

THESE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
SPECIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Florie BARBA

Le 12 Octobre 2020

**« Évaluation des performances du kit Novodiag® Stool Parasites
dans la détection des protozoaires intestinaux au sein du service de
Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse »**

Directeurs de thèse : Docteur Xavier IRIART et Docteur Pamela CHAUVIN

Jury

Monsieur Le Professeur Guillaume MARTIN-BLONDEL

Monsieur Le Professeur Alexis VALENTIN

Monsieur Le Professeur Antoine BERRY

Monsieur Le Docteur Xavier IRIART

Madame Le Docteur Pamela CHAUVIN

Président

Assesseur

Assesseur

Assesseur

Assesseur



**UNIVERSITÉ
TOULOUSE III
PAUL SABATIER**





TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2019
Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire M. CHAP Hugues
Doyen Honoraire M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard
Doyen Honoraire M. LAZORTHES Yves
Doyen Honoraire M. PUEL Pierre
Doyen Honoraire M. ROUGE Daniel
Doyen Honoraire M. VINEL Jean-Pierre
Professeur Honoraire M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire M. ADER Jean-Louis
Professeur Honoraire M. ARBUS Louis
Professeur Honoraire M. ARLET Jacques
Professeur Honoraire M. ARLET Philippe
Professeur Honoraire M. ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur Honoraire M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire M. BARRET André
Professeur Honoraire M. BARTHE Philippe
Professeur Honoraire M. BAYARD Francis
Professeur Honoraire M. BOCCALON Henri
Professeur Honoraire M. BONAFÉ Jean-Louis
Professeur Honoraire M. BONEU Bernard
Professeur Honoraire M. BONNEVILLE Paul
Professeur Honoraire M. BOUNHOURE Jean-Paul
Professeur Honoraire M. BOUTAULT Franck
Professeur Honoraire Associé M. BROS Bernard
Professeur Honoraire M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire M. CARATERO Claude
Professeur Honoraire M. CARLES Pierre
Professeur Honoraire M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire M. CARTON Michel
Professeur Honoraire M. CATHALA Bernard
Professeur Honoraire M. CHABANON Gérard
Professeur Honoraire M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire M. CHAP Hugues
Professeur Honoraire M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire M. CLANET Michel
Professeur Honoraire M. CONTE Jean
Professeur Honoraire M. COSTAGLIOLA Michel
Professeur Honoraire M. COTONAT Jean
Professeur Honoraire M. DABERNAT Henri
Professeur Honoraire M. DALOUS Antoine
Professeur Honoraire M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire M. DAVID Jean-Frédéric
Professeur Honoraire M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire Mme DELISLE Marie-Bernadette
Professeur Honoraire Mme DIDIER Jacqueline
Professeur Honoraire M. DUCOS Jean
Professeur Honoraire M. DUFFAUT Michel
Professeur Honoraire M. DUPRE M.
Professeur Honoraire M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire associé M. DUTAU Guy
Professeur Honoraire M. ESCANDE Michel
Professeur Honoraire M. ESCHAPASSE Henri
Professeur Honoraire M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire M. FABIÉ Michel
Professeur Honoraire M. FABRE Jean
Professeur Honoraire M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire M. FOURNIE Bernard
Professeur Honoraire M. FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire M. GHISOLFI Jacques
Professeur Honoraire M. GOUZI Jean-Louis
Professeur Honoraire M. GUIRAUD CHAUMEIL Bernard
Professeur Honoraire M. HOFF Jean
Professeur Honoraire M. JOFFRE Francis
Professeur Honoraire M. LACOMME Yves
Professeur Honoraire M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire Mme LARENG Marie-Blanche
Professeur Honoraire M. LARENG Louis
Professeur Honoraire M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire M. LAZORTHES Yves
Professeur Honoraire M. LEOPHONTE Paul
Professeur Honoraire M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire M. MANELFE Claude

Professeur Honoraire M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire M. MASSIP Patrice
Professeur Honoraire Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire M. MAZIERES Bernard
Professeur Honoraire M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire M. MURAT
Professeur Honoraire associé M. NICODEME Robert
Professeur Honoraire M. OLIVES Jean-Pierre
Professeur Honoraire M. PASCAL Jean-Pierre
Professeur Honoraire M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire M. PONTONNIER Georges
Professeur Honoraire M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire M. PRIS Jacques
Professeur Honoraire Mme PUEL Jacqueline
Professeur Honoraire M. PUEL Pierre
Professeur Honoraire M. PUJOL Michel
Professeur Honoraire M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire M. RAILHAC Jean-Jacques
Professeur Honoraire M. REGIS Henri
Professeur Honoraire M. REGNIER Claude
Professeur Honoraire M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire M. RISCHMANN Pascal
Professeur Honoraire M. RIVIERE Daniel
Professeur Honoraire M. ROCHE Henri
Professeur Honoraire M. ROCHICCIOLI Pierre
Professeur Honoraire M. ROLLAND Michel
Professeur Honoraire M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire M. RUMEAU Jean-Louis
Professeur Honoraire M. SALVADOR Michel
Professeur Honoraire M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire M. SARRAMON Jean-Pierre
Professeur Honoraire M. SIMON Jacques
Professeur Honoraire M. SUC Jean-Michel
Professeur Honoraire M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire M. TREMOULET Michel
Professeur Honoraire M. VALDIGUIE Pierre
Professeur Honoraire M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire M. VIRENQUE Christian
Professeur Honoraire M. VOIGT Jean-Jacques

Professeurs Emérites

Professeur ADER Jean-Louis
Professeur ALBAREDE Jean-Louis
Professeur ARBUS Louis
Professeur ARLET Philippe
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur BOCCALON Henri
Professeur BOUTAULT Franck
Professeur BONEU Bernard
Professeur CARATERO Claude
Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CHAP Hugues
Professeur CONTÉ Jean
Professeur COSTAGLIOLA Michel
Professeur DABERNAT Henri
Professeur FRAYSSE Bernard
Professeur DELISLE Marie-Bernadette
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard
Professeur JOFFRE Francis
Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur LARENG Louis
Professeur LAURENT Guy
Professeur LAZORTHES Yves
Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude
Professeur MASSIP Patrice
Professeur MAZIERES Bernard
Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur MURAT
Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur SALVAYRE Robert
Professeur SARRAMON Jean-Pierre
Professeur SIMON Jacques

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie
M. AMAR Jacques	Thérapeutique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion
Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)
M. BOSSAVY Jean-Pierre (C.E)	Chirurgie Vasculaire
M. BRASSAT David	Neurologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique
M. BUREAU Christophe	Hépatogastro-entérologie
M. CALVAS Patrick (C.E)	Génétique
M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie
M. CHAIX Yves	Pédiatrie
Mme CHARPENTIER Sandrine	Médecine d'urgence
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. DEGUINE Olivier (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie
M. FERRIERES Jean (C.E)	Epidémiologie, Santé Publique
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie
M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. GAME Xavier	Urologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie
Mme LAMANT Laurence (C.E)	Anatomie Pathologique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale
M. LANGIN Dominique (C.E)	Nutrition
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne
M. LAUWERS Frédéric	Chirurgie maxillo-faciale
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie
M. MALAUAUD Bernard	Urologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses
M. MAZIERES Julien	Pneumologie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie
M. OSWALD Eric (C.E)	Bactériologie-Virologie
M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie
M. PARINAUD Jean (C.E)	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.
M. PAUL Carle	Dermatologie
M. PAYOUX Pierre	Biophysique
M. PAYRASTRE Bernard (C.E)	Hématologie
M. PERON Jean-Marie	Hépatogastro-entérologie
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie
M. RECHER Christian(C.E)	Hématologie
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile
M. SALLES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie
M. SANS Nicolas	Radiologie
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire
M. TELMON Norbert (C.E)	Médecine Légale
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépatogastro-entérologie

P.U. Médecine générale

M. OUSTRIC Stéphane (C.E)

Professeur Associé de Médecine Générale

Mme IRI-DELAHAYE Motoko

P.U. - P.H.

2ème classe

Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. BONNEVILLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. MARTIN-BLONDEL Guillaume	Maladies infectieuses, maladies tropicales
M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. PAGES Jean-Christophe	Biologie cellulaire
M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme RUYSSSEN-WITRAND Adeline	Rhumatologie
Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

P.U. Médecine générale

M. MESTHÉ Pierre

Professeur Associé Médecine générale

M. ABITTEBOUL Yves

M. POUTRAIN Jean-Christophe

Professeur Associé en Bactériologie-Hygiène

Mme MALAUAUD Sandra

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ALRIC Laurent (C.E)	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice (C.E)	Thérapeutique
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel (C.E)	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis (C.E)	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Héléne (C.E)	Endocrinologie
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. KAMAR Nassim (C.E)	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick (C.E)	Nutrition
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

Professeur Associé de Médecine Générale

M. STILLMUNKES André

P.U. - P.H.

2ème classe

M. AUSSEIL Jérôme	Biochimie et biologie moléculaire
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FARUCH BILFELD Marie	Radiologie et imagerie médicale
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
Mme LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LE CAIGNEC Cédric	Génétique
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. REINA Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve

Professeur Associé de Médecine Générale

M. BOYER Pierre

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN
37, allées Jules Guesde – 31062 Toulouse Cedex

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE- RANGUEIL
133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE cedex

M.C.U. - P.H.

M.C.U. - P.H

M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
Mme BERTOLI Sarah	Hématologie, transfusion
M. BIETH Eric	Génétique
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAGNE Myriam	Ophtalmologie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CHANTALAT Elodie	Anatomie
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
Mme PERROT Aurore	Hématologie
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TRUDEL Stéphanie	Biochimie
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry
Mme DUPOUY Julie

M.C.A. Médecine Générale

Mme FREYENS Anne
M. CHICOULAA Bruno
Mme PUECH Marielle

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
Mme CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DEGBOE Yannick	Rhumatologie
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme FLOCH Pauline	Bactériologie-Virologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GALLINI Adeline	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
M. GATIMEL Nicolas	Médecine de la reproduction
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
M. GUIBERT Nicolas	Pneumologie
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS SCHWALM Françoise	Biochimie
M. MOULIS Guillaume	Médecine interne
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme QUELVEN Isabelle	Biophysique et médecine nucléaire
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
M. YRONDI Antoine	Psychiatrie d'adultes

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel

M.C.A. Médecine Générale

M. BIREBENT Jordan
Mme BOURGEOIS Odile
Mme BOUSSIER Nathalie
Mme LATROUS Leila

Remerciements

A mon président du jury,

Monsieur le Professeur Guillaume MARTIN-BLONDEL, Président du Jury, Professeur Universitaire en Maladies infectieuses et tropicales, Praticien hospitalier de Maladies infectieuses et tropicales.

Je vous remercie d'avoir accepté la présidence de cette thèse et d'avoir accepté de juger mon travail. Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

Aux membres du Jury,

Monsieur Le Professeur Antoine BERRY, Professeur Universitaire, Praticien Hospitalier et Chef de service de Parasitologie.

Vous me faites l'honneur de siéger à ce jury de thèse. Merci pour votre grande implication dans l'enseignement et la formation de parasitologie et mycologie. Soyez assuré de trouver dans ce travail le témoignage de ma gratitude et de mon plus profond respect.

Monsieur Le Professeur Alexis VALENTIN, Professeur Universitaire, Praticien Hospitalier en Parasitologie.

Je vous témoigne toute ma reconnaissance pour avoir accepté de composer ce jury. Recevez mes plus chaleureux remerciements.

Monsieur Le Docteur Xavier IRIART, Maître de Conférence des Universités, Praticien Hospitalier en Parasitologie et Mycologie

et

Madame le Docteur Pamela CHAUVIN, Praticienne Hospitalier en Parasitologie et Mycologie.

Je vous remercie d'avoir dirigé ma thèse et pour vos enseignements au long de mes stages dans ce service.

D'un point de vue personnel j'ai une pensée pour :

Ma mère en tout premier lieu. J'aurais aimé que tu puisses lire cette thèse et assister à ma soutenance enfin de voir une fois encore cette fierté dans ton regard. Pas un jour ne se passe sans que je pense à toi.

Mon père, sans qui tout cela n'aurait pas été possible, et Sabah. Merci pour tout votre soutien pendant ces études et ces années mouvementées.

Hélios, qui m'a permis de surmonter des moments parmi les plus difficiles de ma vie. Tu resteras la plus belle chose qui me soit arrivée. Réhos, évidemment qui m'aide à me lever tôt tous les matins, bien malgré moi.

Ma famille au complet, merci pour votre amour toutes ces années.

Liliana, présente malgré l'éloignement géographique. J'espère assister à ta thèse dans très peu de temps !

Sabine, Yolla et Véronique, l'équipe de choc toujours présentes et de bons conseils. Et surtout toujours disponibles pour se changer les idées autour d'une bonne pizza.

Tristan, une très belle connaissance à laquelle je ne m'attendais pas, et à nos futures plongées à la Réunion !

Alizée, partenaire de galère durant la rédaction de cette thèse et future partenaire de randonnée à la Réunion ! Merci pour ton soutien, surtout durant les dernières semaines avant la soutenance.

Pierre, grâce à qui mon voyage en Jordanie est l'un des plus marquants que j'ai fait.

Gabriela, merci pour ce voyage extraordinaire avec tes cousins.

Tom et Cécile pour leur calme et leur gentillesse à toutes épreuves.

Delphine, Julia, Dorian et Orancie qui ont partagé mes stages et mes nombreuses crises d'hypochondrie passagère.

Thomas, Carole, Mélanie et Pascal, les rencontres les plus incroyables et naturelles que j'ai faites.

Toute l'équipe de Parasitologie et Mycologie, les techniciens et Mesdames Judith Fillaux, Sophie CASSAING et Elena CHARPENTIER. Jamais je n'ai rencontré de techniciens plus adorables et enjoués, particulièrement Cathy : une seconde maman pour nous tous.

On dit qu'après la thèse une page se tourne. Moi je vais fermer le livre, le brûler puis partir loin pour recommencer de zéro.

À ma nouvelle vie !

