contexte proche d'une activité de laboratoire réelle, elles présentent souvent un faible nombre d'échantillons positifs (Stensvold and Nielsen 2012)(Basuni *et al.* 2012)(Wessels *et al.* 2014)(Zboromyrska *et al.* 2014). Ce constat est particulièrement vrai pour *Cryptosporidium* et *E. histolytica*.

La majorité de ces études (16 sur 18) emploient les techniques microscopiques comme méthodes de référence, sans technique complémentaire pour investiguer les éventuels résultats discordants. Notons que les techniques de microscopie employées sont parfois peu (voire pas) précisées (Stensvold and Nielsen 2012)(Svraka-Latifovic *et al.* 2014)(McAuliffe *et al.* 2013) : réalisation ou non d'une méthode de concentration par exemple, technique utilisée pour la recherche de *Cryptosporidies*, etc. Il est alors difficile de juger de la pertinence de ce *gold standard* pris comme référence. Ainsi, dans une étude, l'examen microscopique se limite à un simple examen direct ! (Mejia *et al.* 2013). Concernant *E. histolytica*, la microscopie ne permettant pas de diagnostic précis, les tests antigéniques et/ou les PCR ciblées seront considérées, avec certaines réserves, comme les méthodes de référence.

A partir des données disponibles dans la littérature, nous avons déterminé la sensibilité/spécificité pour les études incluant au moins 10 échantillons positifs, avec une méthode de référence reposant sur la microscopie pour *Giardia* et *Cryptosporidium* et sur la détection antigénique et/ou la PCR pour *E. histolytica*. Dans ces conditions, 16 études permettent d'appréhender avec fiabilité la performance de la PCR multiplex vis-à-vis de *G. intestinalis* mais seulement 3 études pour *Cryptosporidium spp.* et 4 études pour *E. histolytica*.

La **figure 29** résume les **sensibilités** déterminées pour les **différentes PCR multiplex** retenues. En comparaison avec les techniques microscopiques considérées comme le *gold standard*, la PCR multiplex possède une bonne sensibilité pour la détection de *G. intestinalis* et de *Cryptosporidium spp.* La sensibilité moyenne est ainsi de 95% pour *G. intestinalis*, et de 100% pour la détection de *Cryptosporidium spp.* Notons toutefois que seules 3 études (Hove *et al.* 2009)(Verweij *et al.* 2004)(Simons A *et al.*, 29th Clinical Virology Symposium, Abstr 71, USA) ont été exploitées pour la sensibilité vis-à-vis de *Cryptosporidium*.

Il est difficile d'interpréter la sensibilité de la PCR multiplex pour *E. histolytica* en raison du faible nombre d'études exploitables (4 sur 18), des faibles effectifs d'échantillons positifs et de l'hétérogénéité des méthodes de référence employées. Si l'on considère les études employant en référence une PCR spécifique pour la détection d'*E. histolytica*, la sensibilité de la PCR multiplex est de 100% (Verweij *et al.* 2004)(Simons A *et al.*, 29th Clinical Virology Symposium, Abstr 71, USA).

Deux études employant un test ELISA comme méthode de référence (Techlab® *E. histolytica* II) démontrent pour la PCR multiplex testée une sensibilité de 61% et 86% (Liu *et al.* 2013)(Haque *et al.* 2007). Au vu des performances des tests antigéniques discutées précédemment, notamment en terme de spécificité vis-à-vis de l'espèce *E. histolytica* (Stark *et al.* 2008), il convient toutefois de relativiser la fiabilité de ce *gold standard*. Il aurait été intéressant, dans ces deux études, de réaliser une troisième technique discriminante et/ou une PCR permettant la détection d'*E. dispar*, afin d'appréhender la potentielle réactivité croisée du test Techlab® *E. histolytica* II.

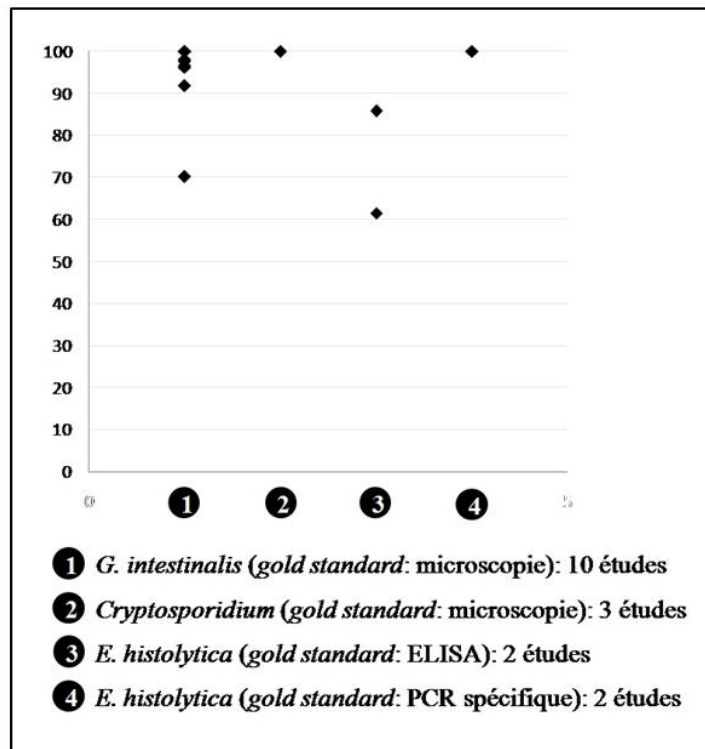


Figure 29 : Sensibilité des PCR multiplex (tableau XVIII) en fonction du parasite ciblé et de la méthode de référence utilisée

La **figure 30** résume les **spécificités** déterminées pour les **différentes PCR multiplex**. La spécificité moyenne pour la détection de *G. intestinalis* est de 93% (10 études). Toutefois, en omettant l'étude de Mejia *et al.*, précédemment citée et n'employant qu'un simple examen microscopique direct comme technique de référence sans technique de concentration, la spécificité atteint 96%.

La spécificité moyenne pour la détection de *Cryptosporidium* est quant à elle de 98% (3 études). En considérant les études utilisant la détection antigénique ou une PCR spécifique comme méthode de référence (4 études), la spécificité moyenne pour la détection d'*E. histolytica* est de 96%. L'échantillonnage de « vrais négatifs » étant significatif dans la majorité des études, nous pouvons supposer la bonne fiabilité des résultats de spécificité.

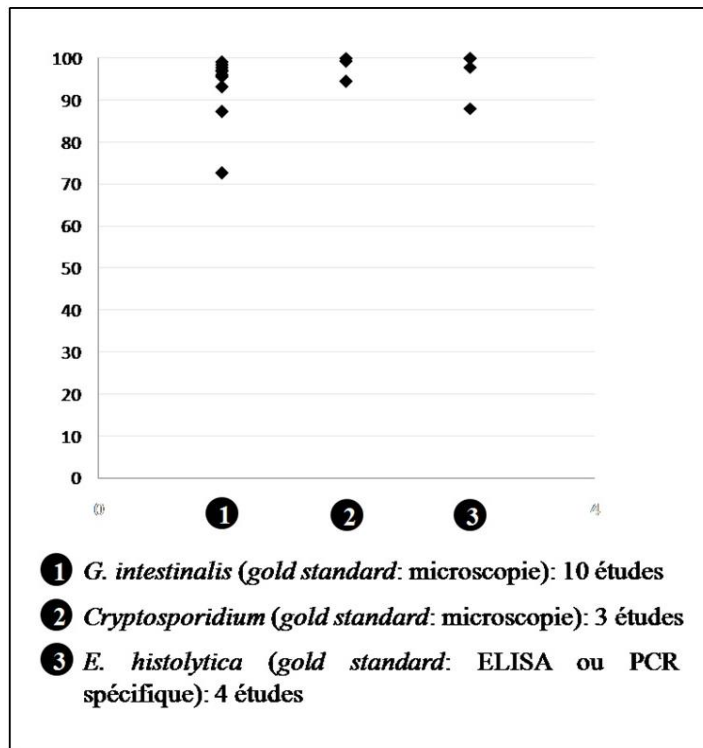


Figure 30 : Spécificité des PCR multiplex (tableau XVIII) en fonction du parasite ciblé et de la méthode de référence utilisée

Au vu des valeurs de sensibilité et de spécificité précédemment décrites, nous pouvons affirmer la **bonne concordance des techniques de PCR multiplex avec les méthodes microscopiques constituant actuellement le *gold standard***. Au-delà de cette considération, il apparaît clairement que le nombre d'échantillons négatifs par la méthode de référence mais positifs en PCR multiplex (Réf-/PCR+, cf. tableau XVIII) est significatif dans l'ensemble des études prospectives évaluées, plus important que le nombre d'échantillons positif par la méthode de référence mais négatif en PCR (Réf+/PCR-). Ces échantillons représentent ainsi plus de 80% de l'ensemble des discordants dans les études prospectives que nous avons analysées. Cette observation semble indiquer une sensibilité supérieure de la PCR multiplex par rapport à l'approche diagnostique reposant sur la microscopie.

Les figures 31 et 32 représentent les **taux de détection** de *G. intestinalis* et de *Cryptosporidium* spp. dans les **études prospectives** du tableau XVIII. Les résultats obtenus montrent un taux de détection plus élevé avec les PCR multiplex par rapport aux valeurs obtenues en microscopie, ce constat étant valable dans l'ensemble des études pour *G. intestinalis* (n = 10), et pour *Cryptosporidium* (n = 8). Cette tendance semble être retrouvée avec *E. histolytica*, même si le nombre d'études exploitables est bien plus limité (Liu *et al.* 2013)(Hove *et al.* 2009).

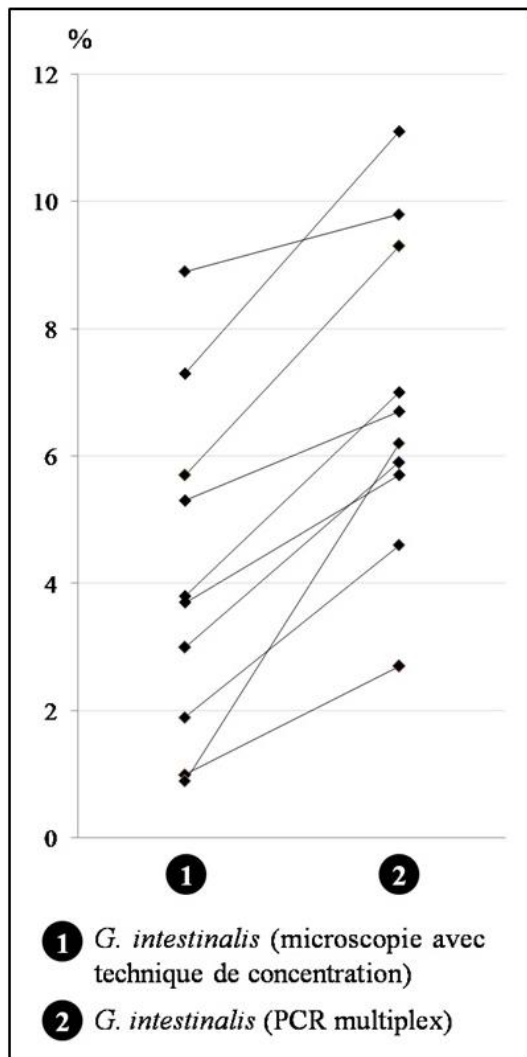


Figure 31 : Comparaison des taux de détection de *G. intestinalis* dans des études prospectives (tableau XVIII) selon les techniques utilisées

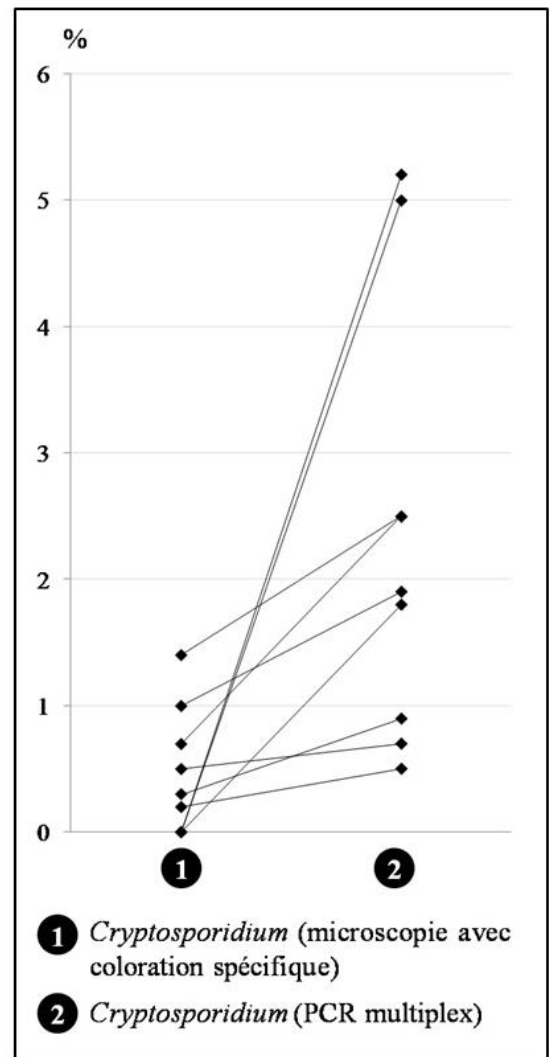


Figure 32 : Comparaison des taux de détection de *Cryptosporidium* spp. dans des études prospectives (tableau XVIII) selon les techniques utilisées

Afin de démontrer une éventuelle supériorité de la PCR multiplex par rapport aux techniques de microscopie en terme de sensibilité analytique, il est indispensable de pouvoir définir les « **vrais positifs** » au sein d'un panel d'échantillons. En effet, en considérant la microscopie comme le *gold standard*, les échantillons uniquement positifs en PCR sont de principe considérés comme de « faux positifs ». Toutefois, l'utilisation d'une troisième technique discriminante telle qu'une PCR spécifique permet alors de calculer les performances de la PCR multiplex et des techniques microscopiques. Un échantillon "vrai positif" doit être positif dans au moins deux des trois techniques testées (figure 33). Dans ce cadre, les études se doivent d'être prospectives afin de ne pas biaiser l'échantillonnage. Trois études seulement appliquent cette méthode (Stark *et al.* 2011)(Stark *et al.* 2014)(Van Lint *et al.* 2013).

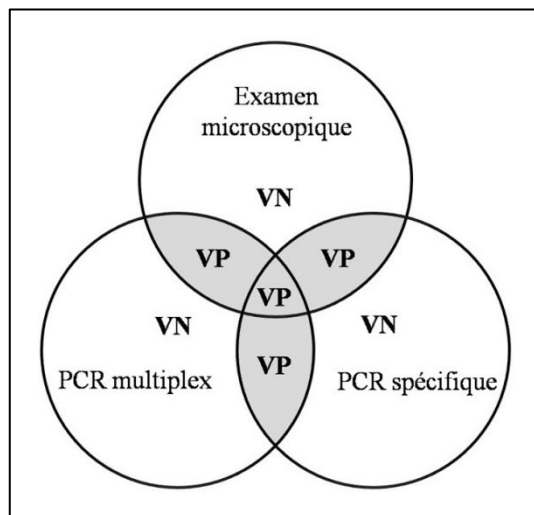


Figure 33 : Diagramme de Venn : définition des « vrais positifs » (VP) et des « vrais négatifs » (VN) ; chaque cercle correspond aux échantillons positifs avec la technique citée

Les PCR multiplex évaluées selon cette méthodologie sont les kits G-DiaPara (Diagenode®) (Van Lint *et al.* 2013), EasyScreen Enteric Parasite Detection Kit (Genetic Signatures®) (Stark *et al.* 2014) et une PCR « maison » (Stark *et al.* 2011). Les techniques microscopiques usitées et prises comme référence emploient des méthodes de concentration, des colorations permanentes (hématoxyline) et des colorations spécifiques pour la détection de *Cryptosporidium* (ZNM, auramine-phénol).

Au total, **concernant *Giardia intestinalis***, la **sensibilité** analytique varie de **38% à 73%** pour la microscopie, et de **92% à 100%** pour les PCR multiplex (tableaux XV à XVII).

Concernant *Cryptosporidium spp.*, la **sensibilité** est de **55%** pour la microscopie, et de **100%** pour les PCR multiplex (tableaux XV et XVII). Notons que l'étude d'évaluation du kit G-DiaPara (Diagenode®) n'offre pas un panel d'échantillon suffisant pour être ici considérée.

La **spécificité** des deux techniques est de **100%** pour les deux parasites.

En revanche, l'évaluation des performances des PCR multiplex vis-à-vis d'*E. histolytica* est difficile, les effectifs d'échantillons positifs étant faibles ou nuls, et les techniques évaluées ne permettant pas une détection spécifique de l'espèce pathogène *E. histolytica* (Stark *et al.* 2011)(Stark *et al.* 2014).

Notons que les performances décrites pour *Giardia* et *Cryptosporidium* sont superposables à celles obtenues pour la détection de *Blastocystis* (Stark *et al.* 2014) et *Dientamoeba fragilis* (Stark *et al.* 2011)(Stark *et al.* 2014).

Tableau XV : Evaluation des performances de la microscopie et d'une PCR multiplex « maison » (Stark *et al.* 2011)

Technique	Echantillons positifs/VP	
	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Cryptosporidium</i>
PCR multiplex	28/28 ^a	9/9 ^c
Microscopie	14/28 ^b	5/9 ^d

^a sensibilité = 100%, spécificité = 100%

^b sensibilité = 50%, spécificité = 100%

^c sensibilité = 100%, spécificité = 100%

^d sensibilité = 55%, spécificité = 100%

Tableau XVI : Evaluation des performances de la microscopie et du kit G-DiaPara (Diagenode ®) (Van Lint *et al.* 2013)

Technique	Echantillons positifs/VP	
	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Cryptosporidium</i>
PCR multiplex	29/29 ^a	3/3
Microscopie	11/29 ^b	1/3

^a sensibilité = 100%, spécificité = 100%

^b sensibilité = 38%, spécificité = 100%

Tableau XVII : Evaluation des performances de la microscopie et du kit Easyscreen (Genetic Signatures ®) (Stark *et al.* 2014)

Technique	Echantillons positifs/VP	
	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Cryptosporidium</i>
PCR multiplex	24/26 ^a	9/9 ^c
Microscopie	19/26 ^b	5/9 ^d

^a sensibilité = 92%, spécificité = 100%

^b sensibilité = 73%, spécificité = 100%

^c sensibilité = 100%, spécificité = 100%

^d sensibilité = 55%, spécificité = 100%

La PCR multiplex semble montrer des performances analytiques au moins équivalentes à celles des techniques traditionnelles basées sur l'examen microscopique, en nécessitant une quantité d'échantillon bien plus faible. Trois études dont la méthodologie est rigoureuse démontrent même que la sensibilité des PCR multiplex pourrait être supérieure à celle des méthodes microscopiques. Concernant la détection d'*E. histolytica*, la PCR multiplex a une spécificité supérieure à celle des tests reposant sur la détection d'antigènes.