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES FIGURES	5
TABLE DES TABLEAUX	7
GLOSSAIRE	8
INTRODUCTION	9
PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE	11
1. Généralités sur les protozoaires	11
2. Les protozoaires digestifs retrouvés chez l'Homme	12
3. Pathogénicité des différents protozoaires digestifs.....	13
3.1. Les Amibes	13
3.1.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	13
3.2. Les coccidies	16
3.2.1. <i>Cryptosporidium sp.</i>	16
3.2.2. <i>Cystoisospora belli</i> et <i>Cyclospora cayetanensis</i>	18
3.3. Embranchement des Flagellata (Flagellés).....	20
3.3.1. <i>Giardia sp.</i>	20
3.3.2. <i>Dientamoeba fragilis</i>	22
3.4. Les Ciliés	24
3.4.1. <i>Balantidium coli</i>	24
3.5. <i>Blastocystis sp.</i>	25
3.6. Les microsporidies	27
4. Epidémiologie	30

4.1. Protozoaires digestifs les plus fréquemment retrouvés en France.....	30
4.2. Epidémiologie mondiale.....	32
5. Diagnostic des protozooses dans les selles	35
5.1. Prélèvement	35
5.2. Examen macroscopique	36
5.3. Techniques microscopiques.....	36
5.3.1. Examen direct : Examen direct après coloration, examen direct au MIF	36
5.3.2. Technique de Ziehl Neelsen	39
5.3.3. Technique de coloration à l'Auramine.....	40
5.3.4. Technique de coloration de Weber	41
5.3.5. Techniques diphasiques de concentration	42
5.3.6. Techniques de flottation	45
5.4. Autres techniques.....	48
5.4.1. Culture	48
5.4.2. Technique d'immunofluorescence	48
5.4.3. Détection d'antigènes parasitaires.....	48
5.5. PCR maison	49
5.6. PCR en temps réel commerciales	51
6. Approches innovantes en parasitologie des selles	54
6.1. Principe de l'approche syndromique	54
6.2. Tests unitaires de biologie moléculaire	55
PARTIE II : NOVODIAG STOOL PARASITES.....	56
1. Description de l'instrument Novodiag® Stool Parasites.....	56
2. Description et principe de la cartouche Novodiag® Stool Parasites	58

3.	Préparation de la cartouche Novodiag® Stool Parasites et lancement d'un run	61
3.1.	Phase pré analytique	61
3.2.	Phase analytique : amplification et détection.....	64
3.3.	Phase post analytique : rendu des résultats	65
PARTIE III : EVALUATION DES PERFORMANCES.....		67
1.	Introduction.....	67
2.	Objectif de l'étude.....	68
3.	Matériels et méthodes	69
3.1.	Prélèvements collectés.....	69
3.2.	Méthodes microscopiques de comparaison	70
3.3.	Méthodes moléculaires de comparaison	70
3.4.	Novodiag® Stool Parasites	71
3.5.	Statistiques	71
4.	Résultats	72
4.1.	Description des échantillons de l'étude	72
4.2.	Performances analytiques du test Novodiag® Stool Parasites	74
4.3.	Caractéristiques des échantillons avec résultats invalides.....	81
4.4.	Influence de la conservation des échantillons de selles	82
5.	Discussion	83
5.1.	Sensibilité et spécificité par rapport aux techniques microscopiques....	83
5.2.	Sensibilité et spécificité par rapport aux techniques de biologie moléculaire	85
5.3.	Avantages de l'utilisation de kits de PCR unitaires dans le diagnostic des protozooses.....	89

5.4. Limites de l'utilisation de kits de PCR unitaires dans le diagnostic des protozooses.....	90
5.5. Limites de l'étude	92
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	94
BIBLIOGRAPHIE	96

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Schéma des formes trophozoïte (à gauche) et kystique (à droite) de <i>E. histolytica/dispar</i> et d'une forme hématophage de <i>E. histolytica</i> (au centre)	14
Figure 2: Schéma d'un oocyste de <i>Cryptosporidium sp</i>	17
Figure 3: Schéma d'oocyste de <i>Cyclospora cayetanensis</i> immature (à gauche) et d'oocystes de <i>Cystoisospora belli</i> immature (au centre) et mature (à droite)	19
Figure 4: Schémas des formes trophozoïte (à gauche) et kystique (à droite) de <i>Giardia intestinalis</i>	20
Figure 5: Schéma de la forme trophozoïte de <i>Dientamoeba fragilis</i>	22
Figure 6: Schéma des formes trophozoïte (à gauche) et kystique (à droite) de <i>Balantidium coli</i>	24
Figure 7: Schéma des différentes formes de <i>Blastocystis hominis</i>	26
Figure 8: Schéma d'une spore de microsporidie	27
Figure 9: Prévalence et répartition géographique d'Entamoeba chez l'Homme, déterminées par méthodes moléculaires.	33
Figure 10: Protocole de coloration au MIF	38
Figure 11: Protocole de réalisation de la technique de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981).....	39
Figure 12: Oocystes de <i>Cryptosporidium sp.</i> : coloration par la technique de Ziehl-Neelsen modifiée.....	40
Figure 13: Oocystes de <i>C. parvum</i> : coloration à l'Auramine-Rhodamine	41
Figure 14: Spores de microsporidies dans les selles : coloration de Weber	41
Figure 15: Principe d'une technique diphasique.....	42
Figure 16: Protocole de réalisation d'une technique de concentration (1) et d'une technique de coloration (2)	43
Figure 17: Protocole de réalisation de la technique de Willis.....	45
Figure 18: Protocole de réalisation de la technique de flottation en sulfate de Zinc	46

Figure 19: Protocole de réalisation de la technique OVATEC® Plus	47
Figure 20: PCR temps réel et détection par sondes TaqMan	53
Figure 21: Illustration de l'instrument Novodiag®	57
Figure 22: Description de la cartouche Novodiag® Stool Parasites.....	59
Figure 23: Prélèvement de la bonne quantité de selles sur écouvillon (tube ESwabTM™).....	62
Figure 24: Préparation de la cartouche Novodiag® Stool Parasites	63
Figure 25: Lancement d'un run	64
Figure 26: Analyse automatisée et affichage clair des résultats	65
Figure 27: Détection de <i>D. fragilis</i> , <i>Cryptosporidium sp.</i> et <i>G. intestinalis</i> par le kit Novodiag® Stool Parasites en fonction des Ct mesurés en PCR Amplidiag® Stool Parasites.....	77

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Performances analytiques du kit Amplidiag® Stool Parasites.....	52
Tableau 2: Cibles du Novodiag® Stool Parasites	58
Tableau 3: Descriptif de la population d'étude dans le cadre de l'évaluation du kit Novodiag® Stool Parasites	73
Tableau 4: Sensibilité et spécificité du test Novodiag® Stool Parasites par rapport aux techniques microscopiques utilisées en routine au laboratoire (MIF coloration et Ovatec®)	74
Tableau 5: Sensibilité du test Novodiag® Stool Parasites par rapport aux PCR utilisées en routine au laboratoire (Amplidiag® stool parasite) et PCR microsporidies (PCR <i>Encephalitozoon sp/Enterocytozoon sp</i>)	76
Tableau 6: Détection du genre <i>Cryptosporidium sp.</i> en fonction des espèces et du Ct.....	80
Tableau 7: Caractéristiques de la selle et du run concernant chaque échantillon rendu invalide par le test Novodiag® Stool Parasites	81
Tableau 8: Pourcentage de résultats rendus faussement négatifs et invalides par le test Novodiag® Stool Parasites en fonction du mode de conservation des selles...	82

GLOSSAIRE

ARNr 18S : ARN ribosomal 18S

Ct : Cycle Threshold

EIA : Enzyme immunoassays

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assays

EPS : Examen parasitologique des selles

MIF : Solution de Merthiolate- Iode-Formol

Solution PBS : Phosphate-buffered saline ou tampon phosphate salin

PCR : Polymerase chain reaction ou amplification en chaine par polymérase

Se : Sensibilité

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

Sp : Spécificité

INTRODUCTION

Une partie des protozoaires parasites intestinaux est fréquemment associée à des troubles digestifs persistants, non seulement lors de retour de voyage de région tropicale mais également dans les pays industrialisés. Par conséquent, leur diagnostic est primordial et nécessite le recours à un outil, le microscope optique, apparu au début du 17^e siècle et perfectionné au 19^e siècle. L'examen direct des selles fraîches par microscopie était alors l'examen de choix, le diagnostic définitif reposant sur la mise en évidence du parasite sous forme de kystes, de trophozoïtes ou d'oocystes.

C'est l'inventeur du microscope tel qu'on le connaît aujourd'hui, Antoni van Leeuwenhoek, qui découvre pour la première fois les protozoaires avec le genre *Giardia* sp. en 1681 en examinant ses propres selles. Par la suite, la découverte de l'agent causal de l'amébose en 1875 est attribué au médecin russe Fedor Lösch qui visualise *Entamoeba* dans les selles d'un patient et reproduit la maladie chez le chien après l'ingestion du parasite. Vient ensuite la découverte de *Cryptosporidium parvum* en 1910 par Tyzzer chez la souris (il faudra attendre 1976 pour que la présence de *Cryptosporidium* soit signalée chez l'Homme). Puis en 1927, au Brésil, une microsporidie est identifiée pour la première fois chez l'Homme. Les espèces *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis* furent découvertes respectivement en 1985 par Desportes et en 1992 par Orenstein chez des individus atteints du SIDA.

Malheureusement, la sensibilité et la spécificité de l'examen direct des selles sont variables et dépendent d'un certain nombre de facteurs : la qualité de l'échantillon, le nombre d'échantillons analysés, le cycle excrétoire du parasite, le type de parasite recherché et l'expérience du microbiologiste. De nouvelles méthodes, s'appuyant en premier lieu sur la microscopie (techniques de coloration, milieux de culture pour

protozoaires...) ont été développées pour faciliter le diagnostic des protozooses intestinales. De nos jours, l'arsenal diagnostique s'est étoffé de nouveaux tests plus spécifiques : sérologie, recherche d'antigènes dans les selles, PCR.

Rapidement, ce fut l'avènement des premières techniques de génie génétique. La biologie moléculaire est apparue dans les années 1930, à la suite de la découverte des chromosomes et l'identification de l'ADN comme support de l'information génétique. La PCR permet de dupliquer un grand nombre de fois une séquence d'ADN (ou d'ARN) connue à partir d'une faible quantité d'acides nucléiques. La première technique inventée, nommée PCR en point final (1986), ne mesure la quantité d'ADN formée qu'à la fin de la réaction contrairement à la PCR en temps réel (1992) qui permet d'obtenir une cinétique. C'est cette dernière qui est utilisée pour la détection d'agents pathogènes.

Au fur et à mesure des découvertes, de nouvelles technologies sont devenues disponibles telles que les puces à ADN (ou « microarray » en anglais) qui permirent l'analyse globale du génome de la levure en 1997. Le principe de la puce à ADN repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé simple brin de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est en présence d'un brin complémentaire (une sonde) par réaction d'hybridation.

Ces dernières années des « PCR multiplexe » ont vu le jour, réalisant l'amplification en une seule réaction de plusieurs segments d'ADN distincts. Ainsi, la possibilité de détecter plusieurs pathogènes en un seul test permet une approche syndromique pour le diagnostic rapide des maladies infectieuses.

Dans le cas des infections parasitaires intestinales la société Mobidiag a mis au point un test unitaire permettant la recherche d'un large panel de parasites dans les selles de patients par l'association des techniques de PCR et de microarray : le Novodiag® Stool Parasite. Cette nouvelle méthode moléculaire se veut plus performante dans le but de supplanter l'examen microscopique standard associé aux PCR commerciales ou « maison ». C'est ce que cette étude va déterminer.

PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE

1. Généralités sur les protozoaires

Les protozoaires furent observés pour la première fois il y a plus de 300 ans. Ce sont des êtres unicellulaires appartenant au règne des protistes, mobiles à au moins un stade de leur développement. Ils sont présents sur tous les continents avec une prévalence accrue dans les pays en voie de développement. Ils peuvent être libres ou parasites d'un autre être vivant (mucus pulmonaire, tube digestif ou cellules sanguines de certains animaux).

Dans l'environnement, ils vivent exclusivement dans les eaux salées ou douces ou dans les sols humides. Ils constituent un groupe diversifié de microorganismes dont la plupart ne présentent aucun risque pour la santé humaine.

Parmi les protozoaires du monde vivant certains sont capables de parasiter l'Homme, ils sont classés en trois grands groupes.

Les sporozoaires (protozoaires capables de former des spores) comprennent les coccidies, les cryptosporidies, *Toxoplasma gondii* ainsi que l'hématozoaire *Plasmodium*.

Les rhizoflagellés regroupent les amibes intestinales et libres, les flagellés intestinaux et génitaux, les trypanosomes et les leishmanies.

Balantidium coli, un cilié (protozoaire à cils vibratiles) normalement commensal du porc, du singe et parfois du rat, peut être accidentellement responsable de la balantidiose chez l'Homme, maladie parasitaire des intestins.

2. Les protozoaires digestifs retrouvés chez l'Homme

Parmi les protozoaires parasites de l'Homme, une fraction peut être retrouvée dans le tube digestif et peut entraîner une symptomatologie. Les trois principaux protozoaires intestinaux pathogènes chez l'homme, en termes de fréquence, sont représentés par *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* et *Entamoeba histolytica*. Les deux premiers colonisent le duodénum, le jéjunum et l'iléum et sont les agents les plus souvent responsables de diarrhées persistantes¹. *E. histolytica* colonise quant à lui le colon et peut disséminer aux autres organes après invasion de la paroi colique, principalement le foie, causant l'amibiase.

Les protozoaires mesurent généralement de 10 à 200 µm et peuvent être observables au microscope optique. Certains protozoaires passent par différents stades de vie, du stade prolifératif (forme trophozoïte qui leur permet de se nourrir et se reproduire) au stade de kyste inactif. Cette alternance leur permet de survivre à des conditions difficiles, telles que l'exposition à des températures extrêmes ou de longues périodes sans apport nutritif. Les formes kystiques permettent également la survie à l'extérieur de l'hôte et donc la transmission du parasite.

La transmission des protozoaires intestinaux étant majoritairement liée au péril fécal (contamination oro-fécale par des aliments ou de l'eau souillés par des déjections infestées) la prévention, visant à limiter la transmission des kystes, reste donc essentielle. Elle repose avant tout sur la purification et les traitements des eaux usées et des eaux d'épandage en zone d'endémie, du lavage minutieux des aliments et des mains ainsi que sur la mise au point de méthodes de diagnostic pouvant révéler la présence de kystes y compris chez les porteurs asymptomatiques.

3. Pathogénicité des différents protozoaires digestifs

Nous aborderons dans cette partie, uniquement les protozoaires digestifs les plus fréquemment retrouvés chez l'Homme.

3.1. Les Amibes

3.1.1. *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica est une amibe pathogène parasite du côlon et exclusivement humaine dont le cycle est bien connu.

La forme trophozoïte de 10 à 60 µm, mobile grâce à ses nombreux pseudopodes, utilise des enzymes protéolytiques afin de pénétrer la barrière intestinale. Elle est dite hématophage et sa multiplication rapide entraîne la symptomatologie de l'amœbose (ou amibiase) à l'inverse de *E. dispar* qui est incapable d'envahir les tissus et ne provoquerait donc pas de symptôme.

Les kystes d'*E. histolytica* et d'*E. dispar* étant morphologiquement identiques les deux espèces ne peuvent pas être distinguées au microscope. Lorsque que des kystes sont observés le résultat est rendu en tant qu'infection à « complexe *E. histolytica/E. dispar* ». La distinction entre les deux espèces repose alors sur la détection d'antigènes spécifiques ou sur l'amplification de séquences génomiques spécifiques par PCR. Quant aux trophozoïtes ils peuvent être identifiés comme *E. histolytica* s'ils contiennent des hématies phagocytées ou s'ils sont observés au sein de biopsies ou de pièces opératoires. En dehors de ces situations, il faut également les désigner « complexe *E. histolytica/E. dispar* » (figure 1).

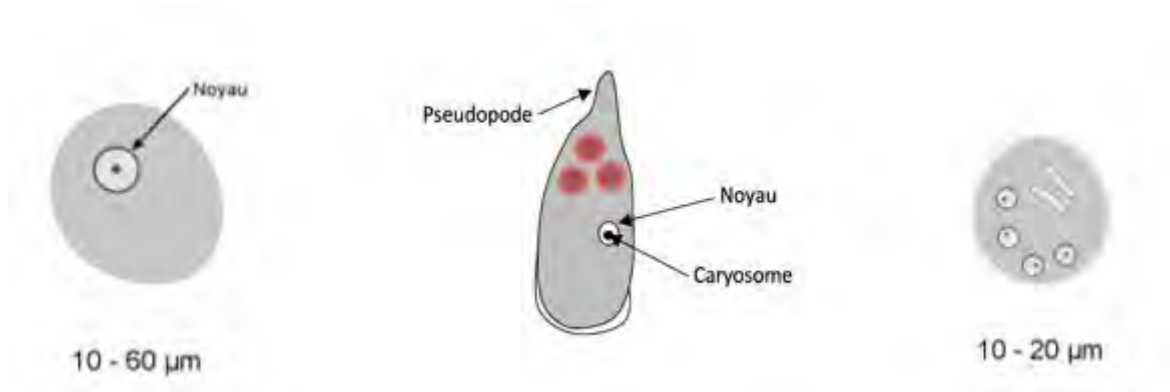


Figure 1: Schéma des formes trophozoïte (à gauche) et kystique (à droite) de *E. histolytica/dispar* et d'une forme hématophage de *E. histolytica* (au centre) (sources : Laboratoire de santé publique du Québec—cahier de stage par K. Thivierge, www.drmicrobe.com)

Les formes végétatives sont très fragiles dans le milieu extérieur et retrouvées uniquement dans des selles diarrhéiques fraîchement émises. Les kystes, de 10 à 20 µm, correspondent à la forme de résistance de l'amibe et sont directement contaminants dans le milieu extérieur. La transmission se fait par contamination oro-fécale, par souillage des aliments ou de l'eau de boisson. La transmission interhumaine peut se faire de façon directe par l'intermédiaire des mains sales ou lors de pratiques sexuelles oro-anales.

La période d'incubation de l'amibiase digestive à *E. histolytica* s'étend de 2 à 4 semaines, avec des extrêmes de quelques jours à plusieurs années en cas de portage chronique. En effet, l'infection par *E. histolytica* est souvent asymptomatique mais peut prendre de nombreux aspects cliniques et entraîner des complications. De la diarrhée légère aux diarrhées douloureuses et sanglantes (dysenterie amibienne), le parasite peut aussi provoquer des ulcères par destruction de la paroi intestinale. Dans les formes plus sévères il parvient à gagner la circulation sanguine et peut entraîner des abcès au niveau du foie, des poumons et du cerveau.

Les amibiases aiguës sont traitées par la prise d'antiparasitaires à large spectre et d'amœbicides de contact agissant localement dans la lumière du tube digestif.

Le traitement de première intention est le Métronidazole (Flagyl®) pour son action amœbicide tissulaire. En cas d'allergie le Tinidazole (Fasigyne®) peut être prescrit. Il s'agit d'un 5-nitro-imidazolé inhibant la synthèse des acides nucléiques parasitaires ou bactériens avec une action systémique permettant le traitement des amœboses intestinales ou hépatiques.

Le Métronidazole est associé au Tiliquinol/Tilbroquinol (Intétrix®), un anti-amibien de contact, dont la concentration reste élevée dans la lumière intestinale car il est peu absorbé. Il prend le relais du traitement par l'amœbicide tissulaire pour éradiquer les kystes et peut dans certains cas être donné isolément chez le porteur asymptomatique d'*E. histolytica*. Le portage d'*E. dispar* ne justifie pas une mise sous traitement.

D'autre part, à l'heure actuelle, il serait plus correct de parler de « complexe *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii/bangladeshi* ». *E. moshkovskii*, indiscernable morphologiquement des autres espèces suscitées, a initialement été isolé dans des eaux usées à Moscou en 1941 et est considéré comme une amibe rarement retrouvée chez l'homme². La première infection humaine connue sous le nom de « souche Laredo » d'*E. moshkovskii* s'est produite dans la ville du même nom au Texas en 1991. Les cas observés à ce jour proviennent d'Amérique du Nord, d'Italie, d'Afrique du Sud et du Bangladesh. Elle peut potentiellement entraîner une symptomatologie digestive³, cependant peu d'études ont effectivement été établies pour identifier la responsabilité de cette espèce en pathologie humaine.

De la même manière *E. bangladeshi*, découverte plus récemment (2010), est morphologiquement identique mais apparaît plus proche génétiquement des espèces *E. histolytica* et *E. moshkovskii* que de l'espèce non pathogène *E. dispar*⁴.

3.2. Les coccidies

3.2.1. *Cryptosporidium* sp.

Les cryptosporidies sont des parasites intestinaux qui infectent nombre d'espèces animales (bovins, moutons, rongeurs, chats et chiens, mais aussi oiseaux, poissons et reptiles). En France entre 2015 et 2017, 66% des cryptosporidioses chez les patients immunodéprimés étaient dues à *Cryptosporidium parvum*, une espèce qui affecte également les animaux domestiques, et 22% à *Cryptosporidium hominis* in-féodé à l'Homme⁵. D'autres espèces sont observées de façon beaucoup plus exceptionnelle (*C. bovis*, *C. felis*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. canis*). En effet de janvier 2006 à décembre 2009, 407 cas de cryptosporidioses ont été notifiés en France et 364 spécimens ont été collectés. Le génotypage de 345 isolats de 310 patients a retrouvé *C. parvum* chez 54,2% des patients, 36,4% de *C. hominis*, 4,8% de *C. felis*, 1,3% de *C. canis*, 3,1% de *C. meleagridis* et 0,33% de *C. muris*⁶.

La transmission de la maladie inter-individuelle ou d'un animal à une personne se fait principalement par l'eau et les aliments contaminés. Les oocystes de *Cryptosporidium* peuvent survivre pendant des mois dans l'eau ou un sol humide et même résister à des conditions environnementales difficiles (chaleur, froid, sécheresses) pendant de longues périodes. Ces oocystes mesurent de 4 à 6 µm, sont de forme arrondie ou ovale et contiennent 4 petits sporozoïtes, mais leur morphologie ne permet pas l'identification d'espèce par microscopie (figure 2).

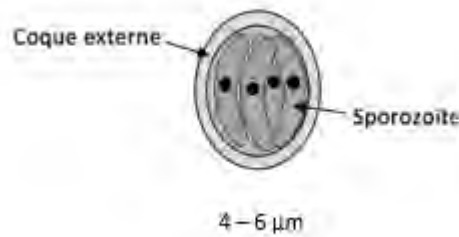


Figure 2: Schéma d'un oocyste de *Cryptosporidium* sp. (Source : www.drmicrobe.com)

Au niveau du tractus gastro-intestinal, les sporozoïtes sont libérés et vont parasiter les cellules épithéliales de la muqueuse gastro-intestinale. Les sporozoïtes mûrent en trophozoïtes, puis en mérozoïtes qui infectent d'autres cellules épithéliales (cette étape, qualifiée de mérogonie, correspond à la reproduction asexuée). Les mérozoïtes initient la reproduction sexuée en donnant naissance à des gamètes qui se développent finalement en oocystes. Environ 20 % des oocystes ont une paroi mince et sont directement impliqués dans le cycle d'auto-infestation de l'hôte ; la majorité des oocystes (environ 80 %) ont une double paroi épaisse et sont évacués avec les selles, contaminant ainsi l'environnement. Ces oocystes à paroi épaisse sont immédiatement infectieux et un petit nombre ingéré suffit à provoquer la maladie.

Ces infections sont fréquemment asymptomatiques, en particulier chez les individus en bonne santé qui peuvent néanmoins, après une période d'incubation d'environ une semaine, développer une diarrhée spontanément résolutive en une à deux semaines. Les formes sévères de la maladie chez l'immunocompétent peuvent toutefois entraîner une diarrhée chronique avec malabsorption.

En revanche, les patients dont le système immunitaire est affaibli peuvent développer une diarrhée aqueuse et abondante, potentiellement délétère et très difficile à traiter avec les médicaments actuellement disponibles.

Ces patients immunodéprimés peuvent également développer une cholangite ou une pancréatite à la suite de l'infection. Certains médicaments ont une activité partielle sur la cryptosporidiose digestive en réduisant la durée des symptômes mais sans permettre chez les immunodéprimés une éradication des parasites. Il s'agit de la Nitazoxanide (Alinia[®], sous ATU nominative) également utilisé dans le traitement de *G. intestinalis*. Un antibiotique de la classe des rifamycines, la Rifaximine (Tixtar[®], hors AMM), serait plus efficace. Toutefois chez les patients immunodéprimés, la restauration de l'immunité (par exemple, traitement antirétroviral chez les patients au stade SIDA de l'infection par le VIH) est le meilleur moyen d'éliminer l'infection par *Cryptosporidium* sp.

3.2.2. *Cystoisospora belli* et *Cyclospora cayetanensis*

Le genre *Cystoisospora*, anciennement appelé *Isoospora*, représente un ensemble de parasites responsables de zoonoses. Chez l'animal les coccidioses à *Cystoisospora* sp. sont fréquentes et graves chez l'individu dont le système immunitaire est immature ou affaibli.

De la même manière, *Cystoisospora hominis* (cosmopolite) et *belli* (en zone tropicale) sont des sporozoaires causant des affections très rares chez l'homme. Ces parasites ont un pouvoir pathogène peu important chez les sujets immunocompétents et peuvent être à l'origine de fièvre et d'entéocolite. Cependant, ils peuvent entraîner des syndromes diarrhéiques graves chez les immunodéprimés avec des déshydratations secondaires potentiellement fatales⁷.

Cyclospora cayetanensis n'a été identifié comme pathogène humain qu'au cours des années 1980, notamment chez les patients infectés par le VIH.

Ces deux agents pathogènes ont plusieurs caractéristiques en commun. Les deux ont des distributions mondiales avec prédominance dans les régions tropicales et subtropicales. Leur transmission se fait par ingestion d'aliments contaminés ou par l'eau potable contaminée par des oocystes matures (figure 3). Ainsi, dans les zones endémiques tropicales ce sont les enfants qui sont particulièrement infectés à cause du péril fécal et du manque d'assainissement des eaux, tandis que les épidémies ponctuelles dans les pays développés sont liées à la contamination de produits frais.

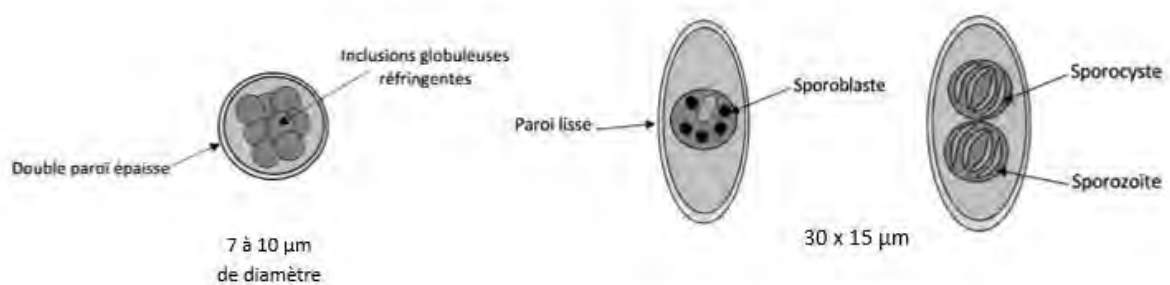


Figure 3: Schéma d'oocyste de *Cyclospora cayentanensis* immature (à gauche) et d'oocystes de *Cystoisospora belli* immature (au centre) et mature (à droite) (source : www.drmicrobe.com)

3.3. Embranchement des Flagellata (Flagellés)

3.3.1. *Giardia sp.*

Giardia sp. est un parasite mobile présentant, dans sa forme végétative, une symétrie bilatérale avec deux noyaux et 8 flagelles. Ils ressemblent de face à un cerf-volant de 10 à 20 μm de long avec une extrémité antérieure large. Ils sont aplatis, la face dorsale étant convexe et la face ventrale concave. Les kystes sont ovalaires, d'environ 8 à 10 μm de long (figure 4).

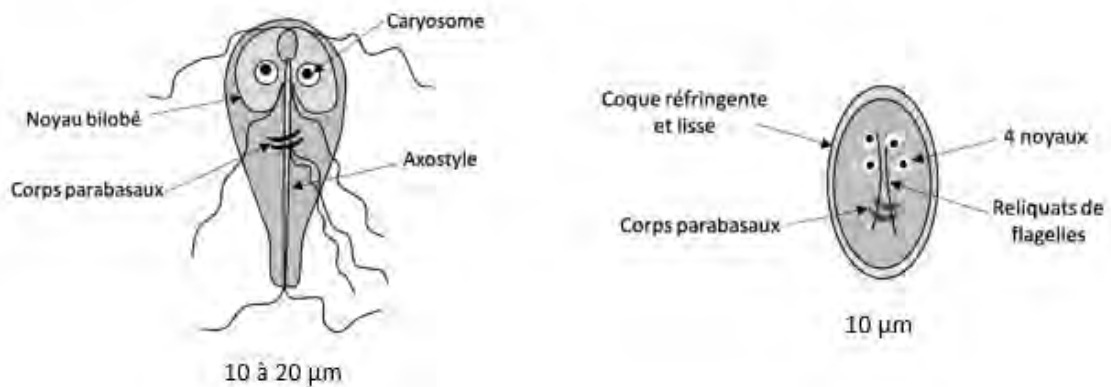


Figure 4: Schémas des formes trophozoïte (à gauche) et kystique (à droite) de *Giardia intestinalis* (sources : www.drmicrobe.com)

Après désenkystement dans le duodénum, les trophozoïtes mobiles se multiplient dans l'intestin grêle où ils adhèrent aux cellules épithéliales de la barrière intestinale. Un trophozoïte de *Giardia* est capable de se reproduire de manière asexuée, une division binaire donnant naissance à deux autres trophozoïtes. En migrant vers le côlon, et sous l'effet de sels biliaires, le trophozoïte subit des changements structuraux et physiologiques importants qui amènent la formation de kystes. Ceux-ci sont infectieux à très faibles doses et sont très résistants aux différents désinfectants.

Le parasite infecte plusieurs mammifères, dont l'homme, le castor, le chat, le chien, le rat musqué ainsi que les bovins, les porcs et les moutons.

Cette espèce peut être désignée par deux synonymes, *G. intestinalis* et *G. lamblia*, mais *Giardia lamblia* est le nom couramment utilisé en milieu clinique ainsi que par l'ensemble des institutions de recherche.

La période d'incubation est très variable, de 3 à 25 jours avec une durée médiane de 7 à 10 jours. Les premiers symptômes cliniques coïncident généralement avec l'excrétion des premiers kystes (issus des trophozoïtes). On note habituellement des nausées, des douleurs épigastriques, de l'anorexie et de la fièvre avec des diarrhées. Dans la majorité des cas, l'infection disparaît spontanément, mais plusieurs personnes souffrent d'accès récurrents qui peuvent persister pendant plusieurs mois.

Les mécanismes de l'infection ne sont toujours pas complètement connus, mais le développement de cette pathologie dépend de plusieurs facteurs. Les principaux signes observés sont des lésions des muqueuses, une atrophie des cryptes, une diminution de la perméabilité des épithéliums et de l'activité de certaines enzymes digestives. Le traitement de choix est le Métronidazole (Flagyl®), un antibiotique antibactérien et antiparasitaire de la famille des nitro-5-imidazolés. Il a néanmoins des effets secondaires importants, notamment d'hémato-toxicité et neuro-toxicité, et des cas de résistance ont été rapportés.

Parmi les complications les plus importantes le patient peut développer un syndrome de malabsorption ainsi qu'une déshydratation. La giardiase peut entraîner d'importantes déficiences nutritionnelles, en particulier chez les enfants des pays en voie de développement. Les pays développés sont également concernés et de nombreux cas ont été associés à des contaminations de l'eau potable.