Toutefois, la grande majorité des études réalisées à ce jour ne bénéficient pas d'un panel d'échantillons positifs suffisant pour permettre une interprétation fiable des résultats, notamment pour *Cryptosporidium* spp. et *E. histolytica*. D'autre part, aucune étude ne s'est attachée à tester la sensibilité des PCR multiplex vis-à-vis des espèces rares de *Cryptosporidium*.

Tableau XVIII : Performances analytiques des PCR multiplex adaptées à la recherche de *G. intestinalis*, *E. histolytica* et *Cryptosporidium* spp. : Revue de la littérature

Réf	PCR multiplex	Extraction	Design de l'étude	Pathogènes ciblés	Amorces	Méthodes de référence	Réf+/PCR+	Réf-/PCR-	Réf+/PCR-	Réf-/PCR+	Sensibilité	Spécificité
(Liu <i>et al.</i> 2013)	non commerciale	Semi-automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1	VII (Techlab®)	17	49	3	11	85%	81,7%
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	3		17	55	4	4	80,9%	93,2%
				<i>E. histolytica</i>	1		8	66	5	9	61,5%	88%
(Mejia <i>et al.</i> 2013)	non commerciale	Automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	2	II + V	23	274	0	103	100%	72,7%
				<i>C. parvum/hominis</i>	2		0	379	0	21	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>	2		0	390	6	4	NA	NA
(Stensvold and Nielsen 2012)	NR	Automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	NR	I	9	865	0	15	NA	NA
				<i>Cryptosporidium</i> spp.			0	873	0	16	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>			1	885	0	3	NA	NA
(Hove <i>et al.</i> 2007)	non commerciale	Semi-automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1	II + III + V	40	654	1	27	97,6%	96%
				<i>C. parvum/hominis</i>	1		0	686	0	36	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>	1		0	722	0	0	NA	NA
(Stark <i>et al.</i> 2011)	non commerciale	Automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1	IV + V	14	444	0	14	100%	96,9%
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	1		5	463	0	4	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>	1		7	449	12	4	NA	NA
(Hove <i>et al.</i> 2009)	non commerciale	Manuelle	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1	II + III + V	95	2442	0	54	100%	97,8%
				<i>C. parvum/hominis</i>	1		12	2560	0	19	100%	99,3%
				<i>E. histolytica</i>	1	II + III + VII	6	2577	1	7	NA	NA
(Haque <i>et al.</i> 2007)	non commerciale	Semi-automatisée	Rétrospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1	VII (Techlab®)	48	73	6	2	92,3%	97,4%
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	4		28	98	3	0	90,3%	100%
				<i>E. histolytica</i>	3		36	88	6	2	85,7%	97,8%
(Bruijnesteijn van Coppenraet <i>et al.</i> 2009)	non commerciale	Semi-automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1	II + III + IV + V	28	352	1	16	96,5%	95,6%
				<i>C. parvum/hominis</i>	1		2	394	0	1	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>	1		1	396	0	0	NA	NA

(Verweij <i>et al.</i> 2004)	non commerciale	Manuelle	Rétrospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1	II + III + VII	20	85	0	0	100%	100%
				<i>C. parvum/hominis</i>	1	V	20	85	0	0	100%	100%
				<i>E. histolytica</i>	1	II + III + VIII	20	85	0	0	100%	100%
(Nazeer <i>et al.</i> 2013)	non commerciale	Automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1		85	416	36	61	70,2%	87,2%
				<i>C. parvum/hominis</i>	1	II + III + V	4	583	0	11	NA	NA
				<i>E. histolytica/dispar</i>	1		8	554	35	1	18,6%	99,8%
(Basuni <i>et al.</i> 2012)	non commerciale	Semi-automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1		2	211	0	12	NA	NA
				<i>C. parvum/hominis</i>	1	II + III + IV + V	0	225	0	0	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>	1		0	219	2	4	NA	NA
(Svraka-Latifovic <i>et al.</i> 2014)	non commerciale	NR	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1		65	670	1	8	98%	99%
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	I	2	562	0	3	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>	1		3	564	0	0	NA	NA
(Van Lint <i>et al.</i> 2013)	Diagenode® G-DiaPara	Semi-automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>	1		11	601	1	18	91,7%	97,1%
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	5	II + III + VI	1	628	0	2	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>	1		0	631	0	0	NA	NA
(Wessels <i>et al.</i> 2014)	xTAG® GPP	Automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>			9	384	0	0	NA	NA
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR	VIII	3	389	1	0	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>			1	387	0	5	NA	NA
(Zboromyrska <i>et al.</i> 2014)	xTAG® GPP	Semi-automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>		III + IV + V	7	172	0	6	NA	NA
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR		0	185	0	0	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>		III + IV + VIII	1	183	0	1	NA	NA
Simons A <i>et al.</i> , 29th Clinical Virology Symposium, Abstr 71, USA	R-Biopharm® RIDAGENE Parasite Stool Panel	NR	Rétrospectif	<i>Giardia intestinalis</i>			25	179	1	13	96,1%	93,2%
				<i>C. parvum</i>	NR	I	17	190	0	11	100%	94,5%
				<i>E. histolytica</i>			18	142	47	11	NA	NA
		NR	Rétrospectif	<i>Giardia intestinalis</i>			38	178	2	0	95%	100%
				<i>C. parvum</i>	NR	VIII	27	189	1	1	96,4%	99,5%
				<i>E. histolytica</i>			29	189	0	0	100%	100%

(Stark <i>et al.</i> 2014)	Genetic signatures® EasyScreen (version 1)	Automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>			19	334	0	5	100%	98,5%
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR	IV + V	5	349	0	4	NA	NA
				<i>Entamoeba</i> spp.			18	336	0	4	100%	98,8%
(McAuliffe <i>et al.</i> 2013)	Fast-Track Diagnostics®	Automatisée	Prospectif	<i>Giardia intestinalis</i>		IV + VII	23	NR	0	19	100%	NA
				<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR	V + VII	2	NR	1	1	NA	NA
				<i>E. histolytica</i>		IV	0	NR	1	1	NA	NA

NA : Non applicable (moins de 10 échantillons positifs par la méthode de référence et/ou absence de détection spécifique par la méthode de référence)

NR : Non renseigné

Méthodes de référence I : microscopie (sans renseignements), II : examen direct sans concentration, III : examen microscopique après concentration, IV : coloration permanente (noir chlorazol, hématoxyline), V : coloration de Ziehl-Neelsen modifié ou de Kinyoun modifié, VI : auramine-phénol, VII : technique ELISA, VIII : biologie moléculaire

Tableau XIX : Séquences des amorces et sondes décrites dans la littérature pour la détection de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. et *E. histolytica*

Pathogène	Amorce sens (5' – 3')	Amorce antisens (5' – 3')	Sonde (5' – 3')	N°
<i>Giardia intestinalis</i>	GACGGCTCAGGACAACGGTT	TTGCCAGCGGTGTCCG	CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG	1
	CATGCATGCCCGCTCA	AGCGGTGTCCGGCTAGC	AGGACAACGGTTGCAC	2
<i>Cryptosporidium</i> spp.	CGCTTCTCTAGCCTTTCATGA	CTTCACGTGTGTTTGCCAAT	CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACTGGTATC	1
	AAC TTCACGTGTGTTTGCCAAT	CCAATCACAGAATCATCAGAATCG	CATATGAAGTTATAGGGATACCAG	2
	GGGTTGTATTTATTAGATAAAGAACCA	AGGCCAATACCCTACCGTCT	TGACATATCATTCAAGTTTCTGAC	3
	CAAATTGATACCGTTTGTCTTCTG	GGCATGTGCGATTCTAATTCAGCT	TGCCATACATTGTTGCTCTGACAAATTGAAT	4
	CAAATTGATACCGTTTGTCTTCTG	GGCATGTGCGATTCTAATTCAGCT	TGCCATACATTGTTGTC	5
<i>E. histolytica</i>	ATTGTCGTGGCATCCTAACTCA	GCGGACGGCTCATTATAACA	TCATTGAATGAATTGGCCATT	1
	GTTTGTATTAGTACAAAATGGCCAATTC	TCGTGGCATCCTAACTCACTTAGA	CAATGAATTGAGAAATGACA	2
	AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAGTAAAA	CTTAGAATGTCATTTCTCAATTCAT	ATTAGTACAAAATGGCCAATTCATTCA	3

Chaque trio (amorces sens/antisens et sonde) est associé à un numéro référencé dans le tableau XVIII

PARTIE II : EVALUATION DE LA PCR MULTIPLEX G-DIAPARATRIO (DIAGENODE®)

1. Introduction

Comme évoqué précédemment, la microscopie constitue le *gold standard* en coprologie parasitaire et l'examen parasitologique des selles s'appuie ainsi sur différentes techniques de concentration et de coloration. Relativement complexes à mettre en œuvre, demandant un temps technique conséquent et une solide expérience de la part du biologiste, celles-ci sont aujourd'hui concurrencées par de nouveaux tests de détection basés sur la reconnaissance antigénique et sur les techniques de détection d'ADN par PCR.

De nombreux tests de détection antigénique, ELISA ou immuno-chromatographiques, sont actuellement commercialisés pour la détection de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. et *E. histolytica*. Toutefois, comme nous l'avons démontré dans la première partie de ce travail, la grande majorité des tests disponibles n'affichent pas encore des performances analytiques suffisantes pour se substituer aux méthodes basées sur la microscopie.

La PCR multiplex présente de nombreux avantages par rapport aux techniques de détection traditionnelles. Simple et rapide à mettre en œuvre, cette technique présente en outre l'avantage de ne pas être opérateur-dépendante. Comme nous l'avons observé précédemment, les performances analytiques de la PCR multiplex semblent au moins comparables à celles des techniques de microscopie. Concernant la détection spécifique d'*E. histolytica*, l'utilisation de techniques de PCR semble en outre indispensable. Le nombre de kits de PCR multiplex actuellement commercialisés est toutefois encore très restreint et les études d'évaluation souffrent très souvent d'un faible échantillonnage et/ou de l'absence d'une troisième technique discriminante. Dans ces conditions, il est souvent difficile d'appréhender les performances de la PCR multiplex testée. Quelques études démontrent toutefois une nette supériorité de la PCR multiplex sur l'actuel *gold standard* en terme de sensibilité.

Dans ce contexte, notre étude a pour objectif l'évaluation d'une nouvelle PCR multiplex en cours de commercialisation : le kit G-DiaParaTrio (Diagenode Diagnostics®).

Le kit G-DiaParaTrio permet la détection simultanée de *G. intestinalis*, *C. parvum*, *C. hominis* et *E. histolytica*. Notons que ce test est une version optimisée du kit G-DiaPara, ne détectant que l'espèce *C. parvum* parmi le genre *Cryptosporidium* (Van Lint *et al.* 2013).

Pour l'évaluation de ce nouveau kit, nous avons plusieurs objectifs :

1) Etablissement d'un panel de référence : Afin de réunir un nombre d'échantillons positifs significatif, 12 centres hospitaliers ont participé au recueil prospectif d'échantillons de selles, sur une période de 18 mois. Il a ainsi été possible de recueillir un nombre appréciable d'échantillons positifs pour les pathogènes d'intérêt, mais aussi un vaste panel d'autres parasites non détectés par la PCR multiplex testée. L'ensemble des échantillons collectés ont été centralisés au laboratoire de Parasitologie/Mycologie du CHU de Nantes. Le panel d'échantillon positif (n = 135) a été défini par les techniques reconnues comme le *gold standard*, utilisant notamment l'examen microscopique selon un protocole standardisé (figure 34). En outre, les échantillons provenant des 11 autres centres hospitaliers ont également bénéficié des protocoles de routine locaux avant leur envoi. Au final, la positivité (ou la négativité) des échantillons a été confirmée par deux opérateurs expérimentés et, pour une grande partie du panel, dans deux laboratoires de parasitologie distincts. De rares échantillons présentaient une discordance de résultats entre le centre expéditeur et le CHU de Nantes : Ces échantillons ont été exclus de notre étude.

2) Optimisation de l'étape d'extraction : Afin de tester le kit G-DiaParaTrio dans des conditions facilement transposables à la routine d'un laboratoire, il a été décidé de coupler la PCR à une extraction automatisée. L'utilisation de l'automate QiaSymphony (Qiagen®) a ainsi été choisie afin de permettre une extraction en série, sans réelle étape de lyse préalable, minimisant les opérations manuelles et d'une grande facilité de mise en œuvre.

3) Détermination des espèces de *Cryptosporidium* : le kit G-DiaParaTrio a été conçu pour la détection de *C. parvum* et *C. hominis*. Afin de s'assurer des performances du kit vis-à-vis de ces deux espèces, mais aussi vis-à-vis d'espèces moins fréquentes, une identification d'espèce a été effectuée par séquençage (ARN ribosomal 18S) afin de déterminer l'espèce pour l'ensemble des échantillons positifs à *Cryptosporidium*.

4) Exploration des échantillons discordants par une troisième technique : En cas de discordances entre la PCR multiplex et la méthode de référence (Réf-/PCR+), des PCR spécifiques de *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica* et *E. dispar* ont pu être effectuées au CHU de Dijon.

Le *design* de l'étude, dont nous avons abordé certains points-clés, est présenté schématiquement sur la figure 34. Nous espérons, par la méthodologie appliquée, avoir répondu aux différentes limitations notées dans notre revue de la littérature des études d'évaluation des PCR multiplex en coprologie parasitaire. Notons que notre étude, de par son *design* rétrospectif, n'a pas été conçue pour déterminer une éventuelle supériorité de la PCR multiplex par rapport à la microscopie mais permet, sur un large panel d'échantillons positifs, de déterminer si le kit G-DiaParaTrio couplé à une extraction automatisée offre des performances au moins comparables aux techniques actuellement utilisées au laboratoire de parasitologie.

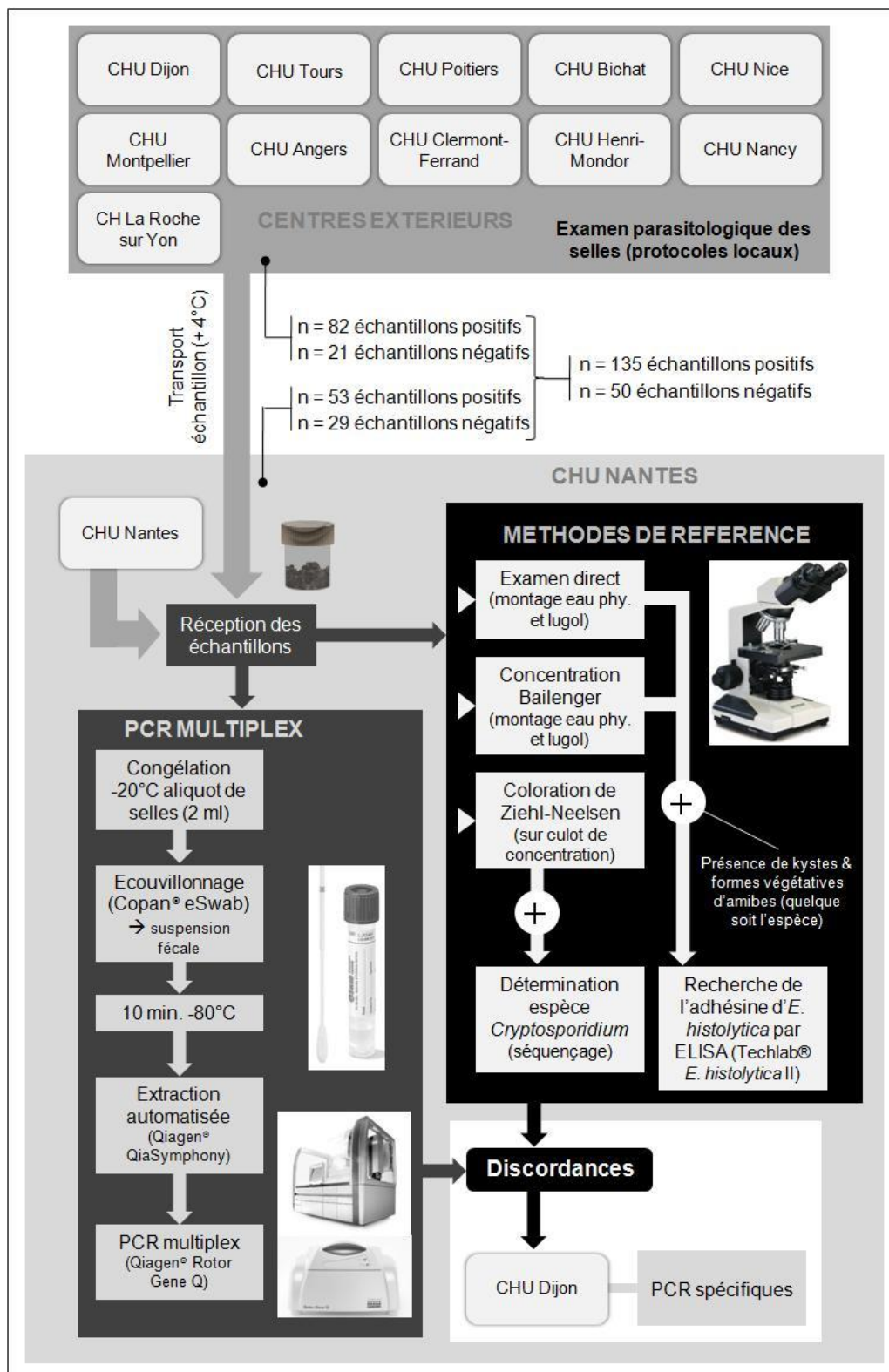


Figure 34 : Design de l'étude

2. Article

Nous présenterons notre étude expérimentale sous la forme d'un article en langue anglaise dont la mise en forme respecte les critères du journal *Clinical Microbiology and Infection*, auquel ce travail a été soumis.

Original article

Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *G. intestinalis*, *C. parvum*/*C. hominis* and *E. histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review

A. Laude¹, S. Valot², G. Desoubeaux³, N. Argy⁴, C. Nourrisson⁵, C. Pomares⁶, M. Machouart⁷, Y. Le Govic⁸, F. Dalle², F. Botterel⁹, N. Bourgeois¹⁰, E. Cateau¹¹, M. Leterrier¹², P. Le Pape¹, F. Morio^{1*}

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie, CHU Nantes ; ²Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Dijon ; ³Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine Tropicale, CHU de Tours/CEPR Inserm U1100, équipe 3, Université François-Rabelais de Tours ; ⁴Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris ; ⁵Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Clermont-Ferrand ; ⁶Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nice ; ⁷Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nancy ; ⁸Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU d'Angers ; ⁹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP Hôpital Henri Mondor, Créteil ; ¹⁰Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Montpellier ; ¹¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Poitiers ; ¹²Laboratoire de Microbiologie, CHD de la Roche-Sur-Yon.