En effet, compte tenu de la résistance des kystes de *Giardia sp.* à diverses conditions environnementales, il n'est pas surprenant de les retrouver dans les eaux naturelles, les piscines municipales, les lacs récréatifs et les eaux de fontaines. Ainsi, Ehsan *et al.*⁸ ont déterminé en 2015 qu'il existait un risque faible mais significatif d'infection par *Giardia sp.* lors d'une visite de 3,5 minutes dans un parc aquatique pour les enfants.

Par conséquent, le nombre croissant de cas de giardiase liés à la contamination de l'eau potable, l'importance des effets secondaires des traitements, de même que l'émergence de souches résistantes aux médicaments font de la giardiase un sujet d'actualité de plus en plus préoccupant.

3.3.2. *Dientamoeba fragilis*

Malgré son nom, *Dientamoeba fragilis* n'est pas une amibe. Il s'agit d'un protozoaire parasite du colon des mammifères décrit pour la première fois dans la littérature en 1918 par Jepps et Dobell. Il est initialement considéré comme un commensal non pathogène car se nourrit par phagocytose de la flore digestive bactérienne humaine⁹. Seule sa forme végétative, les trophozoïtes de 5 à 15 µm, est retrouvée dans les selles. Ils sont ronds ou ovales, majoritairement binucléés mais peuvent posséder de un à cinq noyaux (figure 5).

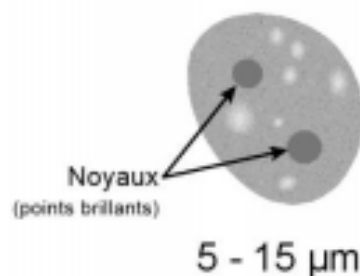


Figure 5: Schéma de la forme trophozoïte de *Dientamoeba fragilis* (source : Laboratoire de santé publique du Québec – cahier de stage par K. Thivierge)

Le mode de transmission de *D. fragilis* est mystérieux mais ces dernières années deux hypothèses ont été avancées. La première suggérait qu'une co-infection entre *D. fragilis* et *Ascaris* ou *Enterobius vermicularis* permettait au protozoaire d'utiliser les œufs de nématode comme vecteur de transmission. Ceci est écartée par quelques études n'ayant démontré aucune corrélation entre les deux phénomènes¹⁰.

Munasinghe *et al.*¹¹ ainsi que Stark *et al.*¹² ont quant à eux décrit un stade kystique du parasite et prouvé son excrétion fécale prolongée sur des modèles murins, soutenant l'hypothèse d'une contamination oro-fécale du parasite. En effet, des souris saines ont pu être infectées par voie orale par des trophozoïtes puis des formes kystiques ont été observées dans leurs excréments de manière intermittente de J1 à six mois après le début de l'étude. Des suspensions de selles de souris contaminées ont ensuite été utilisées pour infecter avec succès des rats sains, qui ont à leur tour excrété des kystes *D. fragilis*. L'étude humaine ensuite réalisée sur des cohortes de patients en Australie et aux Etats-Unis a permis de mettre en évidence de rares kystes présentant des similitudes avec ceux identifiés chez les murins, pour une prévalence de 0.01% de kyste par échantillon de patient. Ces résultats sont cependant critiqués à cause du manque de rigueur en termes de méthodologie et sur le doute concernant les kystes observés qui possèdent une morphologie faiblement similaire à ceux d'*Histomonas*. D'autres études seront nécessaires pour confirmer l'existence et déterminer le rôle des kystes de *D. fragilis*.

Le rôle de ce parasite en pathologie humaine n'est pas encore clairement établi à ce jour mais plusieurs études rapportent un lien avec des symptômes gastro-intestinaux et notamment le syndrome de l'intestin irritable. Le Métronidazole peut alors être prescrit en traitement curatif.

3.4. Les Ciliés

3.4.1. *Balantidium coli*

Le seul représentant du groupe des ciliés en tant que parasite est *Balantidium coli*. Il s'agit d'une zoonose dont le cycle évolutif comporte deux stades. Le stade trophozoïte cilié, ovalaire de 60 à 70 μm sur 50 μm (mais pouvant atteindre jusqu'à 150 à 200 μm de longueur) et entièrement recouvert de cils vibratiles lui permettant de se déplacer par rotation. Il présente également une fente oblique caractéristique au niveau de sa partie antérieure correspondant à un orifice buccal : le cystosome.

Le stade de résistance kystique de 50 à 60 μm de diamètre possède une paroi épaisse et deux noyaux. Les kystes, après ingestion, perdent leur coque libérant des trophozoïtes qui se fixent sur la muqueuse intestinale. Grâce à ces caractéristiques morphologiques, le diagnostic biologique de *B. coli* est facile par l'examen parasitologique des selles (figure 6).

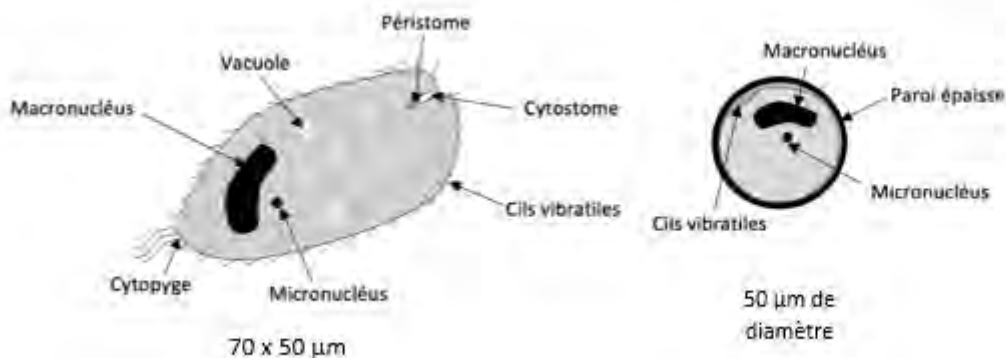


Figure 6: Schéma des formes trophozoïte (à gauche) et kystique (à droite) de *Balantidium coli*. (Source : www.drmicrobe.com)

Ce parasite provoque exceptionnellement des pathologies chez l'homme immuno-compétent, son hôte habituel étant le porc. Par conséquent, sa prévalence est élevée dans les endroits où il y a un contact étroit avec les porcs et leur environnement (élevage, travailleurs des abattoirs, charcutiers). Cette zoonose est cosmopolite mais plus fréquente dans les zones tropicales ou subtropicales (Amérique latine, îles du Pacifique, Philippines, Asie centrale, Iran, Afrique). Comme les animaux, le sujet infesté reste le plus souvent porteur asymptomatique. Dans le cas contraire, après invasion de la muqueuse, les troubles cliniques tels que des diarrhées dysentériques plus ou moins sanglantes peuvent prêter à confusion et orienter vers une amœbose intestinale. Il existe des complications, heureusement rares, pouvant engager le pronostic vital du sujet. En effet, après pénétration dans les vaisseaux lymphatiques, *B. coli* peut coloniser d'autres organes comme le foie, le poumon, la plèvre, l'appendice ou la portion distale de l'iléon, le péritoine, le vagin ou le système nerveux.¹³

Le traitement, à base de tétracyclines en première intention ou de Métronidazole en deuxième intention est très efficace.

3.5. *Blastocystis sp.*

Parasite eucaryote anaérobie du tube digestif de l'Homme et de nombreux animaux, *Blastocystis* est un organisme hautement polymorphe qui prend plusieurs formes au cours de son cycle de vie : vacuolaire, kystique, amiboïde et granulaire (figure 7). En revanche, la place des formes granulaires et amiboïdes dans ce cycle reste un sujet d'interrogation.

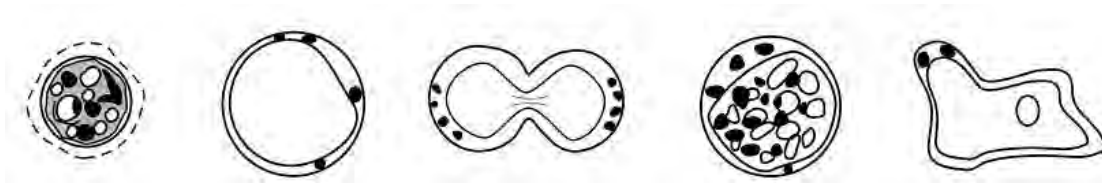


Figure 7: Schéma des différentes formes de *Blastocystis hominis* (de gauche à droite) : kyste, forme vacuolaire, forme en division, forme granulaire, forme amiboïde. (Source : www.cdc.gov/parasites/blastocystis/)

La forme kystique est le stade de transmission, capable de résister dans l'environnement pendant au moins un mois. Une fois ingérés, les kystes vont se désenkyster dans la lumière colique pour donner la forme dite vacuolaire dont le diamètre varie de 2 à 200 μm . Il est probable que cette forme vacuolaire soit le stade actif bien qu'on ne sache pas exactement comment se nourrit le parasite. Cette forme vacuolaire est alors capable de se diviser par fission binaire. En fin de cycle, les formes vacuolaires sont capables de s'enkyster, ce qui permet la dissémination dans l'environnement du parasite et la contamination d'un nouvel hôte. La transmission se ferait par l'intermédiaire des eaux usées et eaux de boissons, mais également via le réservoir animal qui jouerait un rôle non négligeable.

Blastocystis est l'espèce la plus fréquemment isolée dans les selles de patient tout venant mais dont la pathogénicité est discutée. Le parasite peut entraîner une symptomatologie chez les sujets immunodéprimés ou co-morbides. Ces plaintes variées telles que flatulences, diarrhées, nausées et/ou douleurs abdominales modérées sont décrites comme persistantes et intermittentes par le patient. Tout comme *D. fragilis* il existe une relation possible entre les symptômes gastro-intestinaux, dont le Syndrome de l'intestin irritable, chez l'homme sain par ailleurs et la présence de ce parasite dans les selles.

De récentes études sur la diversité génétique de *Blastocystis* reposant sur le séquençage d'un fragment du gène codant l'ARNr 18S ont permis de mettre en évidence de nombreux sous-types (ST) dont neuf ont été identifiés chez l'Homme à ce jour.

Cette nouvelle classification a révolutionné la nomenclature, supprimant le nom d'espèce pour le remplacer par un numéro de sous-type. Par exemple, le *Blastocystis* ST3 est le ST le plus fréquemment retrouvé chez l'être humain. Cette diversité génétique pourrait expliquer la variabilité des symptômes chez les patients infectés, dus à une pathogénicité différente en fonction des sous-types¹⁴.

Le diagnostic de blastocystose repose sur une démarche d'exclusion des autres étiologies possibles. Différentes molécules ont été évaluées pour le traitement de la blastocystose. Le Métronidazole, l'association Triméthoprime/Sulfaméthoxazole (Cotrimoxazole ou Bactrim®) ou le Nitazoxanide peuvent être utilisés chez les patients symptomatiques mais leur succès thérapeutique semble inconstant.

3.6. Les microsporidies

Les microsporidies sont des microorganismes eucaryotes intracellulaires formant des spores qui étaient auparavant classés dans les protozoaires, mais l'analyse génétique indique qu'il s'agit de champignons ou de microorganismes qui leurs sont étroitement apparentés¹⁵.

Leur développement comporte une phase proliférative asexuée et une phase de dissémination sporogonique aboutissant à la formation de spores de 1 à 3 µm selon les espèces. Celles-ci représentent la forme de résistance et de dissémination du parasite (figure 8).

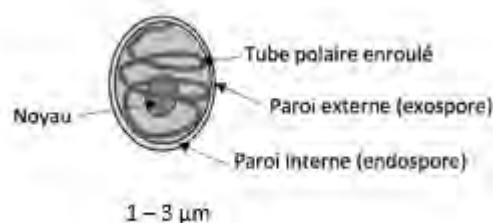


Figure 8: Schéma d'une spore de microsporidie (source : www.drmicrobe.com)

Il en existe plus de mille espèces, parasitant de nombreux hôtes vertébrés et invertébrés, dont seulement quelques espèces sont parasites de l'Homme. Les principales sont *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis* et *Encephalitozoon hellem* qui peuvent être pathogènes opportunistes de l'Homme immunodéprimé sévère, notamment du patient VIH dont le taux de CD4 est très bas (inférieur à 100/mm³).

Enterocytozoon bieneusi a été décrit pour la première fois en 1985 chez un patient infecté par le VIH. Ce parasite se développe exclusivement au niveau de l'intestin grêle et de l'épithélium des voies biliaires. Il s'agit de l'espèce de microsporidies la plus fréquemment rencontrée chez l'Homme. *Encephalitozoon intestinalis* est également un parasite des entérocytes mais il est capable d'infecter d'autres muqueuses, notamment de l'arbre urinaire ou des voies aériennes supérieures.

Le diagnostic des microsporidioses repose sur la mise en évidence des spores dans les produits biologiques ou la recherche de matériel génétique par PCR. L'incidence annuelle et la répartition géographique des microsporidies sont méconnues. Les manifestations cliniques dépendent des espèces infectantes et du niveau d'immunosuppression. Elles vont des troubles hydro-électrolytiques, à une diarrhée aiguë évoluant vers la chronicité avec une malabsorption conduisant progressivement à une cachexie. Pour *E. intestinalis*, on peut observer une dissémination par voie hémato-gène avec atteinte rénale et pulmonaire.

Le traitement des infections dues à *Encephalitozoon bieneusi* est classiquement l'Albendazole (Zentel®), efficace et bien toléré. Pour traiter les infections très symptomatiques à *E. bieneusi* il est possible de prescrire de la Fumagilline (Flisint®) en évaluant la balance bénéfice-risque, cette molécule étant hématotoxique et pouvant entraîner des thrombopénies. Malgré tout, chez les patients dont le déficit immunitaire reste important, des rechutes sont observées après l'arrêt du traitement.

À l'heure actuelle, chez les patients infectés par le VIH, la restauration immunitaire apportée par les traitements antirétroviraux permet de réduire considérablement le risque de rechute et reste indispensable à la prise en charge globale.

En conclusion, le meilleur des traitements de ces différentes infections parasitaires reste la prévention, à la fois individuelle et collective. La prévention collective consiste à protéger les ressources naturelles d'eau de toute contamination fécale animale ou humaine et à s'assurer de la protection et de l'intégrité des réseaux de distribution d'eau potable. Il n'existe malheureusement pas de chimioprophylaxie des cryptosporidioses, microsporidioses et autres infections à protozoaires.

4. Epidémiologie

4.1. Protozoaires digestifs les plus fréquemment retrouvés en France

A l'heure actuelle, nous disposons de très peu d'études récentes sur l'incidence et l'implication des espèces du genre *Entamoeba* chez l'Homme dans les pays d'Europe. Une enquête réalisée au CHU de la Pitié-Salpêtrière entre 2002 et 2006 sur 7301 patients¹⁶, dont 73 % ont été vus consultation au service des maladies infectieuses, montre une prévalence globale de 1,87 % pour *E. histolytica*/*E. dispar* en microscopie optique. L'identification de l'espèce, avec une technique de PCR en point final, a ensuite permis de calculer un taux de prévalence de 0,12 % pour *E. histolytica*. Une étude rétrospective plus récente a été réalisée dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse avec la recherche moléculaire d'*Entamoeba sp.* par PCR sur tous les prélèvements de patients ayant bénéficié d'un EPS entre le 1^{er} juillet 2018 et le 1^{er} juillet 2019, soit 1023 selles de 957 patients. La prévalence globale de la détection d'*Entamoeba sp.*, au niveau digestif chez ces patients était faible (4,6%) et il a été mis en évidence une prévalence de 0,7% pour *E. histolytica*¹⁷.

Concernant l'infection à *Cryptosporidium sp.* en France, très peu de données épidémiologiques sont disponibles. Une étude multicentrique réalisée en 1995 chez des sujets sans contexte pathologique digestif¹⁸ a montré une prévalence de 0.32% chez 932 enfants de crèches hospitalières, de 0.36% chez 831 adultes immunocompétents et de 3.1% chez 618 patients infectés par le VIH, sans distinction de stade.

Selon le rapport annuel du CNR Cryptosporidioses pour l'année 2018¹⁹, en ce qui concerne l'activité de surveillance, 38/53 laboratoires du réseau ont diagnostiqué 323 cas de cryptosporidioses.

Parmi les facteurs de risque identifiés, 24% des patients ont pu contracter l'infection lors d'une baignade, 17% ont contracté leur infection à l'étranger, 14% étaient en contact avec un patient diarrhéique, 11% étaient en contact avec des animaux potentiellement contaminés, et 8% ont pu se contaminer en ingérant un aliment. Enfin, 59% des patients avec une cryptosporidiose déclarée étaient immunocompétents. Parmi les patients immunodéprimés, 58% étaient des transplantés d'organes solides et 15% étaient infectés par le VIH. La moitié des patients ont été hospitalisés et parmi eux 62% l'étaient du fait de leur cryptosporidiose. Trois patients atteints de cryptosporidiose sont décédés. En outre, les observations montrent qu'il existe une saisonnalité des cas avec un pic en fin d'été/début d'automne.

La prévalence du *Blastocystis* chez l'homme varie selon les régions du monde, allant de 0,5 % au Japon jusqu'à 60 % en Malaisie²⁰. De façon générale, cette parasitose est plus fréquente dans les pays en voie de développement. Concernant la France, il existe peu de données épidémiologiques. Des travaux menés en 1999 sur 2 581 patients à Grenoble, ont rapporté une prévalence de *Blastocystis* de 3% par diagnostic microscopique²¹. Cependant il a été montré par la suite que le diagnostic microscopique sous estimait la prévalence de la parasitose. Ainsi, lors d'une étude menée en 2011 à Clermont Ferrand, une prévalence de 14,5 % était rapportée en utilisant un outil de diagnostic par PCR quantitative versus 4,3 % par microscopie²².

4.2. Epidémiologie mondiale

L'épidémiologie de l'amœbose a été bouleversée en 1997²³ avec la reconnaissance de l'espèce *Entamoeba dispar* confondue en microscopie optique avec *Entamoeba histolytica*.

De multiples travaux et méthodes ont permis d'aboutir à la distinction des deux espèces : études des zymodèmes, sondes nucléaires spécifiques, PCR avec amorces spécifiques, RAPD (random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction), analyse de fragments de restriction, utilisation d'anticorps monoclonaux...

À l'échelle mondiale, L'OMS estime qu'environ 500 millions d'individus sont infectés par *E. histolytica/E. dispar* et que 10% de ces individus présentent une amibiase invasive symptomatique. En 2019, un total de 110 études provenant de 47 pays ont été utilisées pour calculer la prévalence mondiale de l'infection à *Entamoeba histolytica/E. dispar*, égale à 3,55 % chez l'homme²⁴. Les prévalences locales peuvent varier considérablement, de 1,72 % en Océanie par exemple à 21,58 % Amérique du Nord (figure 9). En Europe, cette infection parasitaire est surtout observée chez les voyageurs ou les migrants, avec un risque plus élevé pour les destinations en Afrique de l'Ouest, en Afrique de l'Est et en Asie du Sud et du Sud-Est.

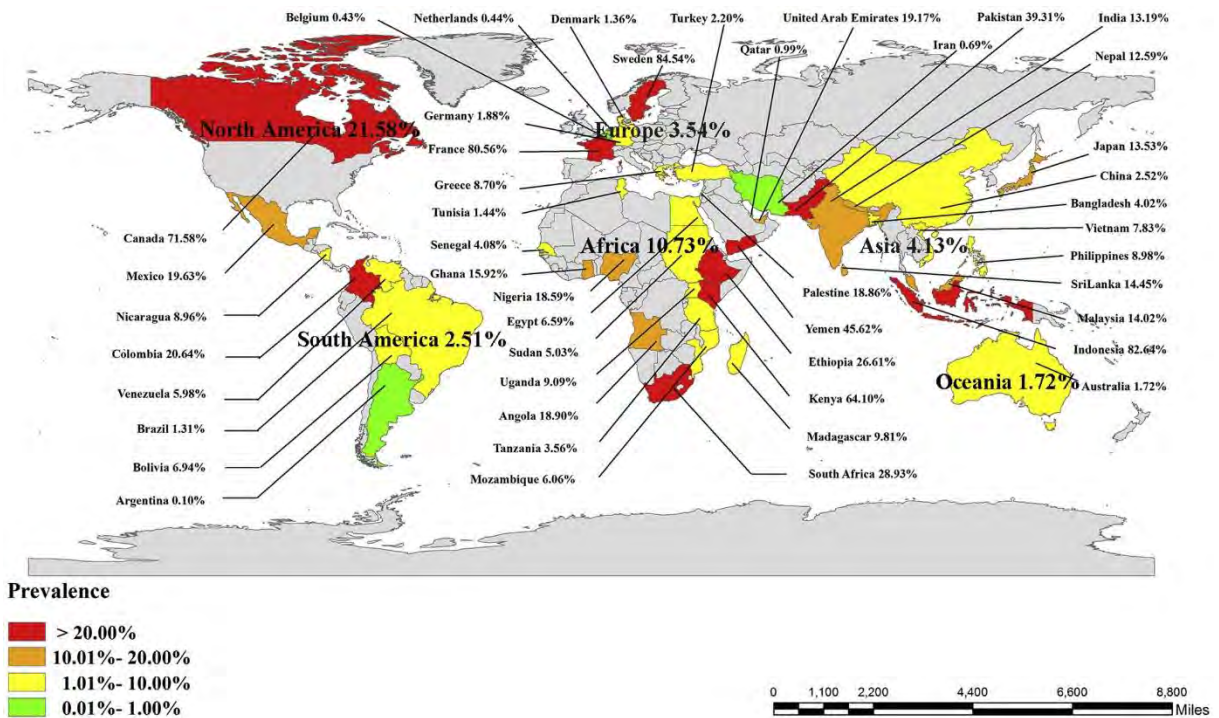


Figure 9: Prévalence et répartition géographique d'Entamoeba chez l'Homme, déterminées par méthodes moléculaires.

Chez l'immunocompétent, en Amérique du Nord et en Europe, la cryptosporidiose est responsable de 0,6 à 2 % (7 % chez les enfants) des cas de diarrhées, alors que dans les pays en voie de développement, elle se situerait entre 4 et 32 %. On observe une variation saisonnière des cas, avec un nombre de cas plus élevé à la fin de l'été et en automne.

Dans les pays développés les principaux individus à risque sont retrouvés dans les hôpitaux, les garderies, parmi les baigneurs (affectant les participants aux sports nautiques dans les lacs et les piscines) et dans les municipalités où l'approvisionnement en eau publique est contaminé. Les systèmes de distribution d'eau sont particulièrement vulnérables à la contamination par *Cryptosporidium sp.* qui peut survivre à la plupart des procédures de désinfection telles que la chloration. La cryptosporidiose est également une pathologie du péril fécal et peut être retrouvée chez les voyageurs de retour de pays étrangers.

Concernant *D. fragilis*, sa prévalence est difficile à quantifier puisque les trophozoïtes dégènèrent en quelques heures après leur excrétion dans les selles. La distribution mondiale varierait considérablement selon les pays, probablement influencée par le niveau d'hygiène et les densités de populations²⁵. Des méta-analyses²⁶⁻²⁷ regroupent les prévalences de *D. fragilis* déterminées par microscopie ou techniques moléculaires (PCR, qPCR) au cours d'étude de cohorte dans de nombreux pays du monde. Les prévalences vont de 0.3% à 52% avec des taux élevés (>20%) en Europe, Moyen-Orient et Amérique du Sud.

5. Diagnostic des protozooses dans les selles

5.1. Prélèvement

L'examen parasitologique des selles est le gold standard pour le diagnostic d'infection parasitaire digestive, notamment à protozoaires, devant des symptômes d'origine intestinale.

Les modalités du prélèvement peuvent différer selon les laboratoires d'analyses et celui-ci peut être réalisé sur place ou au domicile du patient. Le recueil se fait dans un pot stérile à usage unique, d'au minimum une noix de selles (l'équivalent de 20 à 40g de selles à l'aide d'une spatule) et au mieux de la totalité de l'émission, sans les récupérer dans l'eau des toilettes (risque de contamination).

Celui-ci doit être idéalement réalisé avant initiation de tout traitement antiparasitaire et à distance de la prise de laxatifs. Le prélèvement doit être conservé à 15-25°C et acheminé au laboratoire dans un délai inférieur à 2h dans l'idéal. Dans tous les cas le délai maximum autorisé est de 24h à température ambiante. Une baisse de la température du prélèvement risquerait de lyser les protozoaires sous forme végétative (congélation et conservation au frais à proscrire) et une durée de conservation trop longue à plus de 25°C entraîne une dessiccation des selles ainsi que la pullulation d'autres germes (bactéries et champignons) qui pourraient fausser l'examen direct.

En cas de recherche d'amibes, l'analyse ne peut être différée et les selles doivent être acheminées dans les 30 minutes au laboratoire de parasitologie car les formes végétatives sont fragiles et rapidement détruites une fois la selle émise.

Par ailleurs, il est recommandé d'effectuer trois analyses sur des selles recueillies à quelques jours d'intervalle, afin d'augmenter la sensibilité de l'examen du fait de la faible charge de certains parasites et/ou de leur émission intermittente.

5.2. Examen macroscopique

Un examen macroscopique doit être réalisé en premier lieu afin d'apprécier l'aspect visuel des selles. La présence de mucus, de glaires ou de sang doit être particulièrement recherchée pour les protozooses. Outre le diagnostic des protozooses, l'examen macroscopique est également intéressant pour le diagnostic d'helminthiases et peut permettre l'observation d'adultes d'oxyure, d'adultes d'*Ascaris* ou de proglottis de *Taenia sp.* On pourra également noter la présence d'éventuels éléments non parasitaires : résidus d'origines végétale ou animale, desquamation de la muqueuse intestinale, graines.

5.3. Techniques microscopiques

5.3.1. Examen direct : Examen direct après coloration, examen direct au MIF

Pour le diagnostic des protozooses intestinales le but de la microscopie est d'établir avec certitude la présence de parasites dans les selles et de les identifier correctement.

L'identification des formes végétatives et des kystes de protozoaires dans des étalements de selles non colorés est délicate même pour un technicien expérimenté et dans des conditions idéales de collecte et de préparation des prélèvements. Les formes végétatives dégénérant très vite, il faut procéder rapidement pour examiner les prélèvements de selles, préparer les étalements pour la coloration permanente ou conserver le prélèvement dans un fixateur comme le MIF.

Pour chaque technique microscopique, étant donné la faible charge digestive de certains parasites et/ou l'élimination parfois irrégulière des éléments parasitaires dans

les selles, il est important de prélever un échantillon à plusieurs endroits en profondeur et en surface. On privilégiera les zones où des anomalies sont patentes (mucus, sang).

Pour la réalisation d'un examen direct en solution salée isotonique les échantillons de matière fécale seront dilués dans une goutte de soluté NaCl à 9‰ et observés entre lame et lamelle. L'absence de coloration et donc de fixation des protozoaires permet d'observer la mobilité de certaines formes végétatives et leur vitalité. L'addition d'une goutte de solution de Lugol à la préparation fait souvent ressortir d'importants aspects morphologiques des parasites ce qui facilite leur identification. Par exemple *Iodamoeba butschlii* est une amibe non pathogène dont le kyste possède un gros noyau excentré et une vacuole qui se colore en brun avec l'adjonction d'iode.

La technique de Sapero, Lawless et Strome ou « MIF coloration » tient son nom de ses réactifs : Merthiolate au 1/1000^e, Iode sous forme de Lugol à 5% et Formol. Particulièrement adapté pour étudier la structure interne des protozoaires, le MIF est également une solution fixatrice et conservatrice permettant de conserver les éléments parasitaires ou les éléments associés tels que les cristaux de Charcot-Leyden à température ambiante pendant des années. Cette coloration est la meilleure pour l'identification des amibes et des flagellés intestinaux. Il n'existe pas de données de spécificité publiées sur cette technique. En pratique, il y a peu de risque de fausse positivité.

Pour la coloration sur lame on ajoute une goutte de MIF sur une dilution de selles dans de l'eau physiologique préalablement préparée pour un examen direct. Le mélange est ensuite recouvert par une lamelle qui sera lutée avec de la vaseline ou du vernis à ongle et laissé à colorer 20 à 30 minutes avant lecture. Ce mélange n'est

stable que pendant 6 à 8h mais à l'avantage d'augmenter la sensibilité de la recherche d'amibes dans des glaires sanglantes. Les structures nucléaires seront colorées en brun et les vacuoles iodophiles en brun rougeâtre.

Pour la coloration en tube, on mélange 4 gouttes de Lugol et 2,5 mL de solution mère MF ainsi que l'équivalent d'une noisette de selles (soit 0.25g). Après 20 min l'interface liquide-solide est prélevée à l'aide d'une pipette et déposée entre lame et lamelle pour lecture au microscope électronique (figure 10). Les trophozoïtes sont roses et les kystes incolores mais la chromatine des noyaux est visible (réfringente).

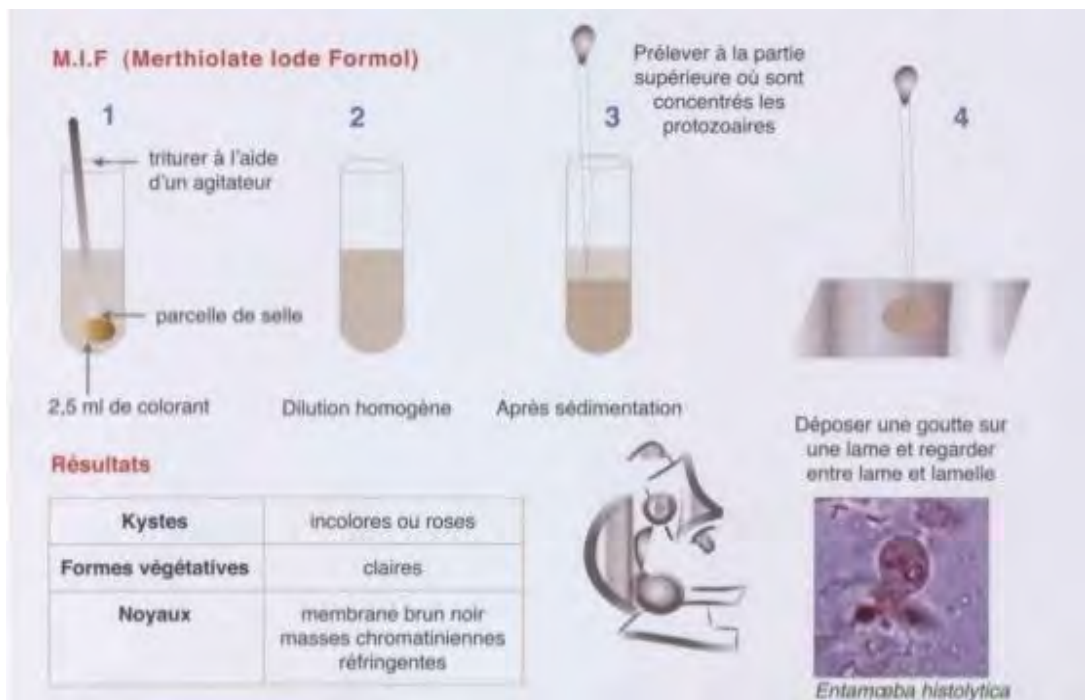


Figure 10: Protocole de coloration au MIF (source : Conduite à tenir devant un prélèvement de selles en parasitologie BENAÏSSA Youssef Université Djilali Liabes Faculté de médecine)

5.3.2. Technique de Ziehl Neelsen

La technique de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz est la méthode de référence pour la détection d'ocystes de *Cryptosporidium sp.* Un frottis en couche mince sur lame est réalisé à partir des selles à examiner puis fixé à l'alcool méthylique, coloré à la fuschine phéniquée et contre coloré au vert malachite. La figure 11 présente la réalisation de la technique en détail. Les oocystes sont colorés en rouge ou en rose sur fond vert ou bleu (figure 12).