Running title: RT-PCR for the detection of gastrointestinal protozoa

Corresponding author : Dr Florent Morio, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, 44093 Nantes.

Email : florent.morio@chu-nantes.

Tel +33240084079 ; fax :+33240084249.

Abstract

Microscopy is the gold standard for routine laboratory diagnosis in faecal parasitology but there is a growing interest for alternative methods to overcome the limitations of microscopic examination that is time-consuming and highly dependent on operator's skills and expertise. Compared to microscopy, DNA detection by PCR is simple and can offer a better turnaround time. However, PCR performances remain still difficult to assess as most studies have been conducted on a limited number of positive clinical samples and using in-house PCR methods. Our aim was to evaluate a new multiplex PCR assay (G-DiaParaTrio, Diagenode Diagnostics), targeting *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*C. hominis* and *Entamoeba histolytica*. To minimize the turnaround time, PCR was coupled with automated DNA extraction (QiaSymphony, Qiagen). The PCR assay was evaluated using a reference panel of 185 samples established by routine microscopic examination using a standardized protocol including Ziehl-Neelsen staining and adhesin detection by ELISA (*E. histolytica* II, TechLab). This panel, collected from 12 French parasitology laboratories, included 135 positive samples for *G. intestinalis* (n=38), *C. parvum/hominis* (n=26), *E. histolytica* (n=5), 21 other gastrointestinal parasites, together with 50 negative samples.

In all, the G-DiaParaTrio multiplex PCR assay identified 38 *G. intestinalis*, 25 *C. parvum*/*C. hominis* and 5 *E. histolytica* leading to a sensitivity/specificity of 92/100%, 96/100% and 100/100% for *G. intestinalis*, *C. parvum*/*C. hominis* and *E. histolytica*, respectively. This new multiplex PCR assay offers fast and reliable results, similar to microscopy-driven diagnosis for the detection of these gastrointestinal protozoa, allowing its implementation in routine clinical practice.

Keywords: multiplex real-time PCR, microscopy, stool, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium hominis*, *Entamoeba histolytica*

Introduction

For many years, microscopic examination has been the only tool available for the detection of gastrointestinal parasites in stool specimens and still remains the cornerstone for the diagnosis of parasitic infections in routine diagnostic laboratories [1]. However, this approach has some limitations since it is labor-intensive and requires a high level of skill for optimal examination that remains a major challenge for many laboratories worldwide due to the low number of positive samples received annually [2]. In addition to the rapid processing of the samples to prevent morphological alterations, iterative stool specimens collected over a few days period are usually necessary to ensure proper sensitivity [2]. As a consequence, there is a growing interest for alternative methods, such as antigen detection based on rapid immunochromatographic tests and DNA detection mostly by real-time PCR, to overcome the limitations of microscopy [2,3]. Compared to microscopy, DNA-based detection methods display several advantages such as an increased sensitivity and specificity, the possibility for molecular typing and an optimized turnaround time when PCR is coupled to automated DNA extraction [3]. To date, PCR-based methods have mostly been focused on protozoa and especially *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* spp., although PCR targeting helminths and microsporidia have been also reported by some authors (nicely reviewed in [3]). Despite the growing number of studies on this topic, the performance of PCR-driven diagnosis is often difficult to assess and could therefore prevent its implementation in the clinical laboratory as : i) most studies relies on in-house PCRs [4-14], ii) complex and diverse DNA isolation protocols are often used [4,5,7,9,12,15], iii) the number of positive samples for the targeted parasites is usually low [5-7,10,12-19]; iv) in studies comparing microscopy to PCR, detailed informations regarding the protocol used for microscopic examination (direct wet mount only, use of concentration steps, etc.) are usually lacking or not suitable for a proper detection of the targeted parasites, leading to interpretation bias [5,14,16];

v) no external method is usually used to investigate discrepant results between both diagnostic procedures [5-7,10,12-14,16]. In addition, as *Cryptosporidium* species identification is usually not performed, PCR performances for species other than *C. parvum* and *C. hominis*, that can account for near 10% of human cases of cryptosporidiosis are lacking [20]. Finally, the still limited number of clinically-approved commercial PCR kits available, also prevents the implementation of these methods in most non-reference laboratories [15,17-19,21,22].

Here, our aim was to evaluate the G-DiaParaTrio multiplex PCR (Diagenode Diagnostics, Liège, Belgium), a new 4-plex PCR assay detecting simultaneously *G. intestinalis*, *C. parvum* / *C. hominis* and *E. histolytica* together with an internal inhibition control. This evaluation was performed on a large panel of stool samples microscopically examined using a single standardized protocol (referred here as the “reference panel”) and prospectively collected through 12 French hospital laboratories with a huge experience in clinical parasitology.

Materials and Methods

Specimen collection and validation of the “reference” panel

A collection of 185 stool samples (185 patients) including 135 positive samples for gastrointestinal parasites and 50 negative samples was established for this study. This collection, here described as the “reference panel”, was established to be representative of the diversity of gastrointestinal parasites that can be recovered from stool samples. As illustrated in Fig 1, samples were collected prospectively during routine clinical procedures between May 2013 and October 2014 at Nantes University Hospital (n=84) and at the 11 following French Hospitals: Angers (n=7), Clermont-Ferrand (n=15), Creteil Henri-Mondor (n=2), Dijon (n=4), La Roche-sur-Yon (n=1), Montpellier (n=2), Nancy (n=10), Nice (n=11), Paris-Bichat (n=19), Poitiers (n=2) and Tours (n=28). These samples were shipped to Nantes University Hospital as soon as possible after the parasitological diagnosis was obtained. Upon reception, a 2 mL-aliquot from unpreserved stool was stored at -20°C for multiplex PCR testing and parasitological findings were confirmed for each sample using a standardized protocol (Fig 1). Briefly, upon reception, each specimen was investigated for parasites by two trained-microscopists both on fresh samples after iodine-stained wet mount and following a Bailenger’s concentration method (Para-selles/Kop-color, Fumouze Diagnostics, Levallois Perret, France). Detection of *Cryptosporidium* oocysts was performed systematically on each sample using modified Ziehl-Neelsen staining. When positive, *Cryptosporidium* species identification was obtained by amplification and sequencing of the polymorphic region of the 18S rRNA using forward 5’-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3’ and reverse 5’-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3’ primers [23]. As amoeba species identification could be difficult microscopically (especially between *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*), each stool sample that yielded amoeba cysts or vegetative forms by microscopy, whatever the species suspected, was tested for *E. histolytica* specific adhesin by ELISA (*E. histolytica* II, TechLab, Blacksburg, Va.). All 50 negative samples were analysed using the same protocol.

DNA extraction

Prior to automated DNA extraction, each stool specimen was thawed at room temperature. After homogenization, a calibrated amount of stool (approximately 200 mg) was resuspended in 1200 µL of Liquid Amies medium (Copan Eswab LQ Amies Transport Medium) using a nylon flocked swab (Copan Eswab 480 CE) and stored at -80°C for 10 minutes. An inhibition control (supplied in the kit) was added before the extraction step to each clinical specimen in order to monitor the potential presence of PCR inhibitors. DNA extraction was performed on a QiaSymphony (Qiagen, Courtaboeuf, France) using the Complex 200 V6 DSP protocol with an 85 µL elution volume. DNA extracts were stored at -80°C while awaiting multiplex PCR.

Multiplex PCR

PCR amplification was performed in duplicate on 5 µL of extracted DNA using the G-DiaParaTrio kit (Diagenode Diagnostics) on a Rotor-Gene Q platform (Qiagen), as recommended by the manufacturer's instructions. This novel real-time PCR assay is a four-plex targeting simultaneously in a single-tube, *G. intestinalis*, *C. parvum/C. hominis*, *E. histolytica* and the inhibition control. Positive and negative controls were included in each run. To consider a run as "valid", positive controls must be reported as positive, negative controls as negative and external inhibition control must display a Ct (Cycle threshold) value ≤ 36 .

Data analysis

To evaluate the sensitivity and specificity of this new multiplex PCR assay targeting *G. intestinalis*, *C. parvum/C. hominis* and *E. histolytica*, PCR findings were compared to those obtained by the microscopy-driven diagnosis approach. False positive samples by PCR were samples that were found negative by microscopy for a pathogen of interest (i.e. targeted by the PCR assay) but positive by PCR. Conversely, false negative samples by PCR were samples that had been characterized as positive by microscopy but negative by the multiplex PCR assay.

Discrepancies between both diagnostic approaches were investigated by testing the samples at Dijon university hospital using in-house specific PCR assays targeting *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica* and *E. dispar* (S. Valot, adapted from [23-25]). Additional DNA extracts from *E. histolytica* (n=2), *E. dispar* (n=2), *C. felis* (n=5) and *C. meleagridis* (n=1) were used to confirm the specificity of the PCR assay. Stool samples positive for pathogens not targeted by the PCR assay were used to confirm the specificity of the G-DiaParaTrio kit.

Results

In all, this reference panel established for the clinical evaluation of the new multiplex PCR assay using a microscopy-driven approach, included samples positive for *G. intestinalis* (n=38), *C. parvum* (n=20), *C. hominis* (n=6) and *E. histolytica* (n=5) together with 21 other gastrointestinal pathogens belonging to protozoa, helminths or microsporidia (Table I). Forty-three of these samples displayed multi-parasitism (i.e. more than one species in the same sample).

All 185 stool samples of the reference panel were then tested with the new multiplex PCR assay. Results are summarized in Table II. PCR inhibition was detected in only one sample out of the 185 tested (<1%). This sample has not been excluded from the dataset as PCR inhibition was likely due to a competitive inhibition as this sample was highly positive for *G. intestinalis* by PCR (Ct<15). No cross-reactivity was observed for the 21 other gastrointestinal parasites (not targeted by the multiplex PCR assay) included in the reference panel (Table I).

In all, 35 out of the 38 positive samples for *G. intestinalis* by microscopy were also positive by PCR (92.1%, Table II). Testing again the three false negative samples by another round of DNA extraction and PCR yielded the same observations supporting that these samples contained a very low parasite burden.

Considering that these samples were processed by two well-trained microscopists, they should be considered true positive by microscopy (i.e. false negative by PCR). Conversely, three samples, negative by microscopy, were positive for *G. intestinalis* by the multiplex PCR. These three "false positive" samples were further confirmed to be positive for *G. intestinalis* by the external PCR method (Dijon Hospital). Taken together, compared to microscopy, analytical sensitivity and specificity of the PCR assay for *G. intestinalis* were 92% and 100%, respectively.

Among the 28 samples positive for *Cryptosporidium* spp. in the reference panel, 18S rDNA sequencing identified *C. parvum* (n=20), *C. hominis* (n=6), *C. felis* (n=1) and *C. meleagridis* (n=1) (Table I). Twenty-five were positive by PCR (Table II). The three PCR-negative samples included one *C. parvum* (that was found positive after a second round of DNA extraction and PCR), one *C. felis* and one *C. meleagridis*. Testing additional *C. felis* and *C. meleagridis* DNA extracts confirmed that both species could not be detected by the multiplex PCR (data not shown). No *Cryptosporidium*-positive PCR was observed among microscopy-negative samples. Hence, analytical sensitivity and specificity of the PCR assay were 96% and 100%, respectively.

Five samples of the reference panel were thought to be positive for *E. histolytica* by the reference method including microscopy and antigen detection by ELISA. Four of these samples were also positive for *E. histolytica* by the multiplex PCR (Table II). Importantly, the remaining sample positive by microscopy but negative by PCR was finally considered as a false positive by microscopy/ELISA (external in-house PCR was positive for *E. dispar* and negative for *E. histolytica*). Interestingly, one sample negative by microscopy was positive by the multiplex PCR assay for *E. histolytica* (also confirmed positive by the external PCR). Of note, 16 out of the 185 samples although negative for *E. histolytica* by microscopy, displayed a slight increase in fluorescence by PCR (mostly below the positivity threshold). No similar phenomenon was noted when DNA extracts were amplified on a LightCycler 480 (Roche).

In all, from this dataset, analytical sensitivity and specificity for *E. histolytica* were 100 and 100 %, respectively. Specificity of the multiplex PCR assay for *E. histolytica* was also confirmed using additional DNA extracts belonging to *E. histolytica* and *E. dispar* (data not shown).

Discussion

As mentioned above, evaluation of multiplex PCR assays in the setting of clinical parasitology is often impaired by the low number of positive samples tested. Sensitivity and specificity of PCR assays previously published in studies including more than 10 positive samples are given in Table III. Compared to the reference methods relying mostly on microscopy, PCR displayed an average sensitivity/specificity of 95/93% and 100/98% for the detection of *G. intestinalis* and *Cryptosporidium* spp., respectively [5-8,10,12,14,15,21]. Considering data from the literature, there is increasing evidence that PCR should be preferred over antigen detection and microscopy for definitive identification of *E. histolytica* [11]. Interestingly, in three studies, an external method was used to confirm “true PCR-positive samples” [7,15,21]. Combining data from these studies revealed sensitivity for *G. intestinalis* and *Cryptosporidium* spp. of 53% and 52% by microscopy compared with 98% and 100% by multiplex-PCR, respectively.

Here, we aimed at evaluating the new multiplex PCR assay G-DiaParaTrio (Diagenode), which targets *G. intestinalis*, *C. parvum*/*C. hominis* and an amoeba species (*E. histolytica*), all representing up to 70% of the gastrointestinal parasites diagnosed every year at our institution. The study design with a multicenter collection of stool samples allowed us to include a large number of positive samples for the pathogens of interest together with several additional parasites to test for possible cross-reactivity. The present study underlines that the G-DiaParaTrio multiplex PCR offers attractive analytical performances, nearly similar to routine parasitological investigation procedures using skilled microscopists.

Unlike microscopy, multiplex PCR coupled with automated DNA extraction is time-saving allowing a reduced turnaround time (24 samples could be processed every 4 hours) and does not require trained microscopists. Nevertheless, microscopy still remains essential to diagnose other parasitic infections involving helminths or other protozoan species such as *Cystoisospora belli* and *Cyclospora cayetanensis* which are not yet included in the PCR assay. Importantly, using a simple extraction method and without mechanical grinding, the G-DiaParaTrio detected efficiently both *C. parvum* and *C. hominis*, two species being responsible for more than 90 % of the cases of human cryptosporidiosis [20]. Unfortunately, since the PCR assay was designed to detect specifically these two species, unusual species such as *C. felis* and *C. meleagridis* were missed, probably because of nucleotide polymorphisms which prevent primers/probes matching to the target sequences. False negative results for rare *Cryptosporidium* species have also been described when using antigen-based detection tests. Although our study was not designed to determine whether PCR could be more sensitive than microscopy as suggested by others [7,15,21], four samples were PCR-positive (three *G. intestinalis* and one *E. histolytica*) but microscopy-negative. Conversely, four samples positive by microscopy for the PCR-targeted parasites were negative by PCR (three *G. intestinalis* and one *C. parvum*). In each case, the parasite load examined by two well-trained microscopists was low, suggesting that a specific attention must be given to fecal swabbing that is probably an essential step as the amount of faeces used for DNA-extraction is lower than the amount necessary for microscopic examination.

Moreover, as microscopy usually does not allow the distinction between nonpathogenic *E. dispar* and *E. histolytica*, the causative agent of amebiasis, multiplex PCR should be considered as a robust alternative to adhesin detection by ELISA that can lead to both false positive and false negative results, as shown here, a finding that could have major clinical consequences for patient management [26-27].

As discussed, a specific attention must be given to the detection of *E. histolytica* when using the G-DiaParaTrio on a Rotor-Gene Q considering that non-specific fluorescent signals can be observed.

In conclusion, the G-DiaParaTrio multiplex PCR assay allows a sensitive detection of the three most common intestinal protozoa found in developed countries [28]. Compared to laboratory routine techniques such as microscopy and ELISA, the multiplex PCR assay offers attractive performances, an optimized turnaround time and is able to make a rapid identification of the pathogenic amoeba *E. histolytica*. Moreover, as suggested by others [10,29,30], the multiplex PCR-assay allows a rapid screening of the more relevant gastrointestinal parasites and, when combined with microscopic detection, should provide a valuable clinical strategy aimed at detecting other intestinal parasites in patients with predisposing factors or clinical signs suggestive of helminth infections such as history of recent travel, eosinophilia, urticaria, impaired immune system or recurrent complaint. Finally, the multiplex PCR can also be advantageously used in non-reference laboratories having limited experience in parasitological stool examination.

Acknowledgements

The authors acknowledge Arnaud Reigner and Christine Bureau for excellent technical assistance. The authors are grateful to Diagenode Diagnostics for providing the commercial kits.

Transparency declaration

The authors declare no conflicts of interest.

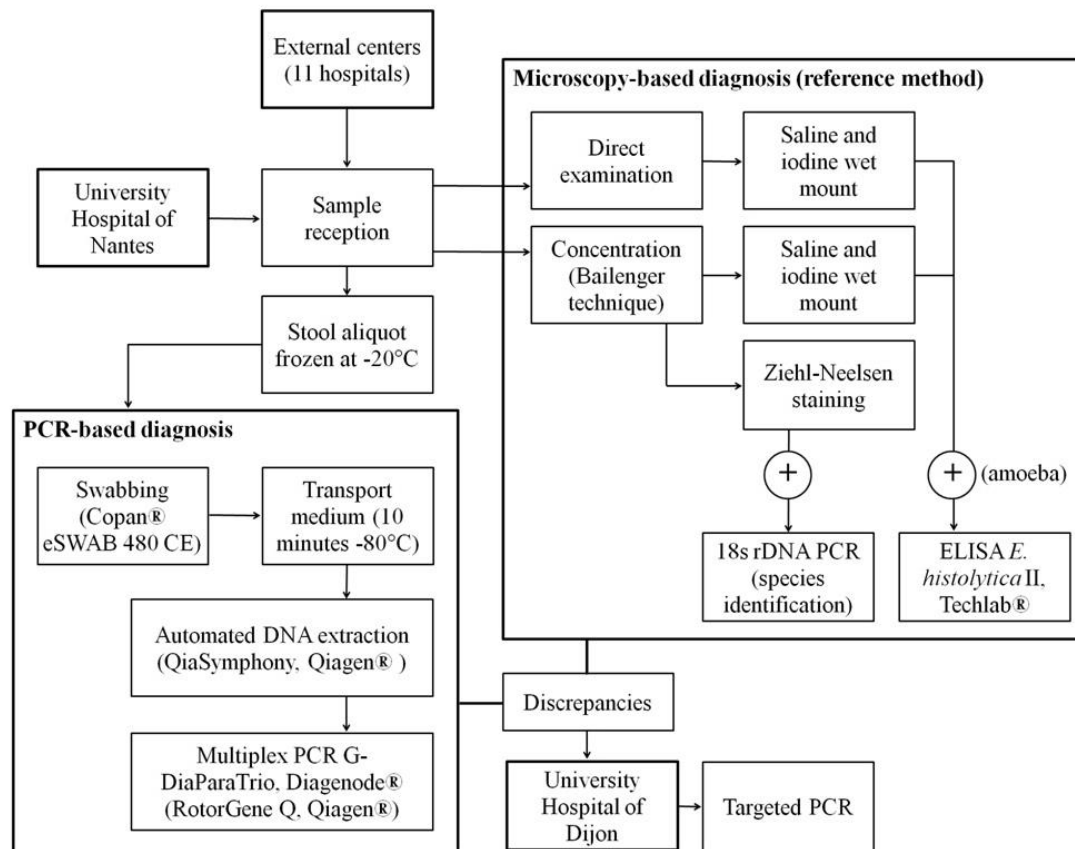
Figure 1. Schematic representation of the study design

Table I. Complete list of the parasites in the reference panel used to evaluate the G-DiaParaTrio multiplex PCR assay

Footnotes: Genus/species displayed in boldface are those targeted by the multiplex PCR assay

Genus/species	Number of samples
<i>Giardia intestinalis</i>	38
<i>Cryptosporidium parvum</i>	20
<i>Cryptosporidium hominis</i>	6
<i>Entamoeba histolytica</i>	5
<i>Entamoeba coli</i>	38
<i>Endolimax nana</i>	21
<i>Blastocystis hominis</i>	15
<i>Entamoeba dispar</i>	12
<i>Entamoeba hartmanni</i>	4
<i>Schistosoma mansoni</i>	4
<i>Iodamoeba butschlii</i>	3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	3
<i>Hymenolepis nana</i>	2
<i>Chilomastix mesnili</i>	2
<i>Cystoisospora belli</i>	2
Hookworms	2
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	1
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	1
<i>Cryptosporidium felis</i>	1
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	1
<i>Pentatrichomonas intestinalis</i>	1
<i>Trichuris trichiura</i>	1
<i>Taenia</i> sp.	1
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1
<i>Sarcocystis hominis</i>	1

Table II. Performances of the multiplex PCR assay for the detection of *G. intestinalis*, *C. parvum/C. hominis* and *E. histolytica*

Footnotes: “Microscopy” refers to the findings of the reference panel.

^aSamples positive for *C. felis* and *C. meleagridis* were not considered as not targeted by the PCR assay.

^bThese samples were confirmed positive for *G. intestinalis* by the external PCR assay.

^cWhen tested on a second round of DNA extraction and PCR, this sample was positive by multiplex PCR.

^dThis sample was finally considered be a false-positive of the ELISA assay (external PCR positive for *E. dispar*).

^ePositivity for *E. histolytica* was confirmed by the external PCR assay.

Pathogens of interest	Positive by both microscopy and PCR	Positive by microscopy but negative by PCR	Negative by microscopy but positive by PCR	Negative by both microscopy and PCR	Sensitivity	Specificity
<i>G. intestinalis</i>	35	3	3 ^b	144	92%	100%
<i>C. parvum/C. hominis</i> ^a	25	1 ^c	0	159	96%	100%
<i>E. histolytica</i>	4	1 ^d	1 ^e	180	100%	100%

Table III. Literature review of the performances of multiplex PCR based-methods for the diagnosis of *G. intestinalis*, *C. parvum*/*C. hominis* and *E. histolytica* from stool specimens

Footnotes: Sensitivities and specificities of the PCR-driven approach compared to the reference method have been determined from the published dataset, when available and for studies including at least 10 positive samples.

NA: not available; ND: not determined; “+” refer to positive detection; “-” refer to negative detection; Se: Sensitivity; Sp: Specificity; Prosp.: Prospective; Retrospective: Retrospective

References	PCR method	Study design	Parasites	Results obtained by the reference method / PCR respectively				Se (%)	Sp (%)	Notes
				+/+	-/-	+/-	-/+			
[19]	fast-track Diagnostics FTD Stool parasites	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	23	NA	0	19	100	ND	
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	NA	1	1	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	0	NA	1	1	ND	ND	
[21]	Genetic signatures EasyScreen	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	19	334	0	5	100	98.5	No distinction between <i>E. histolytica</i> and <i>E. dispar</i>
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	5	349	0	4	ND	ND	
			<i>Entamoeba</i> spp.	18	336	0	4	100	98.8	
Simons A <i>et al.</i> , 29th Clinical Virology Symposium, Abstr 71, USA	R-Biopharm RIDAGENE Parasite Stool Panel	Retrospective	<i>Giardia intestinalis</i>	25	179	1	13	96.1	93.2	Protocol used for microscopy not available
			<i>C. parvum</i>	17	190	0	11	100	94.5	
			<i>E. histolytica</i>	18	142	47	11	ND	ND	
		Retrospective	<i>Giardia intestinalis</i>	38	178	2	0	95	100	PCR used as the reference method
			<i>C. parvum</i>	27	189	1	1	96.4	99.5	
			<i>E. histolytica</i>	29	189	0	0	100	100	
[15]	Diagenode G-DiaPara	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	11	601	1	18	91.7	97.1	
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	1	628	0	2	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	0	631	0	0	ND	ND	
[18]	Luminex xTAG GPP	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	7	172	0	6	ND	ND	
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	185	0	0	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	1	183	0	1	ND	ND	

[17]	Luminex xTAG GPP	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	9	384	0	0	ND	ND	PCR was used as the reference method
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	3	389	1	0	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	1	387	0	5	ND	ND	
[4]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	17	49	3	11	85	81.7	Antigen detection (TechLab) used as the reference method
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	17	55	4	4	80.9	93.2	
			<i>E. histolytica</i>	8	66	5	9	61.5	88	
[5]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	23	274	0	103	100	72.7	No concentration step before microscopy
			<i>C. parvum/hominis</i>	0	379	0	21	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	0	390	6	4	ND	ND	
[16]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	9	865	0	15	ND	ND	Protocol used for microscopy not available
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	873	0	16	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	1	885	0	3	ND	ND	
[6]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	40	654	1	27	97.6	96	
			<i>C. parvum/hominis</i>	0	686	0	36	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	0	722	0	0	ND	ND	
[7]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	14	444	0	14	100	96.9	
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	5	463	0	4	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	7	449	12	4	ND	ND	
[8]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	95	2442	0	54	100	97.8	Detection of <i>E. histolytica</i> ensured by ELISA (ProSpecT, Remel)
			<i>C. parvum/hominis</i>	12	2560	0	19	100	99.3	
			<i>E. histolytica</i>	6	2577	1	7	ND	ND	
[9]	In-house	Retrosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	48	73	6	2	92.3	97.4	Antigen detection (TechLab) used as the reference method
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	28	98	3	0	90.3	100	
			<i>E. histolytica</i>	36	88	6	2	85.7	97.8	
[10]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	28	352	1	16	96.5	95.6	
			<i>C. parvum/hominis</i>	2	394	0	1	ND	ND	
			<i>E. histolytica</i>	1	396	0	0	ND	ND	
[11]	In-house	Retrosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	20	85	0	0	100	100	
			<i>C. parvum/hominis</i>	20	85	0	0	100	100	
			<i>E. histolytica</i>	20	85	0	0	100	100	

[12]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	85	416	36	61	70.2	87.2
			<i>C. parvum/hominis</i>	4	583	0	11	ND	ND
			<i>E. histolytica/dispar</i>	8	554	35	1	18.6	99.8
[13]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	2	211	0	12	ND	ND
			<i>C. parvum/hominis</i>	0	225	0	0	ND	ND
			<i>E. histolytica</i>	0	219	2	4	ND	ND
[14]	In-house	Prosp.	<i>Giardia intestinalis</i>	65	670	1	8	98	99
			<i>Cryptosporidium</i> spp.	2	562	0	3	ND	ND
			<i>E. histolytica</i>	3	564	0	0	ND	ND

References

1. Francis J, Barrett SP, Chiodini PL. Best Practice No 174. Best practice guidelines for the examination of specimens for the diagnosis of parasitic infections in routine diagnostic laboratories. *J Clin Pathol* 2003;56(12):888-891.
2. McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2014;52(3):712-720.
3. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(2):371-418.
4. Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, *et al.* A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *J Clin Microbiol* 2013;51(2):472-480.
5. Mejia R, Vicuña Y, Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, *et al.* A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *Am J Trop Med Hyg* 2013;88(6):1041-1047.
6. Hove R Ten, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, Van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiol Infect* 2007;13(10):1001-1007.
7. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JLN, Stanley K, Roberts T, Marriott D, *et al.* Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J Clin Microbiol* 2011;49(1):257-262.
8. Hove RJ ten, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(9):1045-1053.
9. Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman SMM, Mondal D, *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76(4):713-717.
10. Bruijnesteijn van Coppenraet LES, Wallinga JA, Ruijs GJHM, Bruins MJ, Verweij JJ. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(9):869-874.
11. Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienens EAT, van Rooyen MAA, *et al.* Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):1220-1223.

12. Nazeer JT, Sayed Khalifa K El, von Thien H, El-Sibaei MM, Abdel-Hamid MY, Tawfik RAS, et al. Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. *Parasitol Res* 2013;112(2):595-601.
13. Basuni M, Mohamed Z, Ahmad M, Zakaria NZ, Noordin R. Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR. *Trop Biomed* 2012;29(3):434-442.
14. Svraka-Latifovic S, Bouter S, Naus H, Bakker LJ, Timmerman CP, Dorigo-Zetsma JW. Impact of transition from microscopy to molecular screening for detection of intestinal protozoa in Dutch patients. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(11):O969-971.
15. Van Lint P, Rossen JW, Vermeiren S, Ver Elst K, Weekx S, Van Schaeren J, et al. Detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in clinical stool samples by using multiplex real-time PCR after automated DNA isolation. *Acta Clin Belg* 2013;68(3):188-1892.
16. Stensvold CR, Nielsen HV. Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *J Clin Microbiol* 2012;50(2):540-541.
17. Wessels E, Rusman LG, van Bussel MJ, Claas EC. Added value of multiplex Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG® GPP) testing in the diagnosis of infectious gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(3):O182-187.
18. Zboromyrska Y, Hurtado JC, Salvador P, Alvarez-Martínez MJ, Valls ME, Mas J, et al. Aetiology of traveller's diarrhoea: evaluation of a multiplex PCR tool to detect different enteropathogens. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(10):O753-759.
19. McAuliffe GN, Anderson TP, Stevens M, Adams J, Coleman R, Mahagamasekera P, et al. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. *J Infect* 2013;67(2):122-129.
20. ANOFEL *Cryptosporidium* National Network. Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006-2009. *Euro Surveill* 2010;15(33):19642.
21. Stark D, Roberts T, Ellis JT, Marriott D, Harkness J. Evaluation of the EasyScreen™ enteric parasite detection kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78(2):149-152.
22. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, et al. Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2015;53(3):915-925.
23. Limor JR, Lal AA, Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2335-2338.

24. Agnamey P, Sarfati C, Pinel C, Rabodoniriina M, Kapel N, Dutoit E, *et al.* Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: a blind multicenter trial. J Clin Microbiol 2011;49(4):1605-1607.
25. Stark D, van Hal S, Fotedar R, Butcher A, Marriott D, Ellis J, *et al.* Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. J Clin Microbiol 2008;46(5):1678-1681.
26. Verkerke HP, Hanbury B, Siddique A, Samie A, Haque R, Herbein J, *et al.* Multisite clinical evaluation of a rapid test for *Entamoeba histolytica* in stool. J Clin Microbiol 2015;53(2):493-497.
27. Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. Clin Microbiol Rev 2012;25(3):420-449.
28. van Lieshout L, Roestenberg M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. Clin Microbiol Infect 2015;21(6):520-528.
29. Verweij JJ. Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. Parasitology 2014;141(14):1863-1872.

PARTIE III : DISCUSSION

Le développement des PCR multiplex est en phase de faire évoluer, du moins en partie, la façon d'appréhender le diagnostic microbiologique, que ce soit en bactériologie, en virologie ou en parasitologie. Ces nouvelles techniques semblent offrir une alternative séduisante aux méthodes d'analyse traditionnelles, souvent plus compliquées à mettre en œuvre et souffrant parfois d'un manque de sensibilité. Toutefois, la recherche ciblée de certains pathogènes ne fait que renforcer l'importance du rôle du biologiste médical dans la phase pré-analytique et post-analytique de l'examen biologique.

Depuis plus de 300 ans, la microscopie représente la pierre angulaire de l'examen parasitologique des selles. Amélioré par de multiples techniques de concentration et de coloration, cet examen reste actuellement considéré comme le *gold standard*. Le remplacement de ces méthodes d'analyse par une PCR multiplex représente un véritable défi. De nombreuses études se sont attachées à démontrer la supériorité de la PCR multiplex en terme de performances analytiques mais la faible prévalence des parasites intestinaux dans les pays industrialisés entrave toutefois la constitution de panels d'échantillons positifs conséquents et limite ainsi la portée de nombreux travaux. Malgré cette limitation, la PCR multiplex semble aujourd'hui offrir une alternative crédible aux techniques microscopiques et aux tests de détection antigénique.

L'objectif de notre étude a été d'évaluer les performances analytiques de la PCR multiplex commerciale G-DiaParaTrio (Diagenode®) sur un vaste panel d'échantillons cliniques constitué grâce à un recueil multicentrique. Le kit Diagenode®, couplé à une extraction automatisée, affiche des performances au moins équivalentes à celles des techniques de référence mises en œuvre dans des conditions optimales (opérateurs multiples et expérimentés). Si nos résultats vis-à-vis de l'amibe *E. histolytica* doivent être relativisés en raison du faible nombre d'échantillons positifs, l'avantage de la PCR par rapport aux tests de détection antigénique semble décisif pour ce pathogène. Nous n'avons pas noté de phénomènes d'inhibition de PCR significatifs au cours de notre étude. L'homogénéisation du prélèvement, avant l'écouvillonnage calibré, est probablement essentielle. Ceci pourrait expliquer certaines variations observées dans les résultats de la PCR (PCR initialement négative pour la recherche de *C. parvum/hominis*, positive après une nouvelle extraction).

Comme nous l'avons démontré à travers notre revue de la littérature et l'évaluation du kit Diagenode®, la phase analytique de l'examen parasitologique des selles peut aujourd'hui être assumée par la mise en œuvre d'une PCR multiplex. Il incombe alors au biologiste de choisir les panels de parasites recherchés et les techniques complémentaires éventuellement requises, en fonction du contexte clinique et/ou épidémiologique. L'utilisation des PCR multiplex doit aller de paire avec un renforcement du dialogue clinico-biologique, sous peine de ne pas détecter le ou les pathogène(s) responsable(s) de la symptomatologie observée.

Avantages et inconvénients des différentes techniques :

La microscopie reste l'examen de première ligne pour la recherche des parasites intestinaux. Cette technique permet, grâce à de nombreuses colorations spécifiques, la détection exhaustive des différents parasites intestinaux et apparaît ainsi indispensable. Toutefois, la faible prévalence de ces pathogènes dans les pays développés rend difficile le maintien d'une solide expertise dans les laboratoires. La faible proportion d'échantillons positifs entraîne en effet inévitablement une diminution du savoir-faire (van Lieshout and Roestenberg 2015)(McHardy *et al.* 2014). Les performances de la microscopie étant dépendantes de l'œil du microscopiste, ce constat est réellement problématique. S'il est vrai que le coût des méthodes basées sur la microscopie est relativement peu élevé, il faut toutefois pondérer ce constat par le coût du temps technique (van Lieshout and Roestenberg 2015). Les prescriptions d'EPS étant nombreuses, avec les migrations humaines actuelles (touristiques ou humanitaires), mais aussi du fait du regroupement des laboratoires, le faible débit de réalisation de l'EPS peut retarder significativement le rendu des résultats (Yansouni *et al.* 2014). Ce faible débit peut également rendre difficile la réalisation optimale de l'EPS, qui doit idéalement être effectué sur des selles fraîchement émises.

La PCR multiplex offre de bonnes performances analytiques pour un temps technique très réduit (Vasoo and Pritt 2013). L'automatisation de la technique, avec l'intégration de contrôles (témoin d'extraction, contrôles positifs et négatifs), permet en outre une mise en place facilitée du processus d'assurance qualité rendu indispensable par la norme d'accréditation ISO 15189. Toutefois la PCR multiplex, ciblée sur certaines espèces parasitaires, ne peut remplacer à l'heure actuelle la microscopie pour la détection de certains parasites comme les helminthes (van Lieshout and Roestenberg 2015)(Bruijnesteijn van Coppenraet *et al.* 2009).

Tableau XX : Avantages et inconvénients des méthodes microscopiques et de la PCR multiplex (adapté de Vasoo and Pritt 2013)

PCR multiplex		Microscopie	
Points positifs	Points négatifs	Points positifs	Points négatifs
• Bonnes performances analytiques (sensibilité, spécificité) • Limitation du temps technique et travail en série (automatisation) • Différencie les espèces morphologiquement identiques (<i>Entamoeba</i> spp.)	• Absence de standardisation (extraction, amplification, détection, etc.) • Faible nombre de kits commercialisés (CE-IVD) • Présence d'inhibiteurs de PCR • Coût élevé • Sensibilité potentiellement trop élevée (pas de significativité clinique)	• Exhaustivité de la recherche de parasites (protozoaires, helminthes, champignons) • Mise en œuvre relativement simple et peu coûteuse	• Faible sensibilité (nécessitant prélèvements multiples et technique(s) de concentration) • Temps technique important • Forte expérience requise

• Quelles espèces parasitaires faut-il cibler ?

Les PCR multiplex développées pour la coprologie parasitaire ciblent principalement les protozoaires les plus fréquemment impliqués dans les pays industrialisés : *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp., *Dientamoeba fragilis* et *Blastocystis hominis* (van Lieshout and Roestenberg 2015)(McHardy *et al.* 2014). Si la prévalence d'*E. histolytica* est faible, sa pathogénicité potentielle justifie toutefois une détection spécifique (van Lieshout and Roestenberg 2015). Le choix de la détection de *D. fragilis* et *B. hominis* est plus discutable, l'action pathogène de ces protozoaires étant encore controversée (Wawrzyniak *et al.* 2013)(Johnson *et al.* 2004).