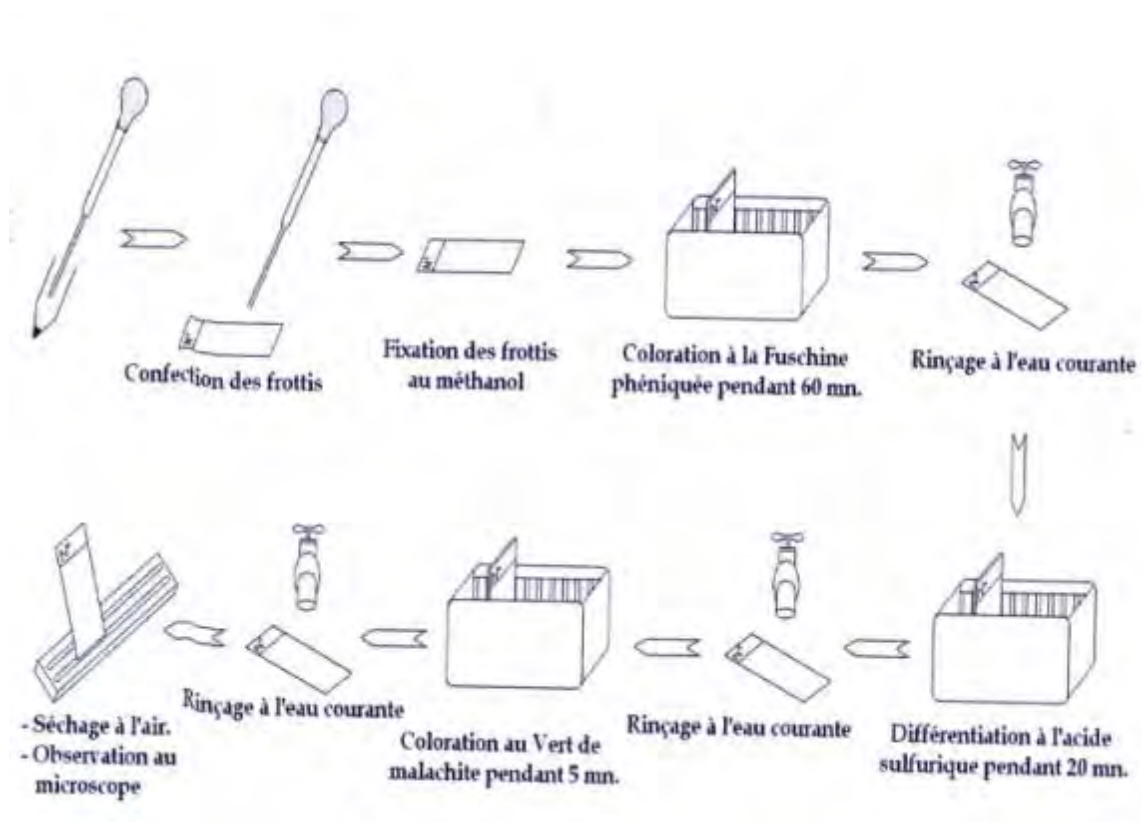


Figure 11: Protocole de réalisation de la technique de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981) (source : thèse universitaire dspace.univ-djelfa.dz:8080/)

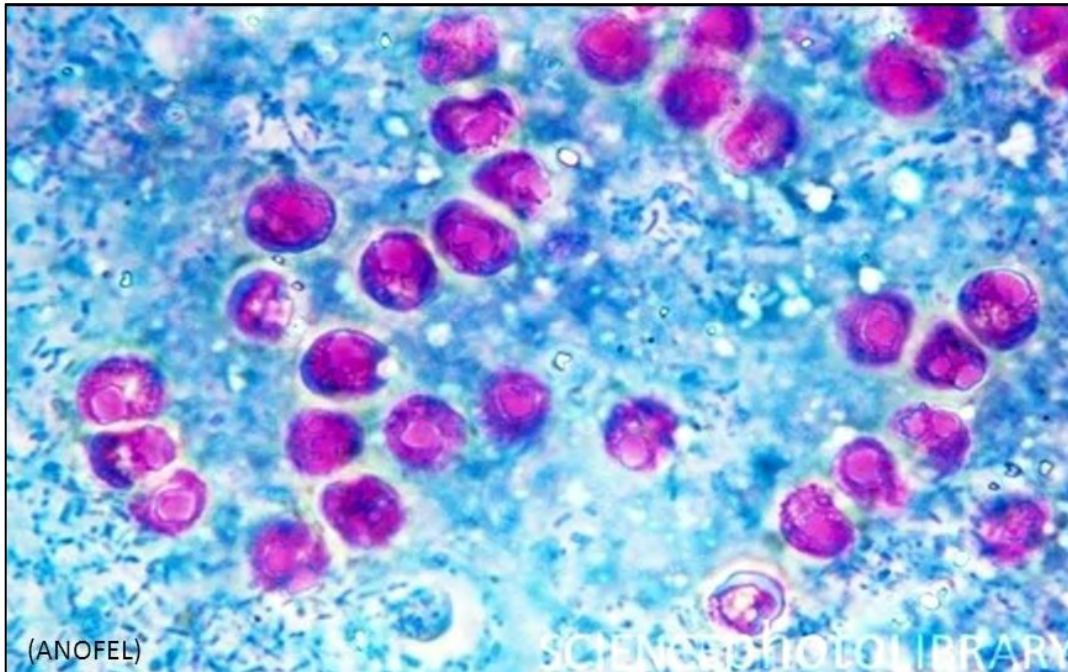


Figure 12: Oocystes de *Cryptosporidium sp.* : coloration par la technique de Ziehl-Neelsen modifiée (source : ANOFEL)

5.3.3. Technique de coloration à l'Auramine

La technique de coloration à l'Auramine est essentiellement utilisée en microscopie à fluorescence. C'est une méthode qui a été décrite par Mansfield en 1970 pour l'identification des mycobactéries et qui a été adaptée par la suite par Heuschele *et coll.* (1986) pour la mise en évidence de *Cryptosporidium sp.* dans les selles. C'est une technique de fluorescence d'orientation très sensible, qui permet de détecter une faible concentration en oocystes. Elle est utile pour éliminer les examens négatifs et présente l'avantage de pouvoir recolorer les frottis par la technique de Ziehl-Neelsen modifiée après avoir repéré les zones suspectes en fluorescence. Cependant, il peut exister quelques difficultés avec des risques de fluorescence aspécifique (certaines spores de levures ainsi que des coccidies du genre *Eimeria* pouvant également émettre une fluorescence). Sous l'effet des rayons ultra-violet, les oocystes du *Cryptosporidium sp.* apparaissent sous forme d'anneaux car la fluorescence est plus intense à la périphérie (figure 13).

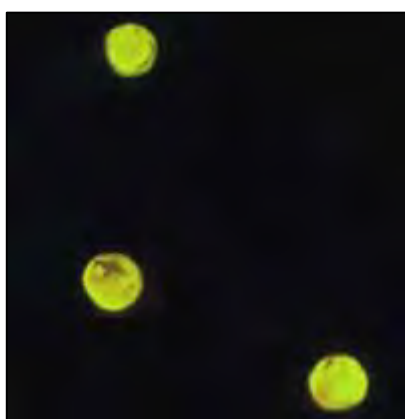


Figure 13: Oocystes de C. parvum : coloration à l'Auramine-Rhodamine (source : www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html)

5.3.4. Technique de coloration de Weber

La coloration de Weber ou coloration au Trichrome de Gomori modifiée est utilisée pour la recherche des microsporidies dans les selles. De lecture difficile, nécessitant une grande expertise et assez chère, elle est peu utilisée. Pour sa réalisation on dilue un volume de selles dans deux volumes de formol à 10%. Ce mélange est étalé sur une lame et coloré pendant 90 min par le colorant de Weber. Les spores de microsporidies apparaîtront roses sur fond bleu (figure14).

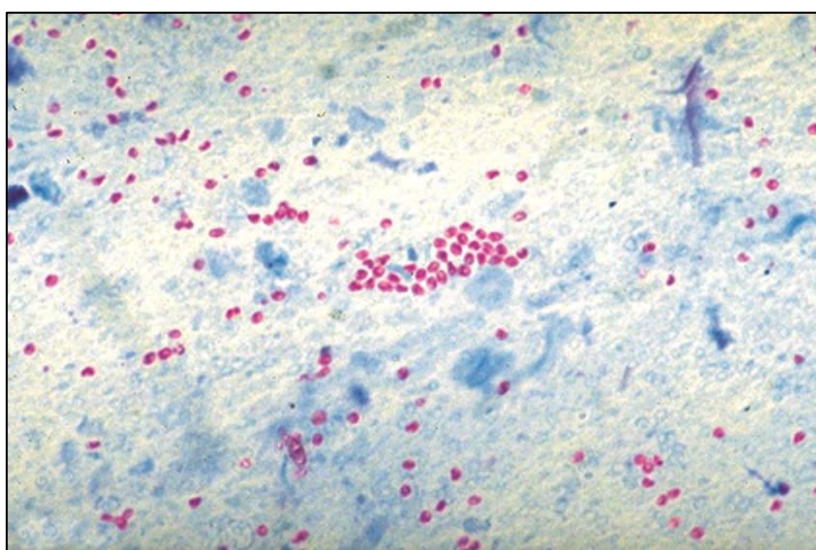


Figure 14: Spores de microsporidies dans les selles : coloration de Weber (source : ANOFEL)

Il est également possible d'utiliser un composé fluorescent (coloration par le Calcofluor White ou l'Uvitex® 2B par fluorescence directe) colorant spécifiquement la chitine de la paroi des spores qui apparaissent bleues sur fond noir. Ces techniques permettent la détection de l'ensemble des genres de microsporidies, en revanche, elles ne permettent pas l'identification spécifique d'espèce nécessaire pour guider la thérapeutique.

5.3.5. Techniques diphasiques de concentration

Ce type de techniques offre la possibilité, à partir de la grande quantité de matières fécales recueillies au départ, de concentrer la charge parasitaire en un petit volume pour faciliter le diagnostic microscopique. Pour ce faire, on joue sur les densités des parasites recherchés et des résidus alimentaires afin d'isoler les premiers et d'éliminer les seconds. Le choix de la technique se fait selon l'espèce de parasite recherchée s'il existe un terrain particulier, ou si l'enquête est générale. L'échantillon fécal est dilué dans une solution aqueuse après élimination des gros débris puis transféré dans un tube conique. La phase organique, de l'éther, est ajoutée (1/3 à 1/2 du volume final) et le mélange est centrifugé. On obtient alors 4 couches (figure 15).

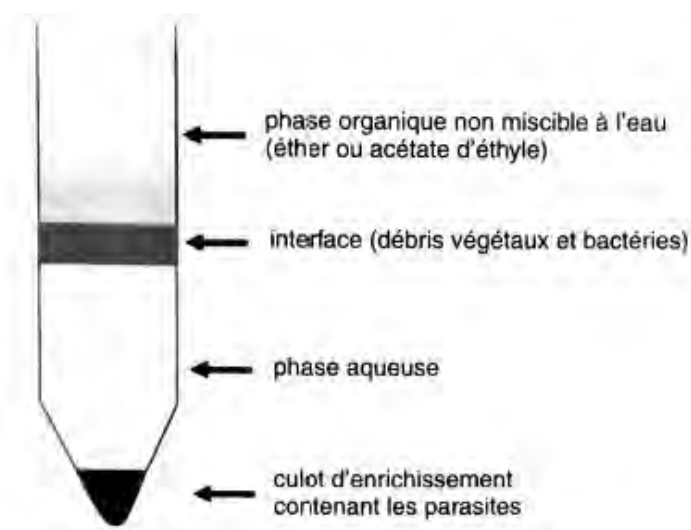


Figure 15: Principe d'une technique diphasique (source : collection ANOFEL, CHU Rouen)

Les éléments possédant majoritairement des groupements hydrophiles se retrouveront dans la phase aqueuse alors que ceux dont la balance penchera vers les groupements lipophiles se dirigeront vers l'éther. Le culot quant à lui contiendra les éléments parasitaires d'intérêt (kystes). Les couches sus-jacentes sont éliminées et le culot est dilué afin de pouvoir être lu (figure 16).

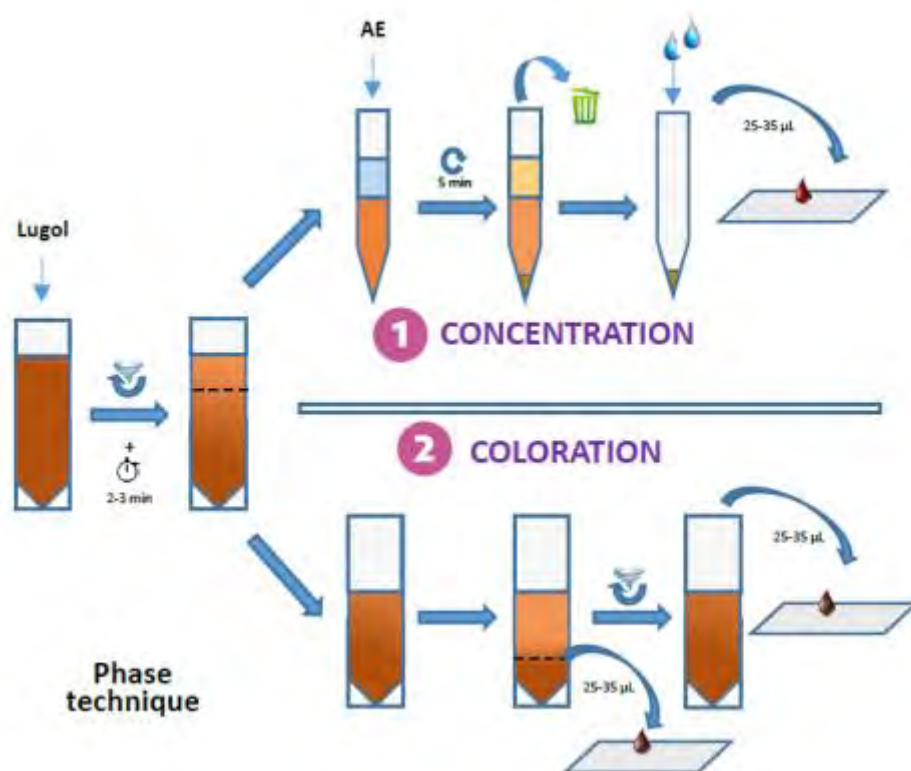


Figure 16: Protocole de réalisation d'une technique de concentration (1) et d'une technique de coloration (2) (source : PARA-SELLES®)

La technique du MIF concentration utilise le MIF en tant que phase aqueuse. On peut y ajouter de façon extemporanée une solution d'iode, d'iodure de potassium et d'eau distillée. Les formes kystiques, les trophozoïtes d'amibes ainsi que les œufs, particulièrement ceux de schistosomes, sont bien concentrés, de l'ordre de 5 à 10 fois selon les parasites.