Au CHU de Nantes, ces protozoaires représentent la majorité des parasites intestinaux détectés par l'examen parasitologique des selles. La figure 35 présente la distribution des parasites gastro-intestinaux identifiés au laboratoire de Parasitologie/Mycologie du CHU de Nantes sur la période de recueil de notre étude (18 mois). Les quatre protozoaires ciblés par la PCR G-DiaParaTrio (*G. intestinalis*, *C. parvum/hominis* et *E. histolytica*) représentent 40% des échantillons positifs. Notons que les amibes considérées comme non pathogènes (*E. dispar*, *E. coli*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii*) sont retrouvées dans 30% des échantillons de ce panel. D'autre part, 19% des échantillons présentent une positivité pour une espèce parasitaire dont la pathogénicité pourrait être discutée (*D. fragilis*, *B. hominis*, *Sarcocystis hominis*, *Dicrocoelium dendriticum*).

Enfin, 11% des échantillons sont positifs pour des espèces pathogènes non détectable par la PCR-multiplex : *Cryptosporidium felis*, *Schistosoma* sp. et ankylostomidés (*Ancylostoma duodenale* et/ou *Necator americanus*).

Dans ces conditions, une PCR multiplex ciblant *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *D. fragilis* et *B. hominis* permettrait, en négligeant les amibes non pathogènes, la détection de 82% des parasites. Ce chiffre démontre l'intérêt potentiel d'une PCR multiplex détectant ce panel de parasites (Stark *et al.* 2014).

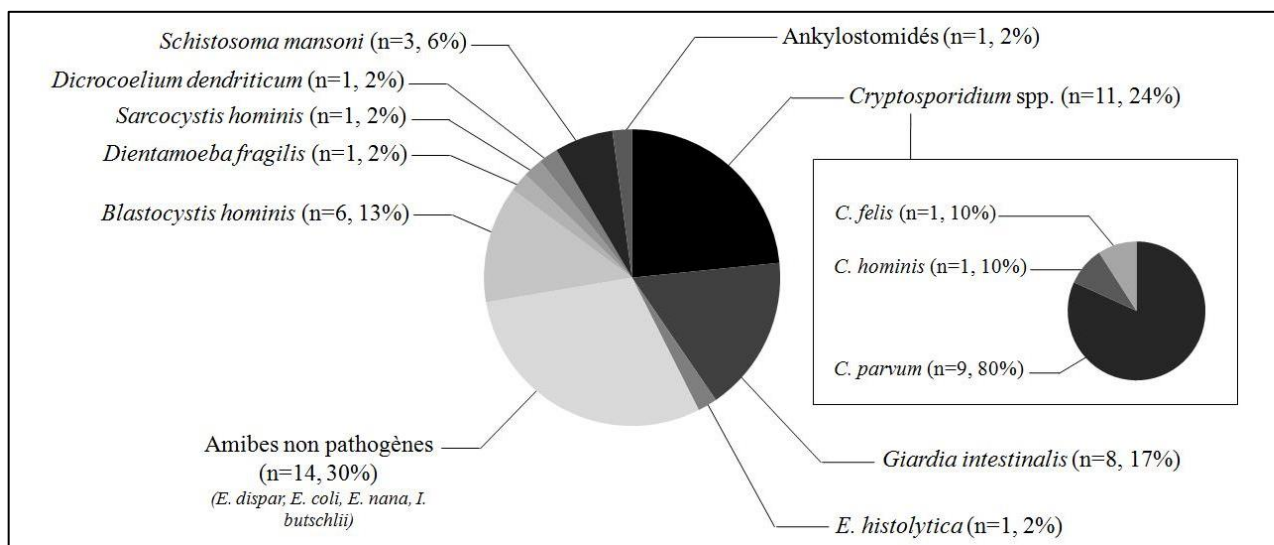


Figure 35 : Répartition des espèces parasitaires (protozoaires et helminthes) identifiées durant la période de notre étude (18 mois) au CHU de Nantes

Nous le constatons, la PCR multiplex G-DiaParaTrio, comme les autres kits actuellement commercialisés, ne possède pas le potentiel pour remplacer totalement la microscopie. L'utilisation des méthodes traditionnelles reste indispensable pour certains protozoaires, comme *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, ou encore les espèces rares de *Cryptosporidium* qui représentent une part non négligeable des espèces impliquées dans la cryptosporidiose humaine notamment chez les immunodéprimés (ANOFEL *Cryptosporidium* National Network 2010). Les helminthes, plus rarement impliqués, nécessitent également l'apport de la microscopie et/ou de techniques de détection spécifiques (Baermann). Il en est de même pour d'autres pathogènes opportunistes telles que les microsporidies (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*).

Ces espèces ont une faible prévalence et sont donc rarement mises en évidence. Toutefois, leur importance clinique incontestable nécessite absolument leur détection (Yansouni *et al.* 2014).

Notons que des techniques de PCR ont été développées pour la détection d'un très grand nombre d'helminthes (nématodes, trématodes et cestodes), de protozoaires et de microsporidies (Vasoo and Pritt 2013)(Verweij and Stensvold 2014). La grande majorité de ces PCR n'est toutefois pas adaptée à la pratique clinique.

Certaines PCR multiplex associent la recherche des protozoaires « courants » avec certains nématodes tels que les ankylostomides, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis* (Mejia *et al.* 2013)(Liu *et al.* 2013). D'autres PCR multiplex ont été conçues afin de détecter exclusivement des helminthes (Basuni *et al.* 2011)(Le *et al.* 2012).

• Comment appliquer la PCR multiplex dans la routine du laboratoire ?

L'application de la PCR multiplex dans l'activité de routine du laboratoire peut réduire fortement la nécessité de recourir à la microscopie (Yansouni *et al.* 2014). Il est cependant nécessaire d'employer un algorithme décisionnel, basé sur le contexte clinique et/ou épidémiologique, afin de mettre en œuvre des analyses complémentaires si nécessaire. Il est ainsi utile de définir des populations de patients pouvant potentiellement être infestés par des parasites non ciblés par la PCR multiplex. Le tableau XXI présente différents critères définissant la nécessité de recourir à la microscopie (Bruijnesteijn van Coppenraet *et al.* 2009).

Tableau XXI : Eléments d'orientation pour la réalisation d'un EPS par microscopie (Bruijnesteijn van Coppenraet *et al.* 2009)

Facteurs de risque (≥ 1)
• Recherche spécifique selon contexte • Hyperéosinophilie • Hypergammaglobulinémie IgE (>120 UI/mL) • Urticaire • Voyage récent en zone intertropicale • Bilan d'adoption • Immunodépression • Symptômes récurrents (>2 mois) malgré PCR multiplex négative

La figure 36 représente un algorithme décisionnel permettant l'application de la PCR multiplex G-DiaParaTrio en première ligne dans la routine du laboratoire de parasitologie. Dans certaines situations cliniques, des examens complémentaires sont réalisés en seconde intention. L'interaction entre le biologiste et le clinicien est alors essentielle pour optimiser et orienter les modalités de la phase analytique.

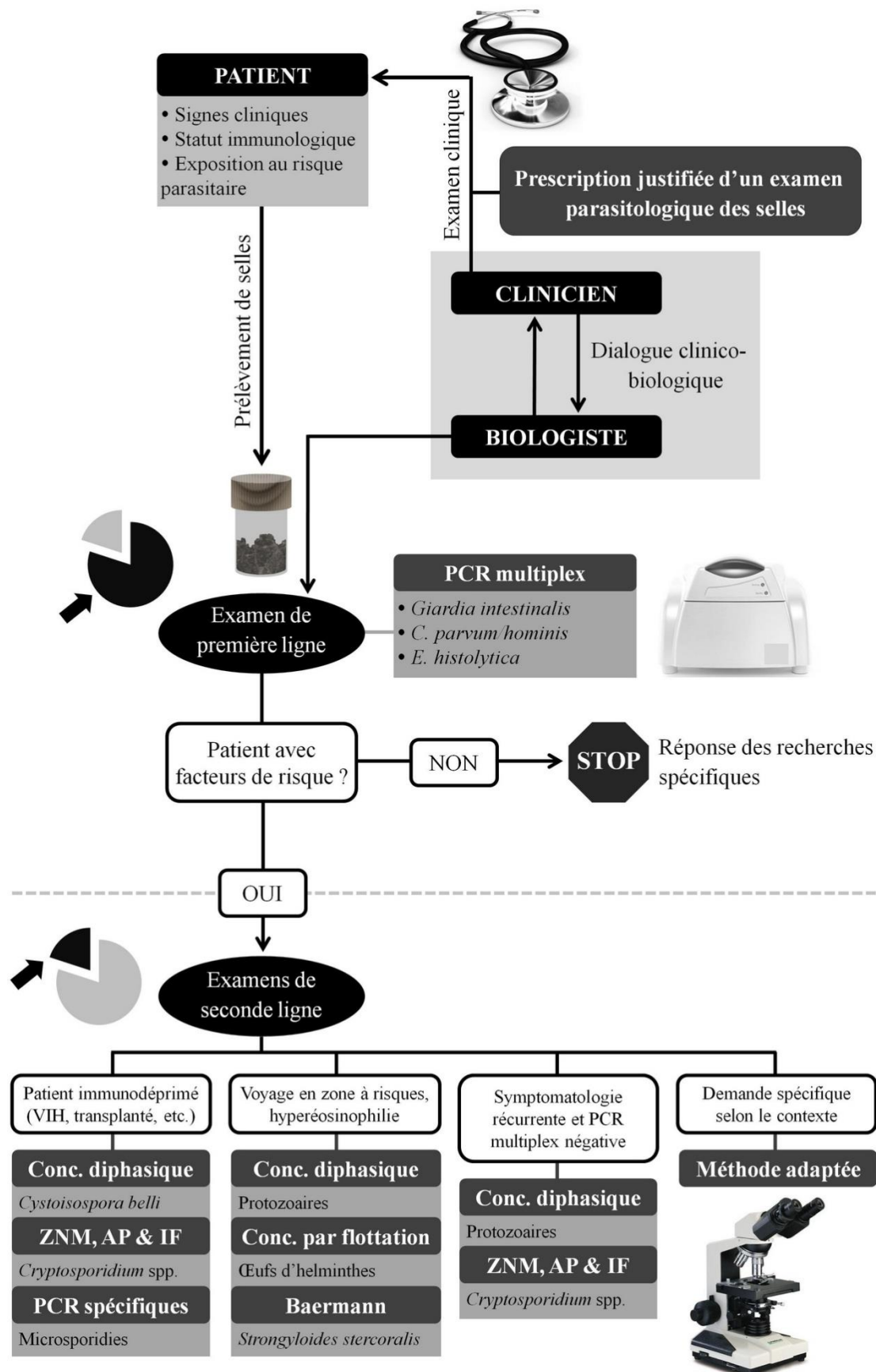


Figure 36 : Exemple d'un algorithme pour l'intégration de la PCR multiplex G-DiaParaTrio (Diagenode®) dans le diagnostic parasitologique des selles (ZNM : coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, AP : auramine-phénol, IF : immunofluorescence)

Il est probable que le développement des PCR multiplex conduise à la mise au point de kits permettant la détection de panels d'espèces parasitaires de plus en plus étendus. Il est toutefois difficile d'imaginer que ces technologies puissent être exhaustives. D'autre part, il paraît peu judicieux d'effectuer un *screening* complet des espèces parasitaires sur l'ensemble des prélèvements de selles envoyés au laboratoire. *A contrario*, le développement de différents panels, cohérents avec un contexte clinique donné, permettrait de choisir la PCR multiplex (et les espèces parasitaires ciblées) adaptée à chaque patient. Si les kits actuellement commercialisés (dont G-DiaParaTrio) ciblent les espèces les plus prévalentes, d'autres PCR multiplex «maison» ciblent déjà des panels rencontrés dans des situations clinique précises, comme l'immunodépression ou le voyage en zone d'endémie (Rubio *et al.* 2014)(Lee *et al.* 2010)(Basuni *et al.* 2011).

Le défi consiste alors à définir les panels de parasites et les situations cliniques correspondantes. En voici quelques propositions (les facteurs de risque sont définis dans le tableau XXI) :

- **Diarrhée sans « facteurs de risque parasitaire »** : *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*
- **Diarrhée au retour d'une zone à risque sans hyperéosinophilie** : *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*, *Cyclospora cayetanensis*, (*Cystoisospora belli*)
- **Diarrhée au retour d'une zone à risque avec hyperéosinophilie (& forte suspicion de nématodose/schistosomose)**: idem précédent + *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma* spp.
- **Diarrhée dans un contexte d'immunodépression (VIH, greffe)** : *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Cystoisospora belli*
- **Suspicion d'helminthiase endémique (distomatose ou cestodose)** : *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Hymenolepis nana*, *Fasciola* spp.

En cas de négativité des PCR multiplex et en présence d'une forte présomption clinique, il sera nécessaire de recourir aux techniques de microscopie afin de permettre la détection potentielle d'espèces parasitaires non ciblées par la biologie moléculaire (dans notre exemple : *Sarcocystis hominis*, *Balantidium coli*, douves intestinales, etc...). L'envoi du prélèvement s'effectuerait alors vers un laboratoire spécialisé (CHU), centralisant ces recherches spécifiques et maintenant un très haut niveau d'expertise dans le domaine du diagnostic microscopique.

La figure 37 schématise cette vision du diagnostic parasitologique des selles dans les années à venir.

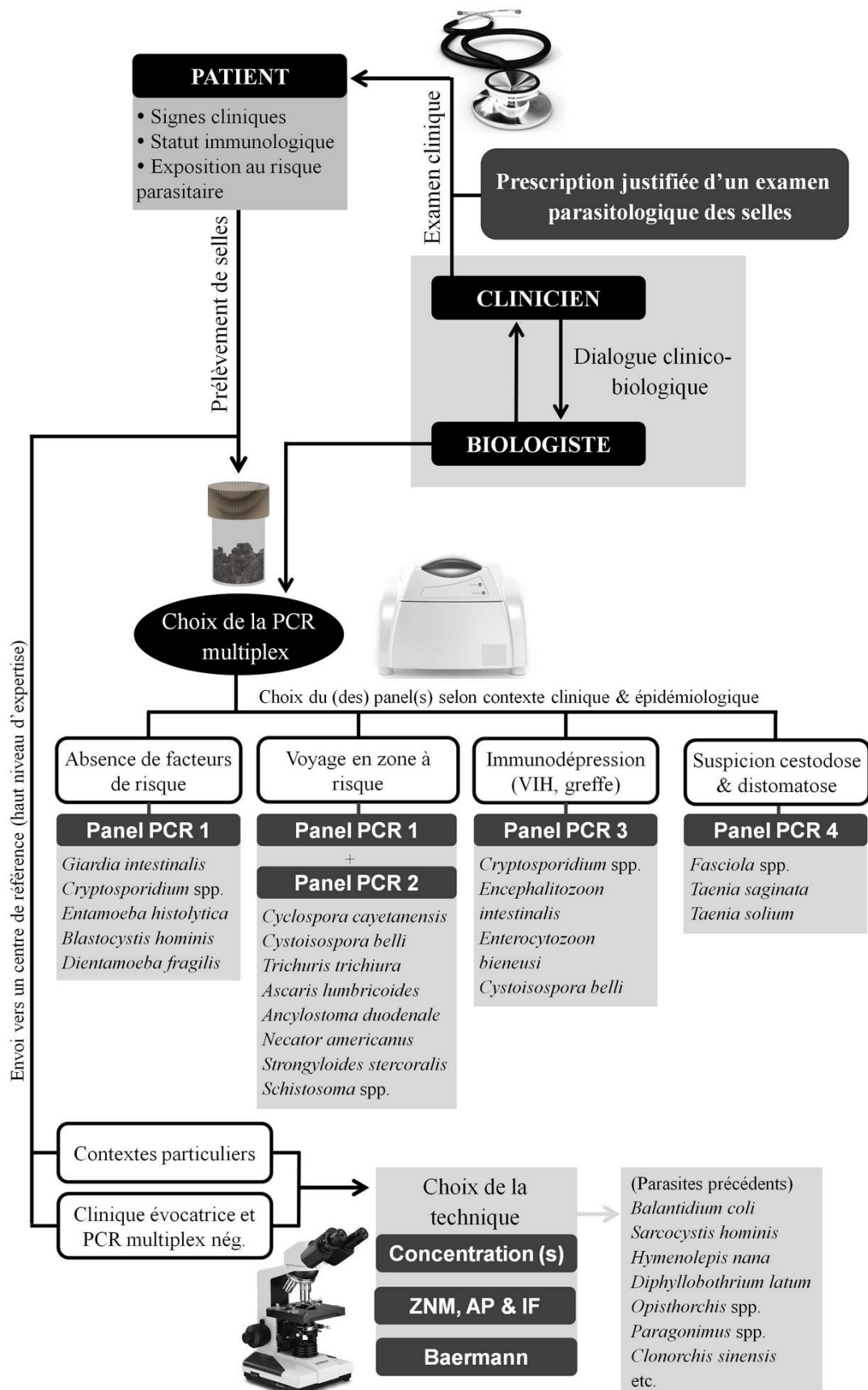


Figure 37 : Algorithme intégrant différentes PCR multiplex « ciblées » dans le diagnostic parasitologique des selles (ZNM : coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, AP : auramine-phénol, IF : immunofluorescence)

Le développement de PCR multiplex commerciales destinées à la détection de parasites intestinaux permet aujourd'hui l'intégration de cette technologie au diagnostic parasitologique des selles. L'utilisation d'une PCR multiplex en première ligne permet de réduire significativement la nécessité de recourir aux techniques basées sur l'examen microscopique, techniques nécessitant un temps technique conséquent et dont les performances sont variables selon l'expérience de l'opérateur. **Le kit G-DiaParaTrio (Diagenode Diagnostics®), utilisé en combinaison avec une extraction automatisée, offre des performances analytiques à même de justifier son utilisation dans la routine du laboratoire.** Un algorithme décisionnel doit alors permettre de cibler les échantillons pour lesquels l'analyse par microscopie reste nécessaire.

Dans le futur, de nombreuses PCR multiplex seront disponibles, offrant des panels de pathogènes étendus et variés. Le biologiste, en lien avec le clinicien prescripteur, devra alors définir les espèces parasitaires à rechercher en fonction des différents contextes cliniques, et savoir appréhender la significativité clinique des résultats de la PCR.

Il sera indispensable d'entretenir l'expertise dans le domaine de la microscopie, car si l'utilisation de ces techniques régressera sans doute, elles resteront probablement toujours indispensables.