La technique de Baileger, qui est également une technique diphasique, utilise comme réactif de dilution un tampon acéto-acétique à pH 5. Elle concentre bien les protozoaires et est acceptable pour les œufs et les larves d'helminthes. Cette technique donne des facteurs de concentration de l'ordre de 10 à 20 fois selon les parasites.

La technique de Ritchie modifiée par Allen et Ridley est ancienne et peu utilisée, elle associe une solution de formol et l'éther.

Il existe des techniques de concentration des parasites par filtration utilisant les phases aqueuses des techniques diphasiques (liquide de Baileger, MIF) mais n'utilisant pas de solvant. La concentration est fondée sur le passage de la dilution fécale à travers un filtre pendant la centrifugation. Elles ont l'inconvénient majeur de produire des culots de gros volumes qui devront être observés en totalité (généralement 10 à 30 lamelles). De plus des débris alimentaires peuvent colmater le filtre et empêcher le passage de gros œufs type schistosomes. En revanche contrairement aux techniques diphasiques elles ont l'avantage de préserver les formes végétatives de protozoaires.

5.3.6. Techniques de flottation

Les techniques de flottation sont des techniques de concentration basées sur la différence de densité entre le liquide de dilution et les éléments parasitaires.

La densité du liquide utilisé étant supérieure à celle des éléments parasitaires, ceux-ci se concentrent en surface. Il s'agira :

- Soit d'une flottation passive et les éléments parasitaires seront récupérés par adhésion à une lamelle de verre posée sur le ménisque formé par la dilution fécale au sommet du tube
- Soit d'une flottation après centrifugation et dans ce cas quelques gouttes seront prélevées en surface pour être observées.

Ces techniques, effectuées sur selles natives, sont très utiles pour la concentration des œufs d'helminthes mais ne sont pas les techniques de choix pour l'observation des formes végétatives et kystes de protozoaires.

La Méthode de Willis est simple d'utilisation en routine. Une noisette de selles (0,25g) est diluée dans une solution saturée de NaCl à 25% (densité = 1,20) et les éléments d'intérêt sont récupérés après une flottation passive de 15 à 30 min (figure 17). Cette technique est utilisée pour la concentration des œufs.

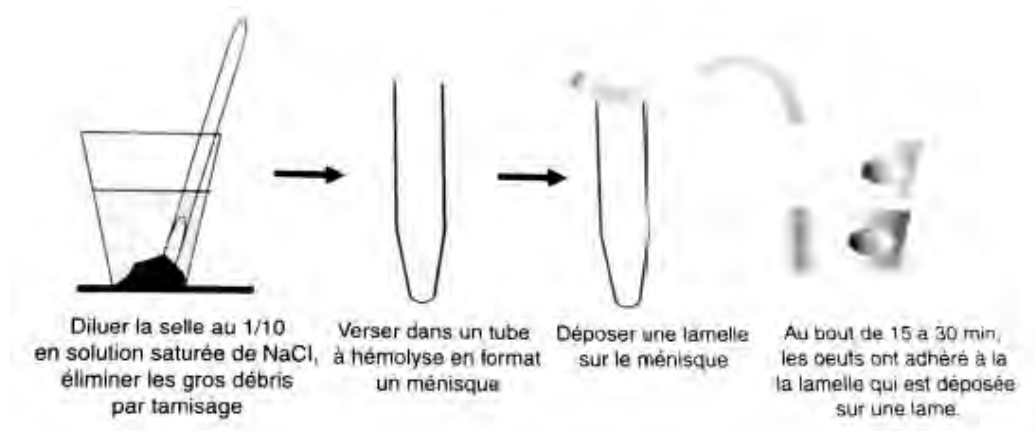


Figure 17: Protocole de réalisation de la technique de Willis (source : collection ANOFEL, CHU Rouen)

La Méthode de Faust et ses dérivés utilise une solution de sulfate de zinc à 33% (densité = 1,18) comme solution de dilution (figure 18). L'observation permet de mettre en évidence les œufs de nématodes, vers ronds, vers plats et les larves de nématodes.

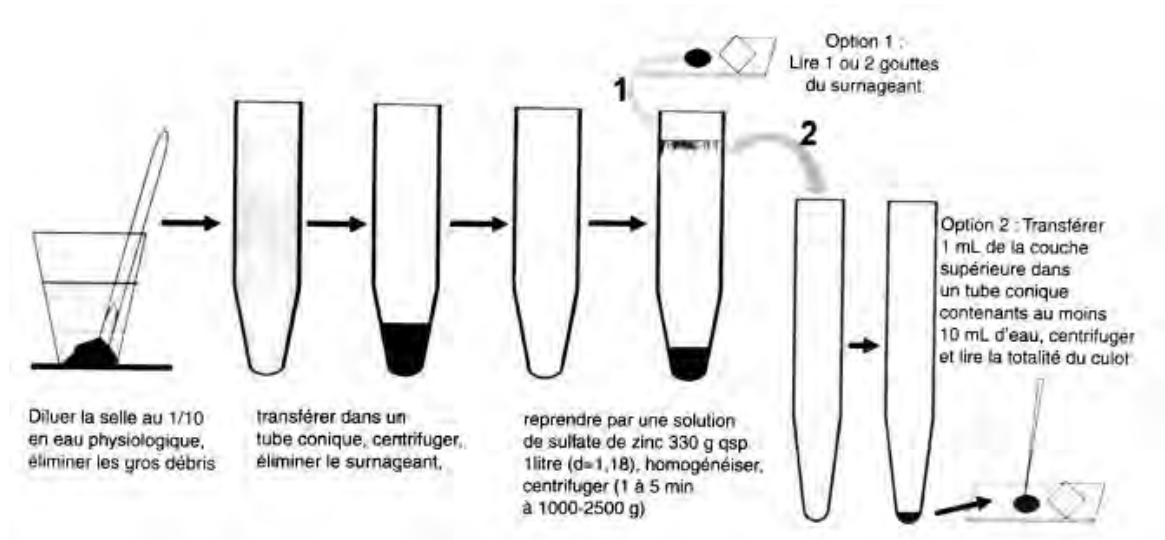
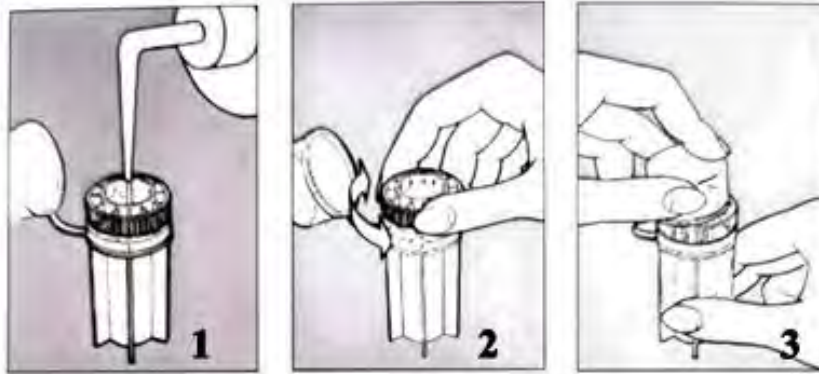


Figure 18: Protocole de réalisation de la technique de flottation en sulfate de Zinc (source : collection ANOFEL, CHU Rouen)

L'OVATEC® Plus, utilisé au CHU de Toulouse, est un dérivé de la méthode de flottation de Faust (figure 19). Il s'agit d'un système commercialisé par Zoetis, une entreprise pharmaceutique vétérinaire. Il est employé en médecine vétérinaire pour le diagnostic coprologique rapide des nématodoses, des cestodoses et des protozooses (observation des kystes). Il est habituellement utilisé chez les équidés, les ovins, les caprins, les chiens et les chats.



Remplir la cavité du dispositif en l'appliquant sur les matières fécales puis replacer l'insert-filtre.

1 : Avec l'insert-filtre en place, ajouter la solution de sulfate de zinc OVATEC® jusqu'à ce que le niveau de fluide atteigne environ la moitié de l'appareil.

2 : Mélanger en faisant pivoter l'insert-filtre dans le dispositif pour mélanger les selles avec le sulfate de zinc.

3 : A l'aide du bord inférieur du bouchon, appuyer sur l'insert-filtre jusqu'à ce qu'il soit correctement enfoncé dans le dispositif.



4 : remplir soigneusement le dispositif à ras bord avec la solution de sulfate de zinc jusqu'à la formation d'un ménisque.

5 : Recouvrir le ménisque avec une lamelle de verre pendant 10 minutes

6 : Placer la lamelle de verre sur une lame pour l'examen microscopique.

Fermer le bouchon hermétiquement pour une élimination facile.

Figure 19: Protocole de réalisation de la technique OVATEC® Plus (source : OVATEC® Plus – Instruction Sheet)

5.4. Autres techniques

5.4.1. Culture

La détection d'*Entamoeba sp.*, de *Dientamoeba fragilis* ou encore de *Blastocystis sp.* peut être améliorée par la réalisation de cultures de selles fraîches incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Ces cultures sont néanmoins très peu utilisées.

5.4.2. Technique d'immunofluorescence

Il existe une technique d'immunofluorescence permettant la détection et l'identification des deux espèces de microsporidies les plus fréquemment responsables d'infections intestinales, *E. bienewisi* et *E. intestinalis*, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux (6E52D9 et 3B82H2) couplés à un fluorochrome (isocyanate de fluorescéine, FITC) et dirigés contre les antigènes de paroi des spores²⁸.

D'autres colorations par immunofluorescence existent pour diagnostiquer une infection à *Cryptosporidium sp.* et *Giardia sp.*, utilisant des anticorps marqué à la fluorescéine. Un des kits utilisés dans la littérature est le kit commercial Merifluor® de Meridian Diagnostics. Il a été mis au point pour la détection des deux principales espèces de *Cryptosporidium* retrouvées chez l'homme : *C. hominis* et *C. parvum*. D'autres auteurs ont également rapporté la visualisation d'oocystes appartenant à d'autres espèces²⁹.

5.4.3. Détection d'antigènes parasitaires

Il est également possible de détecter certains antigènes parasitaires dans les selles. Dans le cas de *Cryptosporidium sp.* par exemple plusieurs méthodes sont disponibles : tests ELISA, tests de diagnostic rapide immunochromatographiques (TDR).

Le test de choix actuel pour l'immunodétection des antigènes de surface est réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux et offre une sensibilité accrue par rapport aux

techniques de coloration acido-résistante. La sensibilité est de 65 à 100% pour les TDR (plus sensible pour *C. parvum* que pour *C. hominis*) et de 70 à 100% pour les tests ELISA³⁰. La spécificité est comprise entre 97 et 100% pour les TDR, et entre 94 et 100% pour les tests ELISA.

De même des kits EIA sont disponibles dans le commerce pour la détection des antigènes fécaux pour le diagnostic de l'amibiase intestinale. En effet, les formes d'*E. histolytica* pathogène et d'*E. dispar* non pathogène étant morphologiquement identiques il est indispensable d'avoir recours à une technique permettant de déterminer quelle est l'espèce retrouvée dans les selles et son implication dans la symptomatologie du patient. Prenons par exemple le TechLab® *Entamoeba histolytica* II dont la méthode de détection est colorimétrique et donne un résultat qualitatif. Ce test utilise des anticorps monoclonaux qui détectent une protéine d'adhérence, la lectine Gal/GalNAc, uniquement présente chez *E. histolytica*.

Enfin, on trouve plusieurs kits de tests combinés d'immunochromatographie présentant des bandes recouvertes d'anticorps spécifiques aux antigènes de *Cryptosporidium sp.* (protéine disulfide isomérase), de *G. intestinalis* (alpha-1-giardine) et du complexe *E. histolytica/E. dispar* (antigène de surface de 29 kDa).

5.5. PCR maison

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région précise d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Il existe des PCR spécifiques (trousses commerciales ou « home made ») d'un genre ou d'une espèce pour les parasites fécaux lorsqu'il existe une présomption clinique forte, par exemple pour *Cryptosporidium sp.*³¹ ou *Entamoeba histolytica/dispar*³².

Dans le cas de *Cryptosporidium sp.*, Mary C *et al.* en 2013³¹ ont comparé deux nouvelles PCR de détection en temps réel dans un essai multicentrique. La première, utilisant une sonde TaqMan, permet de détecter la présence de *Cryptosporidium sp.*

par l'amplification d'un fragment du gène de l'ARNr 18S (GenBank no. EU675853.1, positions 33 à 211). Il s'agit d'une « PCR pan-cryptosporidies ». La seconde, PCR utilisée en duplex, permet de différencier *C. hominis* et *C. parvum* au moyen de deux sondes d'hybridation (FAM-ATCACAATTAATGT-MGB-BHQ pour *C. hominis* et la 6-carboxyrhodamine (VIC)-ATCACATTAATGT-MGB- BHQ pour *C. parvum*).

Il existe de nombreuses PCR permettant la détection et la discrimination de *E. histolytica* et *E. dispar*. La plupart d'entre elles ciblent soit le gène de l'ARNr 18S soit les répétitions épisomales spécifiques à une espèce donnée (PSP5/PSP3, NPSP5/NPSP3). Trois protocoles (détection par SYBR Green, sondes d'hybridation LightCycler, ou sondes TaqMan 1 ou TaqMan 2) ont été comparés par Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, *et al.* en 2005³². Les échantillons testés correspondaient à des selles enrichies en trophozoïtes d'*E. histolytica* obtenus par culture, à différentes concentrations. Les résultats ont montré une supériorité en termes de sensibilité des essais basés sur l'utilisation de sondes (soit le LightCycler et les deux essais TaqMan). Le test SYBR Green était le moins sensible des tests en PCR temps réel mais avait néanmoins une sensibilité environ 10 fois plus élevée que la PCR conventionnelle. De la même manière la spécificité des tests à différencier les deux espèces *histolytica* et *dispar* s'est révélée meilleure en LightCycler et TaqMan par rapport à la PCR conventionnelle et par SYBR Green.

5.6. PCR en temps réel commerciales

Il existe de nombreux kits de PCR commercialisés permettant l'amplification et la détection simultanées de protozoaires dans les selles (*Entamoeba histolytica*, *Giardia sp.*, *Cryptosporidium sp.*, *Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis*, *Cyclospora cayetanensis*). Pour cela plusieurs sondes sont utilisées avec des séquences d'acides nucléiques cibles différentes et des fluorophores distincts avec des couleurs d'émission différentes. L'avantage de ces PCR dites multiplexes est la réduction du coût et la diminution du temps de réalisation et d'analyse des résultats. Cependant le choix des couples d'amorces reconnaissant les différents segments d'ADN de toutes les cibles doit être rigoureux et prendre en compte les différentes températures optimales d'hybridation et d'élongation de chacune des réactions de PCR.