ANNEXES

ANNEXE I : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude d'évaluation de la PCR multiplex G-DiaParaTrio (échantillons positifs)

n°	Enregistrement	Centre	Méthodes références				PCR multiplex (Ct)			Séquençage
			<i>Giardia</i>	<i>Crypto</i>	<i>histo</i>	autres	<i>Giardia</i>	<i>Crypto</i>	<i>histo</i>	
P01	131441475	Nantes	0	0	0	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	0	0	0	<i>C. hominis</i>
P02	131631510	Nantes	1	0	0	0	28,2	0	0	
P03	1306311001001	APHP (Mondor)	0	1	0	0	0	29,8	0	
P04	1306102197	Nice	1	0	0	<i>E. dispar</i>	18,7	0	0	
P05	131700705	Nantes	1	0	0	0	17,6	0	0	
P06	2131723911	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>E. coli, B. hominis</i>	0	0	0	<i>C. parvum</i>
P07	1306367601	APHP (Mondor)	0	0	0	<i>E. bienewisi</i>	0	0	0	
P08	131861665	Nantes	1	0	0	<i>B. hominis</i>	18,6	0	0	
P10	131870242	Nantes	0	1	0	0	0	28,7	0	
P11	132040263	Nantes	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P12	2132010961	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>E. coli, E. nana</i>	0	0	0	<i>C. parvum</i>
P13	2132062211	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>E. coli, E. dispar</i>	0	0	0	
P14	132060813	Nantes	0	1	0	0	0	28	0	
P15	132131687	Nantes	1	0	0	0	21,7	0	0	
P16	132140278	Nantes	0	0	0	<i>B. hominis</i>	0	0	0	
P17	2021711	NCN (NANTES)	1	0	0	0	0	0	0	<i>C. hominis</i>
P18	132200226	Nantes	0	1	0	0	0	29,4	0	
P19	132212143	Nantes	0	0	0	<i>E. coli, E. nana</i>	0	0	0	
P22	404073665	NCN (NANTES)	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P23	13110779	Tours	0	0	0	<i>B. hominis</i>	0	0	0	
P24	131343	Poitiers	0	0	0	<i>E. nana, H. nana</i>	0	0	0	<i>C. meleagridis</i>
P25	13110862	Tours	0	1	0	0	0	0	0	
P26	2132313641	Tours	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P27	1506682	NCN (NANTES)	1	0	0	0	24,8	0	0	
P28	132330460	Nantes	0	0	0	<i>E. coli, B. hominis</i>	0	0	0	
P29	829	Montpellier	0	0	0	<i>E. coli, E. nana</i>	0	0	0	<i>C. meleagridis</i>
P31	13111290	Tours	1	0	0	<i>E. coli, E. nana</i>	0	0	0	
P32	132391117	Nantes	0	0	0	<i>S. mansoni</i>	0	0	0	

P33	1309174596	Nancy	0	0	0	<i>B. hominis</i>	0	0	0	
P34	1309174622	Nancy	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P35	1309021659	Nice	1	0	0	0	28,2	0	0	
P36	1309021227	Nice	0	1	0	0	0	0	0	<i>C. parvum</i>
P37	2132280701	Clermont-Ferrand	0	1	0	0	0	27,6	0	<i>C. parvum</i>
P39	1309021658	Montpellier	0	1	0	0	0	25,9	0	<i>C. parvum</i>
P40	713350281	Bichat	0	1	0	0	0	22,8	0	<i>C. hominis</i>
P41	713220463	Bichat	0	0	0	<i>B. hominis</i>	0	0	0	
P42	713220432	Bichat	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P43	713250492	Bichat	0	0	0	<i>S. mansoni</i>	0	0	0	
P44	713260421	Bichat	1	0	0	<i>E. coli</i>	22,5	0	0	
P45	713240520	Bichat	0	0	0	<i>E. coli, E. dispar</i>	0	0	0	
P46	9174729	Nancy	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P47	713220469	Bichat	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P49	713210092	Bichat	0	0	0	<i>E. coli</i>	30,5	0	0	
P52	713330415	Bichat	0	1	0	0	0	29,7	0	<i>C. parvum</i>
P53	713260401	Bichat	0	0	0	<i>E. dispar</i>	0	0	0	
P54	713320223	Bichat	0	0	0	<i>E. coli, E. nana, C. mesnili</i>	0	0	0	
P55	713290402	Bichat	1	0	0	0	19,7	0	0	
P57	713320266	Bichat	1	0	0	0	28,9	0	0	
P59	713320224	Bichat	1	0	0	0	30,4	0	0	
P60	662774879	Nancy	0	0	0	<i>E. coli, E. dispar, E. hartmanni</i>	0	0	0	
P61	662771149	Nancy	0	1	0	<i>B. hominis</i>	0	27,6	0	<i>C. parvum</i>
P62	132591405	Nantes	0	0	0	<i>E. coli, E. dispar, E. hartmanni, B. hominis, P. intestinalis</i>	0	0	0	
P63	132592306	Nantes	0	0	0	<i>E. coli, I. butschlii</i>	0	0	0	
P64	3560941	Dijon	0	1	0	0	0	32,7	0	<i>C. parvum</i>
P65	13111894	Tours	1	0	0	<i>E. coli, I. butschlii</i>	28,6	0	0	
P66	13112341	Tours	1	0	0	0	27,6	0	0	
P67	13111819	Tours	1	0	0	0	26,8	0	0	
P68	13112247	Tours	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	

P69	1309202711	Nice	0	1	0	0	0	26,7	0	<i>C. hominis</i>
P70	3-262-1334	Dijon	0	1	0	0	0	31,6	0	<i>C. parvum</i>
P71	13112861	Tours	1	0	0	0	15	0	0	
P72	13112794	Tours	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P73	3-269-1734	Dijon	1	0	0	0	22,9	0	0	
P74	3045208	NCN	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P75	1309174854	Nancy	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P76	1309174866	Nice	1	0	0	0	22,4	0	0	
P77	2132815651	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P78	132840307	Nantes	1	0	0	0	21,6	0	0	
P79	132870432	Nantes	1	0	0	0	21,4	0	0	
P80	2023919	NCN (NANTES)	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P81	132912005	Nantes	0	0	1	0	0	0	34,2	
P82	213290021	Clermont-Ferrand	0	1	0	0	0	23,1	0	<i>C. parvum</i>
P83	13114148	Tours	0	0	0	<i>E. coli, E. nana, H. nana</i>	28,1	0	0	
P86	1515870	NCN (NANTES)	1	0	0	0	17,5	0	0	
P88	213308428	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P89	135441483	Angers	1	0	0	<i>I. belli</i>	0	0	0	
P90	1311050631	Angers	0	1	0	0	0	28	0	<i>C. parvum</i>
P91	4078848	NCN (NANTES)	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P92	1309175061	Nancy	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P94	8058618	NCN (NANTES)	1	0	0	0	29,2	0	0	
P95	7167396	NCN (NANTES)	1	0	0	0	25	0	0	
P96	2133212141	Clermont-Ferrand	0	1	0	0	28	21,5	0	<i>C. hominis</i>
P97	133191722	Nantes	0	1	0	0	0	31,1	0	<i>C. parvum</i>
P98	133241950	Nantes	1	0	0	ankylostomidé	25,8	0	0	
P100	133322101	Nantes	0	0	0	<i>E. nana, E. coli, E. dispar</i>	0	0	0	
P101	04-04079720	NCN (NANTES)	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P102	08-08059362	NCN (NANTES)	1	0	1	0	14,5	0	41,8	
P103	130210005	Angers	1	0	0	0	24,2	0	0	
P104	133400170	Nantes	0	1	0	0	0	25,6	0	<i>C. parvum</i>
P105	3121028267	La Roche sur Yon	1	0	0	<i>E. coli</i>	25,5	0	0	

P106	13116988	Tours	0	0	0	<i>I. belli</i>	0	0	0	
P107	1309178500	Nancy	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P108	1312181489	Nice	0	0	0	ankylostomidé	0	0	0	
P109	1312172784	Nice	0	0	0	<i>T. trichiura</i>	0	0	0	
P110	13117511	Tours	1	0	0	0	26,6	0	0	
P112	133651412	Nantes	0	0	0	<i>E. coli, E. nana</i>	0	0	0	
P113	140062468	Nantes	0	0	0	<i>E. coli, E. dispar</i>	0	0	0	
P114	140109-2990-02	Nice	0	0	0	<i>Taenia spp.</i>	0	0	0	
P115	140160236	Nantes	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P116	140161089	Nantes	0	0	0	<i>S. mansoni</i>	0	0	0	
P117	214014355	Clermont-Ferrand	1	0	0	0	26,1	0	0	
P118	2140170601	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>B. hominis</i>	0	0	0	
P119	2140163301	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>B. hominis</i>	0	0	0	
P120	145026634	Angers	1	0	0	0	27,3	0	0	
P121	1401-161549	Poitiers	0	0	0	<i>E. dispar</i>	0	0	0	
P123	140240461	Nantes	0	1	0	0	0	28,9	0	<i>C. parvum</i>
P124	2140370801	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>B. hominis</i>	0	0	0	
P125	140412197	Angers	0	1	0	0	0	29,9	0	<i>C. parvum</i>
P126	2140393281	Clermont-Ferrand	1	1	0	0	25,2	31,3	0	<i>C. hominis</i>
P127	14101915	Tours	1	0	0	0	21,5	0	0	
P128	140450444	Nantes	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P129	140700193	Nantes	0	0	0	<i>E. coli, E. dispar</i>	0	0	0	
P130	140041269	Angers	0	0	1	<i>E. coli, E. nana</i>	0	0	30,7	
P131	145120148	Angers	0	0	0	<i>E. hartmanni</i>	0	0	0	
P132	140902468	Nantes	0	0	0	<i>E. nana</i>	0	0	0	
P133	140326-2348-02	Nice	0	0	0	<i>E. dispar, E. hartmanni</i>	0	0	0	
P134	140328-2248-03	Nice	1	0	1	<i>E. coli</i>	22,9	0	29,5	
P135	9179016	Nancy	1	0	0	0	24,3	0	0	
P136	140402-1389-03	Nice	0	0	0	<i>E. coli, E. dispar, B. hominis</i>	0	0	0	
P137	141071463	Nantes	0	0	0	<i>E. coli, B. hominis, C. mesnili</i>	0	0	0	
P138	4-105-0854	Dijon	1	0	0	0	16,4	0	0	

P139	2141025931	Clermont-Ferrand	0	1	0	0	0	34,2	0	<i>C. parvum</i>
P140	2141133391	Clermont-Ferrand	0	0	0	<i>I. butschlii</i>	0	0	0	
P141	141272172	Nantes	0	0	0	<i>E. coli</i>	0	0	0	
P142	141340832	Nantes	1	0	0	0	21,5	0	0	
P143	141360836	Nantes	0	0	0	<i>D. fragilis</i>	0	0	0	
P144	141422121	Nantes	0	0	0	<i>B. hominis</i>	0	0	0	
P145	141541485	Nantes	0	0	0	<i>S. hominis</i>	0	0	0	
P146	141550314	Nantes	0	0	0	<i>S. mansoni</i>	0	0	0	
P147	141831995	Nantes	0	1	0	0	0	31	0	<i>C. parvum</i>
P148	142032120	Nantes	0	1	0	0	0	29,7	0	<i>C. parvum</i>
P149	1409179709	Nancy	0	0	1	0	0	0	31,6	
P151	142401997	Nantes	0	1	0	0	0	26,4	0	<i>C. parvum</i>
P153	142592022	Nantes	0	1	0	0	0	0	0	<i>C. felis</i>
P154	142741195	Nantes	0	1	0	0	0	28,3	0	<i>C. parvum</i>

Légende :**0** : résultat négatif**1** : résultat positif

ANNEXE II : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude d'évaluation de la PCR multiplex G-DiaParaTrio (échantillons négatifs)

n°	Enregistrement	Centre	Méthodes références				PCR multiplex (Ct)			Séquençage
			<i>Giardia</i>	<i>Crypto</i>	<i>histo</i>	autres	<i>Giardia</i>	<i>Crypto</i>	<i>histo</i>	
N2	121830291	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N4	131910405	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N5	132080480	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N6	132102190	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N8	13110559	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N9	13110065	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N10	13110423	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N11	13110489	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N12	13110673	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N13	13110715	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N14	1311077	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N15	13110774	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N16	132281321	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N17	132321294	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N18	13110927	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N19	13110985	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N20	131111070	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N21	131111224	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N22	131111280	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N23	132450634	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N24	132570168	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N25	713250007	Bichat	0	0	0	0	0	0	0	
N26	713220645	Bichat	0	0	0	0	0	0	0	
N27	713230066	Bichat	0	0	0	0	0	0	0	
N28	713210206	Bichat	0	0	0	0	0	0	0	
N29	713230064	Bichat	0	0	0	0	0	0	0	
N30	13112778	Tours	0	0	0	0	0	0	0	
N31	133011355	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N32	133361872	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	
N33	140021717	Nantes	0	0	0	0	0	0	0	

N34	13117230	Tours	0	0	0	0	0	0	0
N35	13117261	Tours	0	0	0	0	0	0	0
N36	140230474	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N37	140271416	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N38	140580249	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N39	140580238	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N40	140591295	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N41	140620374	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N42	140942310	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N43	141002251	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N45	141351443	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N46	141421567	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N47	141480269	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N48	141720205	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N49	141740204	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N50	141740249	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N51	141740209	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N52	141810558	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N53	141811281	Nantes	0	0	0	0	0	0	0
N54	141822286	Nantes	0	0	0	0	0	0	0

Légende :**0** : résultat négatif**1** : résultat positif

ANNEXE III : Evaluation de la PCR multiplex G-DiaParaTrio sur des extraits d'ADN (*E. dispar*, *E. histolytica*, *C. felis* et *C. meleagridis*)

n°	Extraits d'ADN	PCR multiplex (Ct)		
		<i>G. intestinalis</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>E. histolytica</i>
E466	<i>E. dispar</i>	0	0	0
E798	<i>E. dispar</i>	21,1	0	0
E633	<i>E. histolytica</i>	0	0	27,5
E667	<i>E. histolytica</i>	0	0	27,4
E652	<i>C. felis</i>	0	0	0
E753	<i>C. felis</i>	0	0	0
E793	<i>C. felis</i>	0	0	0
E581	<i>C. felis</i>	0	0	0
E032	<i>C. felis</i>	0	0	0
E607	<i>C. meleagridis</i>	0	0	0

ANNEXE IV : Fiche de transmission pour l'envoi des échantillons de selles
- Evaluation trousse PCR Multiplex Coprologie (DIAGENODE) -
Fiche de transmission d'échantillons de selles positives

Nom du correspondant parasitologue/biologiste : CHU Nantes

Identification du patient (Nom Prénom) :

N° d'enregistrement laboratoire :

Date du prélèvement : / /

Date de l'envoi :

Résultats de l'examen parasitologique des selles

	Rares	Quelques	Nombreux	Très nombreux
• <u>Examen direct</u> :	☐	☐	☐	☐
.....	☐	☐	☐	☐
.....	☐	☐	☐	☐
• <u>Concentration(s)</u> :	☐	☐	☐	☐
.....	☐	☐	☐	☐
.....	☐	☐	☐	☐
• Méthode(s) de concentration(s) utilisée(s) :				
• La recherche de cryptosporidies a-t-elle été effectuée ? ☐ OUI ☐ NON (Si oui, merci de préciser la méthode utilisée :)				
• Remarques :				

Date de congélation : / /

N° d'inclusion :

**Conserver un échantillon de la selles en tube
sérothèque (quantité max) de 2 mL à -20°C
(congélateur pièce coprologie)**

Garder le reste des selles fraîches à +4°C.

ANNEXE V : Communication affichée (SFP – SFMM 2015)

**Evaluation des performances du kit G-DiaParaTrio (Diagenode®)
pour la détection simultanée de *G. intestinalis*, *C. parvum/hominis* et
E. histolytica par PCR multiplex à partir d'échantillons de selles.**

Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie
Médicale

BORDEAUX

20 – 21 – 22 mai 2015

NB : Certains résultats présentés dans cette annexe peuvent différer légèrement par rapport à ceux présentés précédemment, le travail n'ayant pas été totalement finalisé au mois de mai 2015.

Evaluation des performances du kit G-DiaParaTrio (Diagenode®) pour la détection simultanée de *G. intestinalis*, *C. parvum/hominis* et *E. histolytica* par PCR multiplex à partir d'échantillons de selles.

Adrien LAUDE¹, Stéphane VALOT², Guillaume DESOUBEAUX³, Nicolas ARGY⁴, Céline NOURRISSON⁵, Christelle POMARES⁶, Marie MACHOUART⁷, Yohann LE GOVIC⁸, Frédéric DALLE², Françoise BOTTEREL⁹, Nathalie BOURGEOIS¹⁰, Estelle CATEAU¹¹, Marion LETERRIER¹², Patrice LE PAPE¹, Florent MORIO¹

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie, CHU Nantes ; ²Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Dijon ; ³Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine Tropicale, CHU de Tours/CEPR Inserm U1100, équipe 3, Université François-Rabelais de Tours ; ⁴Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris ; ⁵Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Clermont-Ferrand ; ⁶Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nice ; ⁷Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nancy ; ⁸Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU d'Angers ; ⁹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP Hôpital Henri Mondor, Créteil ; ¹⁰Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Montpellier ; ¹¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Poitiers ; ¹²Laboratoire de Microbiologie, CH de la Roche-sur-Yon.

Contexte : L'examen parasitologique des selles, associé ou non à des colorations spécifiques, constitue le *gold standard* pour le diagnostic des parasitoses intestinales, mais il reste difficile et requiert un personnel très expérimenté. Dans ce contexte, des méthodes alternatives reposant sur la PCR ont été progressivement développées. Ces approches semblent montrer de bonnes performances et une mise en œuvre aisée et rapide. Toutefois, l'extrapolation des résultats à la pratique clinique est délicate du fait du nombre souvent limité d'échantillons testés.

Méthodes : Pour cette étude, une collection de 185 prélèvements de selles (n=185 patients) a été constituée de manière multicentrique (CHU Nantes, Dijon, Tours, Paris-Bichat, Clermont-Ferrand, Nice, Nancy, Angers, Créteil, Montpellier, Poitiers et CH de La Roche-sur-Yon) de mai 2013 à octobre 2014. A réception au CHU de Nantes, chaque échantillon a été soumis à un examen microscopique avant et après concentration (Para-selles/Kop-color, Fumouze®) associée à la recherche systématique de *Cryptosporidium* spp. (Ziehl-Neelsen modifié). L'identification d'espèce de *Cryptosporidium* spp. a été réalisée par PCR-séquençage. L'adhésine spécifique d'*E. histolytica* a été recherchée par ELISA pour tous les échantillons positifs à amibes (*E. histolytica* II, Techlab®). Au total, le panel ainsi constitué comprenait : *G. intestinalis* (n=38), *C. parvum/hominis* (n=26), *E. histolytica* (n=5) d'autres parasites (n=81 représentant 19 genres/espèces distinctes) ainsi que *C. meleagridis* (n=1), *C. felis* (n=1) et 50 selles négatives. Les échantillons ont été conservés à -20°C avant l'étape d'extraction automatisée (QiaSymphony, Qiagen). La PCR multiplex G-DiaParaTrio(Diagenode) a été réalisée en duplicat (Rotor-Gene Q, Qiagen).

Résultats/Discussion : La PCR multiplex a détecté 38 *G. intestinalis*, 25 *C. parvum/hominis* et 5 *E. histolytica* soit une sensibilité/spécificité respectives de 92/98%, 96/100% et 100/100%. Aucune réaction croisée ni inhibition de PCR n'a été observée. Si cette technique permet une détection rapide et fiable de ces trois parasites, la place de cet outil dans l'algorithme diagnostique des parasitoses intestinales est à établir, l'examen microscopique restant indispensable à l'investigation des autres causes parasitaires.



Evaluation des performances du kit G-DiaParaTrio™ (Diagenode) pour la détection simultanée de *G. intestinalis*, *C. parvum/hominis* et *E. histolytica* par PCR multiplex à partir d'échantillons de selles



UNIVERSITÉ DE NANTES

Adrien LAUDE¹, Stéphane VALOT², Guillaume DESOUBEAUX³, Nicolas ARGY⁴, Céline NOURRISSON⁵, Christelle POMARES⁶, Marie MACHOUART⁷, Yohann LE GOVIC⁸, Frédéric DALLE², Françoise BOTTEREL⁹, Nathalie BOURGEOIS¹⁰, Estelle CATEAU¹¹, Marion LETERRIER¹², Patrice LE PAPE¹, Florent MORIO¹

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Nantes ; ²Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Dijon ; ³Service de Parasitologie-Mycologie-Médecine Tropicale, CHU de Tours/CEPR Inserm U1100, équipe 3, Université François-Rabelais de Tours ; ⁴Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris ; ⁵Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Clermont-Ferrand ; ⁶Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nice ; ⁷Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nancy ; ⁸Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU d'Angers ; ⁹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP Hôpital Henri Mondor, Créteil ; ¹⁰Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Montpellier ; ¹¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Poitiers ; ¹²Laboratoire de Microbiologie, CH de la Roche-sur-Yon.

Introduction

Contexte : L'examen parasitologique des selles (EPS), associé ou non à des colorations spécifiques, constitue le *gold standard* pour le diagnostic des parasitoses intestinales. Cet examen reste toutefois difficile et requiert un personnel très expérimenté. Dans ce contexte, des méthodes alternatives reposant sur la PCR ont été progressivement développées¹⁻⁸. Ces techniques semblent montrer de bonnes performances et une mise en œuvre aisée et rapide. Toutefois, l'extrapolation des résultats à la pratique clinique est délicate du fait du nombre souvent limité d'échantillons analysés dans ces études⁹⁻¹⁴.

Objectif : Evaluer les performances du kit de PCR multiplex G-DiaParaTrio™ (Diagenode) pour la détection de *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum/C. hominis* et *Entamoeba histolytica* sur un panel d'échantillons de selles rigoureusement sélectionné et représentatif des parasites gastro-intestinaux isolés en France. Outre la recherche de ces parasites, ce kit en cours de marquage CE-IVD inclus un témoin d'extraction et la recherche d'inhibiteurs de PCR.

Matériels et méthodes

Design de l'étude

Réalisation d'un panel d'échantillons de selles (n=185, 185 patients), collectées de manière multicentrique de mai 2013 à octobre 2014.

Réalisation/Validation du panel

A réception au CHU de Nantes, tous les échantillons ont été analysés selon un protocole standardisé (Fig. 1):

- Examen direct (sérum physio. Lugol)
- Tech. de concentration (Paraselles/Kop-Color, Fumouze)
- Recherche de cryptosporidies (Ziehl-Neelsen modifié)
- +/- ID d'espèce par PCR-séquençage (18S rRNA)
- Recherche adhésine spécifique *E. histolytica* par ELISA si présence d'amibes (*E. histolytica* II, Fumouze)

Composition du panel

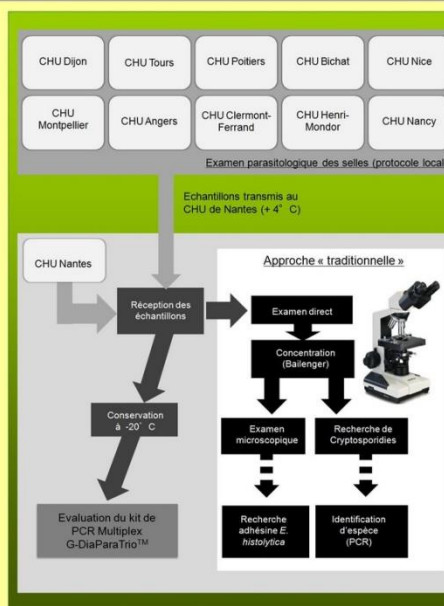
- 135 selles positives dont *G. intestinalis* (n=38), *C. parvum/C. hominis* (n=26), *E. histolytica* (n=5)
- 50 selles négatives

Composition précise du panel (Tableau I)

PCR multiplex G-DiaParaTrio™

Descriptif détaillé du protocole (Fig. 2).

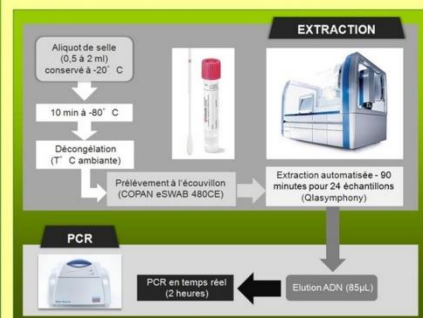
- Prélèvement de selles calibré (COPAN eSWAB 480CE)
- Extraction sur automate Qiasymphony (Qiagen), protocole DSP virus/pathogène
- PCR effectuée en duplicate incluant recherche d'inhibiteurs de PCR (Rotor-Gene Q, Qiagen)



▲ Figure 1: Schéma simplifié de la prise en charge des échantillons

▼ Tableau I: Diversité des pathogènes composant le panel (n=185)

Genre/espèce	N°	Genre/espèce	N°
<i>Giardia intestinalis</i>	38	<i>Chlamydia trachomatis</i>	2
<i>C. parvum / C. hominis</i>	26	<i>Isospora belli</i>	2
<i>Entamoeba histolytica</i>	5	<i>Ankylostomides</i>	2
<i>Entamoeba coli</i>	38	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	1
<i>Endolimax nana</i>	21	<i>Enterocytozoon bienewi</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i>	15	<i>Cryptosporidium felis</i>	1
<i>Entamoeba dispar</i>	12	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	1
<i>Entamoeba hartmanni</i>	4	<i>Pentatrichomonas intestinalis</i>	1
<i>Shistosoma mansoni</i>	4	<i>Trichuris trichiura</i>	1
<i>Iodamoeba butschlii</i>	3	<i>taenia sp.</i>	1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	3	<i>Dientamoeba fragilis</i>	1
<i>Hymenolepis nana</i>	2	<i>Sarcocystis hominis</i>	1



▲ Figure 2: Modalités du protocole d'extraction et PCR

Résultats

Tous les échantillons testés ont pu être analysés (absence d'inhibiteurs de PCR). Aucune réaction croisée n'a été constatée vis à vis des autres pathogènes inclus dans le panel (19 genres/espèces, cf. Tableau 1). Les résultats détaillés par pathogène, sont présentés ci-dessous (Tableaux II à IV).

Giardia intestinalis

Bonne corrélation entre PCR et microscopie (méthode de référence). Six échantillons discordants: Trois échant. POS en PCR mais NEG en microscopie. Trois échant. faussement négatifs en PCR (rares kystes en microscopie).

▼ Tableau II: Détection de *Giardia intestinalis* (n=185)

		Méthode de référence		
		+	-	
PCR	+	35	3	38
	-	3	144	147
		38	147	185

Cryptosporidium parvum / C. hominis

Bonne concordance entre PCR et microscopie pour ces deux espèces. Un échantillon (*C. parvum*) faussement négatif en PCR (mais positif après réextraction). *Deux échantillons non détectés car espèces non ciblées par la PCR (*C. felis* et *C. meleagridis*).

▼ Tableau III: Détection de *C. parvum/C. hominis* (n=185)

		Méthode de référence		
		+	-	
PCR	+	25	0	25
	-	3*	157	160
		28	157	185

Entamoeba histolytica

Peu d'échantillons mais bonne concordance entre PCR et méthode de référence.

*16 échantillons « douteux » en PCR sur RotorGene. Non observé en cas d'amplification avec LC480 (Roche).

▼ Tableau IV: Détection d'*E. histolytica* (n=185)

		Méthode de référence		
		+	-	
PCR	+	5	0*	5
	-	0	180	180
		5	180	185

Conclusion

Le kit de PCR multiplex G-DiaParaTrio™ (Diagenode) permet une détection rapide (4h30 pour 24 échantillons) et simultanée des trois agents de protozooses digestives les plus fréquemment recherchés en France, avec des performances comparables à la méthode traditionnelle reposant sur la microscopie. La place de ce nouvel outil dans la stratégie diagnostique reste cependant à définir, l'examen microscopique restant indispensable au diagnostic des autres étiologies parasitaires.

Références : Verweij et al., J Clin Microbiol 2004; Stark et al., J Clin Microbiol 2011; Liu et al., J Clin Microbiol 2013; Mejia et al., Am J Trop Med Hyg 2013; Ten Hove et al., Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; Buss et al., J Clin Microbiol 2015; Haque et al., Am J Trop Med Hyg 2007; Stark et al., Diagn Microbiol Infect Dis 2014; Bruijnesteijn van Coppenraet et al., J Clin Microbiol Infect 2009; Ten Hove et al., Clin Microbiol Infect 2007; Zboromyrska et al., Clin Microbiol Infect 2014; McAuliffe et al., J Infect 2013; Basuni et al., Trop Biomed 2012; Wessels et al., Clin Microbiol Infect 2014.

Remerciements : Les auteurs remercient la société Diagenode pour avoir permis la réalisation de cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam R. D., 2001 Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. **14**: 447–475.
- Agnamey P., Sarfati C., Pinel C., Rabodonirina M., Kapel N., Dutoit E., Garnaud C., Diouf M., Garin J.-F., Totet A., Derouin F., ANOFEL Cryptosporidium National Network, 2011 Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of *Cryptosporidium* antigens in stool samples: a blind multicenter trial. J. Clin. Microbiol. **49**: 1605–1607.
- Ali I. K. M., Clark C. G., Petri W. A., 2008 Molecular epidemiology of amebiasis. Infect. Genet. Evol. **8**: 698–707.
- Alles A. J., Waldron M. A., Sierra L. S., Mattia A. R., 1995 Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. J. Clin. Microbiol. **33**: 1632–1634.
- Amato Neto V., Braz L. M., Pietro A. O. Di, Módolo J. R., 1996 [Oocysts of *Cryptosporidium* sp in feces: comparison of the modified Kinyoun and Heine methods]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **29**: 575–578.
- ANOFEL Cryptosporidium National Network, 2010 Laboratory-based surveillance for *Cryptosporidium* in France, 2006–2009. Euro Surveill. **15**: 19642.
- Bailenger J., 1982 *Coprologie parasitaire et fonctionnelle*. J. Bailenger, Bordeaux.
- Basuni M., Muhi J., Othman N., Verweij J. J., Ahmad M., Miswan N., Rahumatullah A., Aziz F. A., Zainudin N. S., Noordin R., 2011 A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. Am. J. Trop. Med. Hyg. **84**: 338–343.
- Basuni M., Mohamed Z., Ahmad M., Zakaria N. Z., Noordin R., 2012 Detection of selected intestinal helminths and protozoa at Hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex real-time PCR. Trop Biomed **29**: 434–442.
- Becker S. L., Marti H., Zimmermann S., Vidacek D., Herrmann M., Utzinger J., Schnabel P. A., Bohle R. M., 2015 Application in Europe of a urine-based rapid diagnostic test for confirmation of *Schistosoma mansoni* infection in migrants from endemic areas. Euro Surveill. **20**.
- Bercu T. E., Petri W. A., Behm J. W., 2007a Amebic colitis: new insights into pathogenesis and treatment. Curr Gastroenterol Rep **9**: 429–433.
- Bercu T. E., Petri W. A., Behm J. W., 2007b Amebic colitis: new insights into pathogenesis and treatment. Curr Gastroenterol Rep **9**: 429–433.
- Boer R. F. de, Ott A., Kesztyüs B., Kooistra-Smid A. M. D., 2010 Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. J. Clin. Microbiol. **48**: 4140–4146.
- Boontanom P., Pipatsatitpong D., Tan-Ariya P., Mungthin M., Siripattanapipong S., Naaglor T., Leelayoova S., 2014 Incidence and risk factors of *Giardia duodenalis* infection in an orphanage, Thailand. Trop Biomed **31**: 525–533.
- Bossche D. Van den, Cnops L., Verschueren J., Esbroeck M. Van, 2015 Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*,

- Cryptosporidium spp. and Entamoeba histolytica in feces. J. Microbiol. Methods **110**: 78–84.
- Bouزيد M., Hunter P. R., Chalmers R. M., Tyler K. M., 2013 Cryptosporidium Pathogenicity and Virulence. Clin Microbiol Rev **26**: 115–134.
- Bruijnesteijn van Coppenraet L. E. S., Wallinga J. A., Ruijs G. J. H. M., Bruins M. J., Verweij J. J., 2009 Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. Clin. Microbiol. Infect. **15**: 869–874.
- Buonfrate D., Formenti F., Perandin F., Bisoffi Z., 2015 Novel approaches to the diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. Clinical Microbiology and Infection **21**: 543–552.
- Buss S. N., Leber A., Chapin K., Fey P. D., Bankowski M. J., Jones M. K., Rogatcheva M., Kanack K. J., Bourzac K. M., 2015 Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis. J. Clin. Microbiol. **53**: 915–925.
- Chalmers R. M., Campbell B. M., Crouch N., Charlett A., Davies A. P., 2011 Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven Cryptosporidium assays used in the UK. J. Med. Microbiol. **60**: 1598–1604.
- Chartier C., Rieux A., Delafosse A., Lehebel A., Paraud C., 2013 Detection of Cryptosporidium oocysts in fresh calf faeces: characteristics of two simple tests and evaluation of a semi-quantitative approach. Vet. J. **198**: 148–152.
- Christy N. C. V., Hencke J. D., Escueta-De Cadiz A., Nazib F., Thien H. von, Yagita K., Ligaba S., Haque R., Nozaki T., Tannich E., Herbein J. F., Petri W. A., 2012 Multisite performance evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Giardia, Cryptosporidium, and Entamoeba histolytica antigens in human stool. J. Clin. Microbiol. **50**: 1762–1763.
- Claassen S., Toit E. du, Kaba M., Moodley C., Zar H. J., Nicol M. P., 2013 A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. J. Microbiol. Methods **94**: 103–110.
- Cotton J. A., Bhargava A., Ferraz J. G., Yates R. M., Beck P. L., Buret A. G., 2014 Giardia duodenalis cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. Infect. Immun. **82**: 2772–2787.
- Cringoli G., 2006 FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. Parassitologia **48**: 381–384.
- Danquah I., Gahutu J.-B., Ignatius R., Musemakweri A., Mockenhaupt F. P., 2014 Reduced prevalence of Giardia duodenalis in iron-deficient Rwandan children. Trop. Med. Int. Health **19**: 563–567.
- Delaimy A. K. Al-, Mekhlafi H. M. Al-, Nasr N. A., Sady H., Atroosh W. M., Nashiry M., Anuar T. S., Moktar N., Lim Y. A. L., Mahmud R., 2014 Epidemiology of intestinal polyparasitism among Orang Asli school children in rural Malaysia. PLoS Negl Trop Dis **8**: e3074.

- Dreelin E. A., Ives R. L., Molloy S., Rose J. B., 2014 Cryptosporidium and Giardia in Surface Water: A Case Study from Michigan, USA to Inform Management of Rural Water Systems. *Int J Environ Res Public Health* **11**: 10480–10503.
- DuPont H. L., 2013 Giardia: both a harmless commensal and a devastating pathogen. *J Clin Invest* **123**: 2352–2354.
- Elsafi S. H., Maqati T. N. Al-, Hussein M. I., Adam A. A., Hassan M. M. A., Zahrani E. M. Al, 2013 Comparison of microscopy, rapid immunoassay, and molecular techniques for the detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum. *Parasitol. Res.* **112**: 1641–1646.
- Elwin K., Robinson G., Hadfield S. J., Fairclough H. V., Iturriza-Gómara M., Chalmers R. M., 2012 A comparison of two approaches to extracting Cryptosporidium DNA from human stools as measured by a real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods* **89**: 38–40.
- Espinosa-Cantellano M., Martínez-Palomo A., 2000 Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clin Microbiol Rev* **13**: 318–331.
- Fatni C. El, Olmo F., Fatni H. El, Romero D., Rosales M. J., 2014 First genotyping of Giardia duodenalis and prevalence of enteroparasites in children from Tetouan (Morocco). *Parasite* **21**: 48.
- Formenti F., Perandin F., Bonafini S., Degani M., Bisoffi Z., 2015 [Evaluation of the new ImmunoCard STAT!® CGE test for the diagnosis of Amebiasis]. *Bull Soc Pathol Exot* **108**: 171–174.
- Fotedar R., Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J., Harkness J., 2007 Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**: 511–532, table of contents.
- Garcia L. S., Bruckner D. A., Brewer T. C., Shimizu R. Y., 1983 Techniques for the recovery and identification of Cryptosporidium oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 185–190.
- Garcia L. S., Shimizu R. Y., 1997 Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1526–1529.
- Garcia L. S., Shimizu R. Y., Bernard C. N., 2000 Detection of Giardia lamblia, Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar, and Cryptosporidium parvum antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3337–3340.
- Garcia L. S., Shimizu R. Y., Novak S., Carroll M., Chan F., 2003 Commercial assay for detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 209–212.
- Garcia L. S., Garcia J. P., 2006 Detection of Giardia lamblia antigens in human fecal specimens by a solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4587–4588.
- Gautret P., Cramer J. P., Field V., Caumes E., Jensenius M., Gkrania-Klotsas E., Vries P. J. de, Grobusch M. P., Lopez-Velez R., Castelli F., Schlagenhauf P., Hervius Askling H., Sonnenburg F. von, Laloo D. G., Loutan L., Rapp C., Basto F., Santos O'Connor F., Weld L., Parola P., EuroTravNet Network, 2012 Infectious diseases among travellers and migrants in Europe, EuroTravNet 2010. *Euro Surveill.* **17**.

- Goñi P., Martín B., Villacampa M., García A., Seral C., Castillo F. J., Clavel A., 2012 Evaluation of an immunochromatographic dip strip test for simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**: 2077–2082.
- Habtamu K., Degarege A., Ye-Ebiyo Y., Erko B., 2011 Comparison of the Kato-Katz and FLOTAC techniques for the diagnosis of soil-transmitted helminth infections. *Parasitol. Int.* **60**: 398–402.
- Halstead F. D., Lee A. V., Couto-Parada X., Polley S. D., Ling C., Jenkins C., Chalmers R. M., Elwin K., Gray J. J., Iturriza-Gómara M., Wain J., Clark D. A., Bolton F. J., Manuel R. J., Olympics GI Group, 2013 Universal extraction method for gastrointestinal pathogens. *J. Med. Microbiol.* **62**: 1535–1539.
- Haque R., Mondal D., Duggal P., Kabir M., Roy S., Farr B. M., Sack R. B., Petri W. A., 2006 *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. *Infect. Immun.* **74**: 904–909.
- Haque R., Roy S., Siddique A., Mondal U., Rahman S. M. M., Mondal D., Houpt E., Petri W. A., 2007 Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 713–717.
- Hawash Y., 2014 DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. *Korean J. Parasitol.* **52**: 263–271.
- Hiatt R. A., Markell E. K., Ng E., 1995 How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 36–39.
- Hirata T., Nakamura H., Kinjo N., Hokama A., Kinjo F., Yamane N., Fujita J., 2007 Increased Detection Rate of *Strongyloides stercoralis* by Repeated Stool Examinations Using the Agar Plate Culture Method. *Am J Trop Med Hyg* **77**: 683–684.
- Hove R. Ten, Schuurman T., Kooistra M., Möller L., Lieshout L. Van, Verweij J. J., 2007 Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection* **13**: 1001–1007.
- Hove R. J. ten, Esbroeck M. van, Vervoort T., Ende J. van den, Lieshout L. van, Verweij J. J., 2009 Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**: 1045–1053.
- Hunter P. R., Nichols G., 2002 Epidemiology and Clinical Features of *Cryptosporidium* Infection in Immunocompromised Patients. *Clin Microbiol Rev* **15**: 145–154.
- Ignatius R., Lehmann M., Miksits K., Regnath T., Arvand M., Engelmann E., Futh U., Hahn H., Wagner J., 1997 A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and microsporidial species in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 446–449.
- Jiang Y., Ren J., Yuan Z., Liu A., Zhao H., Liu H., Chu L., Pan W., Cao J., Lin Y., Shen Y., 2014 *Cryptosporidium andersoni* as a novel predominant *Cryptosporidium* species in outpatients with diarrhea in Jiangsu Province, China. *BMC Infect Dis* **14**.

- Johnson E. H., Windsor J. J., Clark C. G., 2004 Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 553–570, table of contents.
- Johnston S. P., Ballard M. M., Beach M. J., Causer L., Wilkins P. P., 2003 Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 623–626.
- Khanna V., Tilak K., Ghosh A., Mukhopadhyay C., 2014 Modified Negative Staining of Heine for Fast and Inexpensive Screening of *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, and *Cystoisospora* spp. *International Scholarly Research Notices* **2014**: e165424.
- Khurana S., Sharma P., Sharma A., Malla N., 2012 Evaluation of Ziehl-Neelsen staining, auramine phenol staining, antigen detection enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction, for the diagnosis of intestinal cryptosporidiosis. *Trop Parasitol* **2**: 20–23.
- Korpe P. S., Stott B. R., Nazib F., Kabir M., Haque R., Herbein J. F., Petri W. A., 2012 Evaluation of a rapid point-of-care fecal antigen detection test for *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**: 980–981.
- L.Alexander C., Niebel M., Jones B., 2013 The rapid detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in clinical stools using the Quik Chek immunoassay. *Parasitology International* **62**: 552–553.
- Le T. H., Nguyen K. T., Nguyen N. T. B., Doan H. T. T., Le X. T. K., Hoang C. T. M., De N. V., 2012 Development and evaluation of a single-step duplex PCR for simultaneous detection of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (family Fasciolidae, class Trematoda, phylum Platyhelminthes). *J. Clin. Microbiol.* **50**: 2720–2726.
- Lee S.-H., Joung M., Yoon S., Choi K., Park W.-Y., Yu J.-R., 2010 Multiplex PCR detection of waterborne intestinal protozoa: microsporidia, *Cyclospora*, and *Cryptosporidium*. *Korean J. Parasitol.* **48**: 297–301.
- Leitch G. J., He Q., 2011 Cryptosporidiosis-an overview. *J Biomed Res* **25**: 1–16.
- Lieshout L. van, Roestenberg M., 2015 Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**: 520–528.
- Lint P. Van, Rossen J. W., Vermeiren S., Elst K. Ver, Weekx S., Schaeren J. Van, Jeurissen A., 2013 Detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in clinical stool samples by using multiplex real-time PCR after automated DNA isolation. *Acta Clin Belg* **68**: 188–192.
- Liu J., Gratz J., Amour C., Kibiki G., Becker S., Janaki L., Verweij J. J., Taniuchi M., Sobuz S. U., Haque R., Haverstick D. M., Houpt E. R., 2013 A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *J. Clin. Microbiol.* **51**: 472–480.
- Maraha B., Buiting A. G., 2000 Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**: 485–487.
- McAuliffe G. N., Anderson T. P., Stevens M., Adams J., Coleman R., Mahagamasekera P., Young S., Henderson T., Hofmann M., Jennings L. C., Murdoch D. R., 2013 Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. *J. Infect.* **67**: 122–129.

- McHardy I. H., Wu M., Shimizu-Cohen R., Couturier M. R., Humphries R. M., 2014 Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 712–720.
- Mejia R., Vicuña Y., Broncano N., Sandoval C., Vaca M., Chico M., Cooper P. J., Nutman T. B., 2013 A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **88**: 1041–1047.
- Minak J., Kabir M., Mahmud I., Liu Y., Liu L., Haque R., Petri W. A., 2012 Evaluation of rapid antigen point-of-care tests for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 154–156.
- Moamly A. A.-R. El-, Sweify M. A. El-, 2012 ImmunoCard STAT! cartridge antigen detection assay compared to microplate enzyme immunoassay and modified Kinyoun's acid-fast staining technique for detection of *Cryptosporidium* in fecal specimens. *Parasitol. Res.* **110**: 1037–1041.
- Mukherjee A. K., Chowdhury P., Rajendran K., Nozaki T., Ganguly S., 2014 Association between *Giardia duodenalis* and coinfection with other diarrhea-causing pathogens in India. *Biomed Res Int* **2014**: 786480.
- Nazeer J. T., Sayed Khalifa K. El, Thien H. von, Sibaei M. M. El-, Abdel-Hamid M. Y., Tawfik R. A. S., Tannich E., 2013 Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. *Parasitol. Res.* **112**: 595–601.
- Nguyen T. K. T., Kherouf H., Blanc-Pattin V., Allais E., Chevalier Y., Richez A., Ramade C., Peyron F., 2012 Evaluation of an immunochromatographic assay: *Giardia*-Strip® (Coris BioConcept) for detection of *Giardia intestinalis* in human fecal specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**: 623–625.
- Oster N., Gehrig-Feistel H., Jung H., Kammer J., McLean J. E., Lanzer M., 2006 Evaluation of the immunochromatographic CORIS *Giardia*-Strip test for rapid diagnosis of *Giardia lamblia*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**: 112–115.
- Painter J. E., Gargano J. W., Collier S. A., Yoder J. S., Centers for Disease Control and Prevention, 2015 Giardiasis surveillance -- United States, 2011-2012. *MMWR Surveill Summ* **64 Suppl 3**: 15–25.
- Pietrzak-Johnston S. M., Bishop H., Wahlquist S., Moura H., Silva N. D. Da, Silva S. P. Da, Nguyen-Dinh P., 2000 Evaluation of commercially available preservatives for laboratory detection of helminths and protozoa in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1959–1964.
- Pillai D. R., Kain K. C., 1999 Immunochromatographic strip-based detection of *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* and *Giardia lamblia* coproantigen. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3017–3019.
- Potters I., Esbroeck M. Van, 2010 Negative staining technique of Heine for the detection of *Cryptosporidium* spp.: a fast and simple screening technique.
- Putignani L., Menichella D., 2010 Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2010**.
- Ralston K. S., Petri W. A., 2011 Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* **27**: 254–263.

- Rigo C. R., Franco R. M. B., 2002 [Comparison between the modified Ziehl-Neelsen and Acid-Fast-Trichrome methods for fecal screening of *Cryptosporidium parvum* and *Isospora belli*]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35**: 209–214.
- Rossle N. F., Latif B., 2013 Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pac J Trop Biomed* **3**: 916–924.
- Rubio J. M., Lanza M., Fuentes I., Soliman R. H., 2014 A novel nested multiplex PCR for the simultaneous detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitol. Int.* **63**: 664–669.
- Sadaka H. A., Gaafar M. R., Mady R. F., Hezema N. N., 2015 Evaluation of ImmunoCard STAT test and ELISA versus light microscopy in diagnosis of giardiasis and cryptosporidiosis. *Parasitol. Res.* **114**: 2853–2863.
- Santos H. L. C., Bandyopadhyay K., Bandea R., Peralta R. H. S., Peralta J. M., Silva A. J. Da, 2013 LUMINEX®: a new technology for the simultaneous identification of five *Entamoeba* spp. commonly found in human stools. *Parasit Vectors* **6**: 69.
- Shimelis T., Tadesse E., 2014 Performance evaluation of point-of-care test for detection of *Cryptosporidium* stool antigen in children and HIV infected adults. *Parasit Vectors* **7**: 227.
- Simons A *et al.*, 29th Clinical Virology Symposium, Abstract 71, USA
- Speich B., Utzinger J., Marti H., Ame S. M., Ali S. M., Albonico M., Keiser J., 2014 Comparison of the Kato-Katz method and ether-concentration technique for the diagnosis of soil-transmitted helminth infections in the framework of a randomised controlled trial. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**: 815–822.
- Stark D., Hal S. van, Fotedar R., Butcher A., Marriott D., Ellis J., Harkness J., 2008 Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 1678–1681.
- Stark D., Qassab S. E. Al-, Barratt J. L. N., Stanley K., Roberts T., Marriott D., Harkness J., Ellis J. T., 2011 Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 257–262.
- Stark D., Roberts T., Ellis J. T., Marriott D., Harkness J., 2014 Evaluation of the EasyScreen™ enteric parasite detection kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **78**: 149–152.
- Stensvold C. R., Nielsen H. V., 2012 Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 540–541.
- Strand E. A., Robertson L. J., Hanevik K., Alvsvåg J. O., Mørch K., Langeland N., 2008 Sensitivity of a *Giardia* antigen test in persistent giardiasis following an extensive outbreak. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**: 1069–1071.
- Svraka-Latifovic S., Bouter S., Naus H., Bakker L. J., Timmerman C. P., Dorigo-Zetsma J. W., 2014 Impact of transition from microscopy to molecular screening for detection of intestinal protozoa in Dutch patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**: O969–971.

- Swierczewski B., Odundo E., Ndonge J., Kirera R., Odhiambo C., Oaks E., 2012 Comparison of the Triage Micro Parasite Panel and Microscopy for the Detection of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in Stool Samples Collected in Kenya. *J Trop Med* **2012**: 564721.
- Taniuchi M., Verweij J. J., Noor Z., Sobuz S. U., Lieshout L. van, Petri W. A., Haque R., Houpt E. R., 2011a High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **84**: 332–337.
- Taniuchi M., Verweij J. J., Sethabutr O., Bodhidatta L., Garcia L., Maro A., Kumburu H., Gratz J., Kibiki G., Houpt E. R., 2011b Multiplex polymerase chain reaction method to detect *Cyclospora*, *Cystoisospora*, and *Microsporidia* in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **71**: 386–390.
- Tejman-Yarden N., Eckmann L., 2011 New approaches to the treatment of giardiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**: 451–456.
- Tortora G. T., Malowitz R., Mendelsohn B., Spitzer E. D., 1992 Rhodamine-auramine O versus Kinyoun-carbol-fuchsin acid-fast stains for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *Clin Lab Sci* **5**: 568–569.
- Troeger H., Eppler H.-J., Schneider T., Wahnschaffe U., Ullrich R., Burchard G.-D., Jelinek T., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.-D., 2007 Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* **56**: 328–335.
- Tzipori S., Widmer G., 2008 A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol* **24**: 184–189.
- Vasoo S., Pritt B. S., 2013 Molecular diagnostics and parasitic disease. *Clin. Lab. Med.* **33**: 461–503.
- Verkerke H. P., Hanbury B., Siddique A., Samie A., Haque R., Herbein J., Petri W. A., 2015 Multisite clinical evaluation of a rapid test for *Entamoeba histolytica* in stool. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 493–497.
- Verweij J. J., Blangé R. A., Templeton K., Schinkel J., Brien E. A. T., Rooyen M. A. A. van, Lieshout L. van, Polderman A. M., 2004 Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1220–1223.
- Verweij J. J., Brien E. A. T., Ziem J., Yelifari L., Polderman A. M., Lieshout L. Van, 2007 Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 685–690.
- Verweij J. J., Stensvold C. R., 2014 Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**: 371–418.
- Vidal A. M. B., Catapani W. R., 2005 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Med J* **123**: 282–285.

- Wawrzyniak I., Poirier P., Viscogliosi E., Dionigia M., Texier C., Delbac F., Alaoui H. E., 2013 Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis* **1**: 167–178.
- Weitzel T., Dittrich S., Möhl I., Adusu E., Jelinek T., 2006 Evaluation of seven commercial antigen detection tests for Giardia and Cryptosporidium in stool samples. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**: 656–659.
- Wessels E., Rusman L. G., Bussel M. J. a. W. M. van, Claas E. C. J., 2014 Added value of multiplex Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG® GPP) testing in the diagnosis of infectious gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**: O182–187.
- Widerström M., Schönning C., Lilja M., Lebbad M., Ljung T., Allestam G., Ferm M., Björkholm B., Hansen A., Hiltula J., Långmark J., Löfdahl M., Omberg M., Reuterwall C., Samuelsson E., Widgren K., Wallensten A., Lindh J., 2014 Large Outbreak of Cryptosporidium hominis Infection Transmitted through the Public Water Supply, Sweden. *Emerg Infect Dis* **20**: 581–589.
- Ximénez C., Morán P., Rojas L., Valadez A., Gómez A., 2009 Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect. Genet. Evol.* **9**: 1023–1032.
- Yansouni C. P., Merckx J., Libman M. D., Ndao M., 2014 Recent advances in clinical parasitology diagnostics. *Curr Infect Dis Rep* **16**: 434.
- Zanten E. van, Wisselink G. J., Boer W. de, Stoll S., Alvarez R., Kooistra-Smid A. M. D., 2011a Comparison of the QIA Symphony automated nucleic acid extraction and PCR setup platforms with NucliSens easyMAG and Corbett CAS-1200 liquid handling station for the detection of enteric pathogens in fecal samples. *J. Microbiol. Methods* **84**: 335–340.
- Zanten E. van, Wisselink G. J., Stoll S., Alvarez R., Kooistra-Smid A. M. D., 2011b Evaluation of a shortened QIA Symphony DNA extraction protocol for stool samples using a multiplex real-time PCR for the detection of enteric pathogens. *J. Microbiol. Methods* **84**: 365–367.
- Zboromyrska Y., Hurtado J. C., Salvador P., Alvarez-Martínez M. J., Valls M. E., Mas J., Marcos M. A., Gascón J., Vila J., 2014 Aetiology of traveller's diarrhoea: evaluation of a multiplex PCR tool to detect different enteropathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**: O753–759.
- Zu S. X., Li J. F., Barrett L. J., Fayer R., Shu S. Y., McAuliffe J. F., Roche J. K., Guerrant R. L., 1994 Seroepidemiologic study of Cryptosporidium infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 1–10.



Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Vu, le Président du jury,

Patrice LE PAPE

Vu, le Directeur de thèse,

Florent MORIO

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénom : LAUDE Adrien

Titre de la thèse : Evaluation des performances du kit G-DiaParaTrio (Diagenode) pour la détection simultanée de *G. intestinalis*, *C. parvum*/*C. hominis* et *E. histolytica* par PCR multiplex à partir d'échantillons de selles

Résumé :

L'examen parasitologique des selles, reposant sur la microscopie, constitue le *gold standard* pour le diagnostic des parasitoses intestinales. Toutefois celui-ci nécessite une solide expérience, requiert un temps technique conséquent et ne permet pas la distinction entre *E. histolytica* et *E. dispar*. Si des tests antigéniques permettent la détection de certains parasites intestinaux, leurs performances analytiques semblent limitées. Dans ce contexte, des méthodes alternatives reposant sur la PCR ont été progressivement développées.

La PCR multiplex G-DiaParaTrio (Diagenode®) permet la détection simultanée de *G. intestinalis*, *C. parvum*, *C. hominis* et *E. histolytica*. Pour cette étude, la PCR multiplex couplée à une extraction automatisée a été comparée aux techniques de référence basées sur l'examen microscopique et sur la détection de l'adhésine d'*E. histolytica* par technique ELISA. Une collection de 185 prélèvements de selles, comprenant 135 échantillons positifs et 50 négatifs, a été constituée de manière multicentrique sur une période de 18 mois. Ce panel comprenait 38 *G. intestinalis*, 28 *Cryptosporidium* spp., 5 *E. histolytica* ainsi que 81 échantillons positifs pour d'autres parasites appartenant à 19 genres/espèces distinctes.

La PCR multiplex a montré des sensibilités/spécificités de 92%/100%, 96%/100% et 100%/100% respectivement pour *G. intestinalis*, *C. parvum/hominis* et *E. histolytica*. Aucune réaction croisée ni inhibition de PCR n'a été observée. Si cette technique permet une détection rapide et fiable de ces quatre parasites, la place de cet outil dans l'algorithme diagnostique des parasitoses intestinales est à établir, l'examen microscopique restant indispensable à l'investigation des autres causes parasitaires.

Mots-clés : SELLES, PCR MULTIPLEX, MICROSCOPIE, *GIARDIA INTESTINALIS*, *CRYPTOSPORIDIUM* SPP., *ENTAMOEBAS HISTOLYTICA*

JURY :

Président :

Mr Patrice LE PAPE, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Laboratoire de Parasitologie/Mycologie, Faculté de Pharmacie, CHU de Nantes

Assesseurs :

Mr Didier LEPELLETIER, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Service de Bactériologie - Hygiène Hospitalière, Faculté de Médecine, CHU de Nantes

Mr Guillaume DESOUBEAUX, Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier, Laboratoire de Parasitologie/Mycologie, Faculté de Médecine, CHU de Tours

Mme Marianne COSTE-BUREL, Praticien Hospitalier, Laboratoire de Virologie, CHU de Nantes

Directeur de thèse :

Mr Florent MORIO, Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier, Laboratoire de Parasitologie/Mycologie, Faculté de Médecine, CHU de Nantes

Adresse de l'auteur : 15, rue du plateau – 44770 PREFAILLES