Au sein du service de Parasitologie et Mycologie du CHU de Toulouse, une détection de 4 protozoaires par PCR, via le kit Amplidiag® Stool Parasites de Mobidiag, est systématiquement incluse dans tout EPS. Il s'agit d'une PCR multiplexe de détection et d'amplification de l'ADN de *Giardia intestinalis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cryptosporidium sp.* et d'*Entamoeba histolytica*. C'est une PCR en temps réel par hybridation de sondes fluorescentes TaqMan dont le résultat rendu est qualitatif : présence ou absence d'ADN pour chaque parasite. Les caractéristiques de cette PCR sont réunies dans le tableau 1.

Espèces	Gène cible	Sensibilité	Spécificité
<i>Giardia intestinalis</i>	ARN ribosomal 18S	100%	98,6%
<i>Entamoeba histolytica</i>	ARN ribosomal 18S	100%	100%
<i>Dientamoeba fragilis</i>	ARN ribosomal 18S	87,5%	99%
<i>Cryptosporidium sp</i>	COWP	100%	100%

Tableau 1: Performances analytiques du kit Amplidiag® Stool Parasites³³

Dans la PCR en temps réel, l'amplification de l'ADN est mesurée en « continu » par le signal de fluorescence généré à chaque fin de cycle qui est proportionnel à la quantité de produits PCR. Cette fluorescence est générée par des sondes TaqMan spécifiques de la séquence recherchée (les plus utilisées actuellement en France). Ces sondes sont des oligonucléotides d'ADN simple brin, marqué à leur extrémité 5' par un fluorophore (Reporter) et à leur extrémité 3' par une molécule extinctrice (Quencher) qui éteint la fluorescence.

Après l'hydrolyse de la sonde par la Taq polymérase au cours de la phase d'extension du nouveau brin d'ADN, le fluorophore est libéré de sa molécule extinctrice et émet une fluorescence qui peut être quantifiée (figure 20).

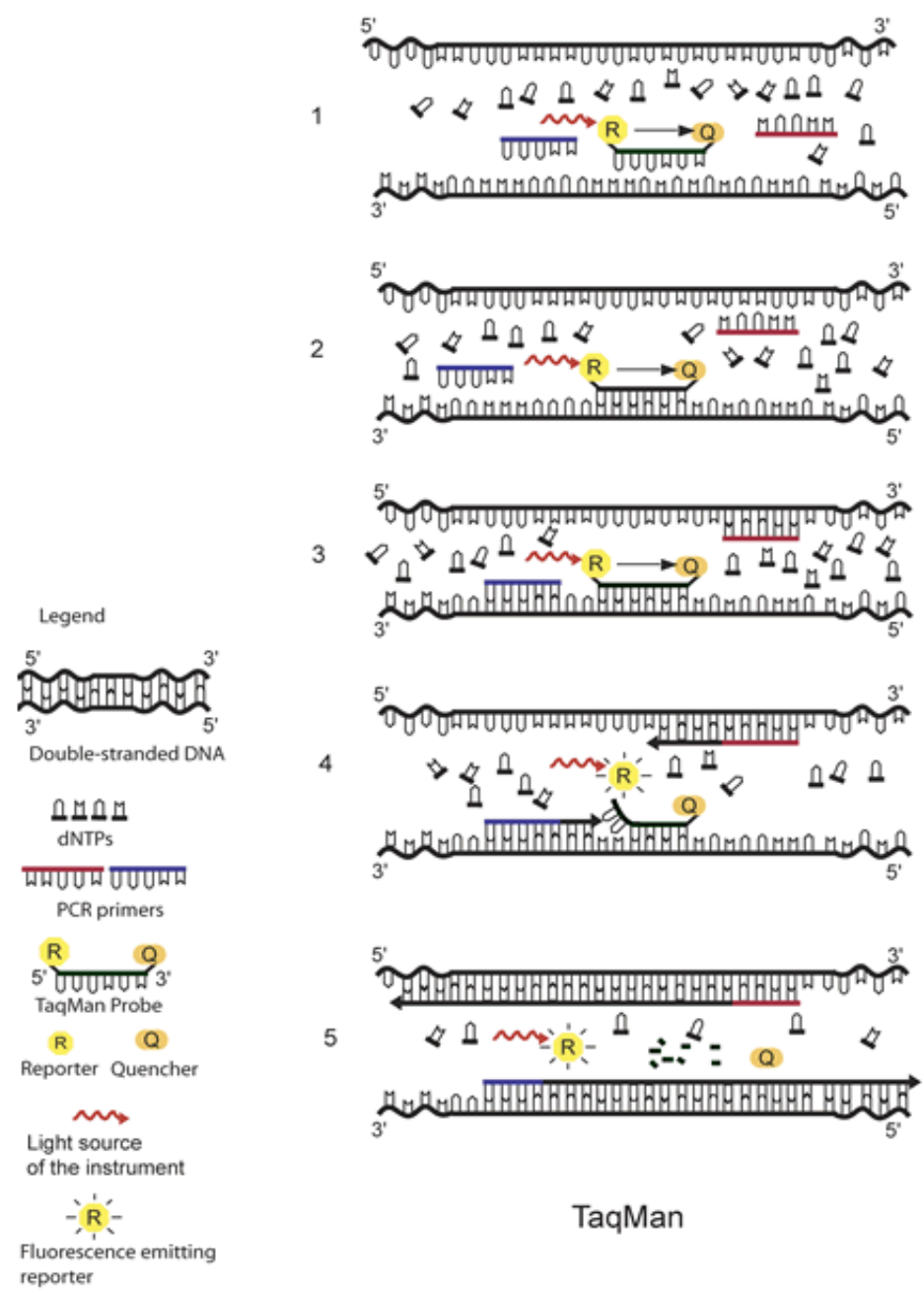


Figure 20: PCR temps réel et détection par sondes TaqMan³⁴

6. Approches innovantes en parasitologie des selles

6.1. Principe de l'approche syndromique

L'approche syndromique consiste en la recherche simultanée en un seul test des différents microorganismes (bactéries, virus, levures, parasites) pouvant être impliqués dans une infection, lorsqu'un patient présente des symptômes cliniques non spécifiques d'un pathogène. Reposant sur la biologie moléculaire, elle est particulièrement adaptée à l'urgence, notamment en cas d'infections méningo-encéphaliques, respiratoires et gastro-intestinales.

Les avantages de cette approche en parasitologie des selles, outre le gain de temps technique évalué à 5 min par échantillon, sont la rapidité de la technique (avec un rendu de résultat en quelques heures contre 24 à 72h), la maîtrise du processus analytique, la réduction du coût en personnel. La technique de biologie moléculaire est également plus sensible et permet la détection de co-infection dans un même prélèvement. Cependant ces techniques de génie génétique ont un coût supérieur.

A l'heure actuelle, aucun test syndromique digestif ne permet de détecter l'ensemble des parasites intestinaux impliqués en pathologie humaine.

6.2. Tests unitaires de biologie moléculaire

De nouveaux systèmes de biologie moléculaire sont entièrement automatisés et permettent d'éliminer l'intervention humaine à partir du placement de l'échantillon dans l'automate jusqu'à l'obtention des résultats. Les prélèvements de départ peuvent être variés dans une même série (écouvillons, prélèvements respiratoires, urine, LCR, selles...).

L'échantillon de départ est placé dans un tampon puis transféré dans la cassette dans laquelle les différentes méthodes sont appliquées : lyse cellulaire, extraction et concentration des acides nucléiques, réhydratation des réactifs, amplification de l'ADN cible et détection en utilisant une technique PCR et les sondes présentes à l'intérieur de la cassette. Chaque test unitaire inclut également un contrôle interne.

Une nouvelle PCR multiplexe basée sur l'utilisation de cassettes individuelles et permettant le diagnostic d'un large panel de protozoaires intestinaux dans les selles a été mise au point par la société Mobidiag : le test Novodiag® Stool Parasites. L'évaluation des performances a débuté à la fin du mois de Novembre 2019 dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse.

PARTIE II : NOVODIAG STOOL PARASITES

1. Description de l'instrument Novodiag® Stool Parasites

La plateforme Novodiag® est un système de diagnostic moléculaire entièrement automatisé, permettant de rechercher simultanément et en un seul test un ensemble de microorganismes.

L'instrument Novodiag® est composé d'un module compact pouvant aisément tenir sur une paillasse de laboratoire : le module mesure 50 cm de longueur, 30 cm de profondeur et 24 cm de hauteur. Chaque module possède quatre emplacements indépendants (ou slot) permettant une utilisation en « random access » et il est possible d'empiler jusqu'à quatre modules pour s'adapter au débit des échantillons à traiter.

Un écran tactile permet l'utilisation du logiciel qui est bien optimisé, intuitif et accessible à tout le personnel de laboratoire. Celui-ci mesure 30 cm de hauteur et peut être placé au-dessus du module. Enfin, une douchette permet de transmettre au logiciel les informations sur la nature de la cartouche et les données patient (figure 21).



Figure 21: Illustration de l'instrument Novodiag® (source : Mobidiag)

Cet instrument utilise des tests unitaires et permet le diagnostic moléculaire *in vitro* de maladies infectieuses (bactérienne, virale ou parasitaire) ou de résistance à certains antibiotiques selon la cartouche utilisée. Chaque échantillon est placé dans une cartouche jetable et permettra une recherche multi-cibles. La manipulation pré analytique est rapide et nécessite moins de 10 minutes. La phase analytique de détection des acides nucléiques combinant les technologies de PCR et de puces à ADN (microarray) permet également une analyse rapide (résultats obtenus après un run d'environ 90 min) de façon totalement automatisée. Le rendu des résultats post analytique est qualitatif.

2. Description et principe de la cartouche Novodiag® Stool Parasites

La cartouche Novodiag® Stool Parasites est le 4^e test développé sur la plateforme Novodiag®, après les tests *C. difficile*, Bacterial GE+ et CarbaR+, permettant de renforcer l'offre de Mobidiag dans la détection des infections gastro-intestinales.

Le test Novodiag® Stool Parasites a été conçu pour détecter les acides nucléiques des protozoaires, helminthes et microsporidies les plus couramment identifiés dans les échantillons de selles de patients ayant une symptomatologie digestive. Ainsi les 26 cibles détectables par le système représentent plus de 95% des parasites intestinaux retrouvés chez l'Homme. Elles sont listées dans le tableau 2.

Protozoaires	Microsporidies	Helminthes
<i>Balantidium coli</i>	<i>Encephalitozoon sp.</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>
<i>Blastocystis sp.</i>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	<i>Ascaris lumbricoides/ suum</i>
<i>Cyclospora cayetanensis</i>		<i>Clonorchis sinensis/ Opisthorchis sp./ Metorchis sp.</i>
<i>Cystoisospora belli</i>		<i>Diphyllobothrium latum / nihonkaiense</i>
<i>Dientamoeba fragilis</i>		<i>Enterobius vermicularis</i>
<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Fasciola sp.</i>
<i>Giardia intestinalis</i>		<i>Fasciolopsis buski</i>
<i>Cryptosporidium sp.</i>		<i>Hymenolepis diminuta</i>
		<i>Hymenolepis nana</i>
		<i>Necator americanus</i>
		<i>Schistosoma mansoni</i>
		<i>Schistosoma sp.</i>
		<i>Strongyloides stercoralis</i>
		<i>Taenia saginata/asiatica</i>
		<i>Taenia solium</i>
		<i>Trichuris sp.</i>

Tableau 2: Cibles du Novodiag® Stool Parasites (source : notice Novodiag® Stool Parasites³⁷)

Chaque cartouche de test Novodiag® Stool Parasites est composée de plusieurs compartiments successifs comme illustré sur la figure 22 :

- Des réservoirs contenant les réactifs nécessaires à l'analyse de l'échantillon et distribués grâce à un système de vannes : solution tampon pour l'échantillon, mix PCR, oligonucléotides/amorces, contrôle d'amplification, tampon d'hybridation, contrôle d'hybridation.
- 2 chambres de PCR indépendantes où les gènes cibles et le contrôle d'amplification sont amplifiés.
- 2 puces à ADN composées de sondes d'hybridation marquées par des fluorophores et imprimées en micro-réseau sur une lame de verre. Ces sondes vont permettre la fixation des amplicons par hybridation et la détection des cibles.

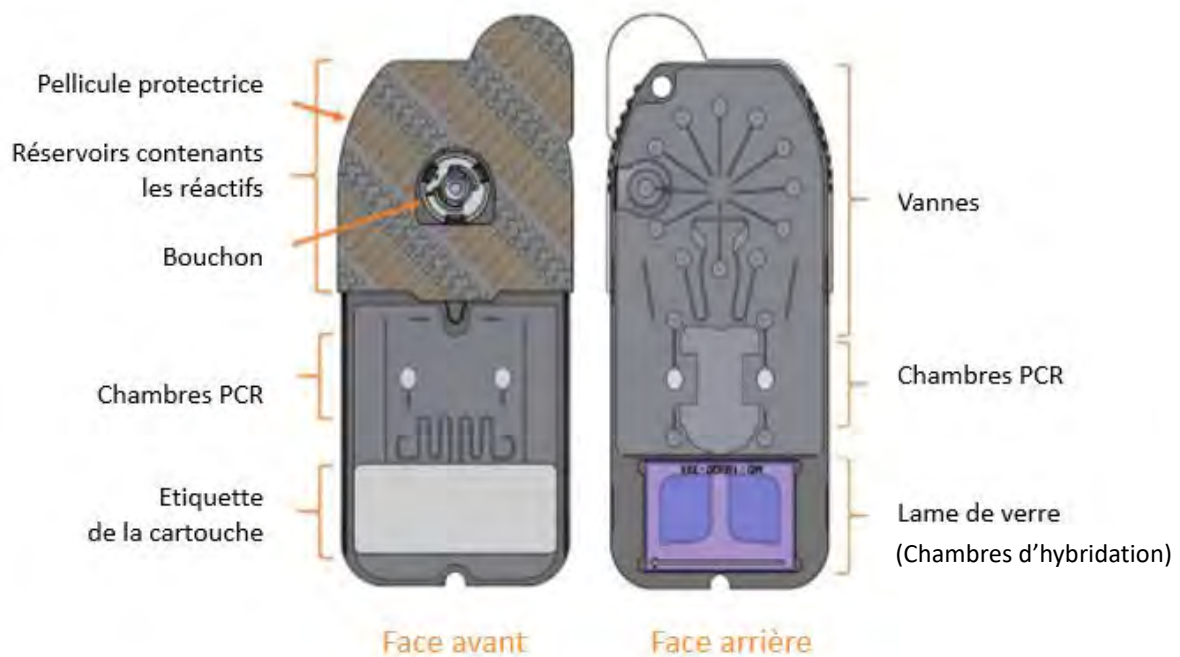


Figure 22: Description de la cartouche Novodiag® Stool Parasites (source : notice Novodiag® Stool Parasites³⁷)

Les cartouches contiennent également des contrôles internes :

- Le « process control » ou contrôle d'amplification présent sous forme déshydraté dans le réservoir réactif. Il subit les mêmes étapes à l'intérieur de la cartouche que l'échantillon. Ainsi il permet de contrôler la bonne réalisation de la préparation de l'échantillon, la réaction de PCR puis la réaction d'hybridation (échec si présence d'inhibiteur ou d'autres facteurs perturbant l'amplification de la PCR).
- Le contrôle d'hybridation est inclus dans le tampon d'hybridation. Il s'agit d'un oligonucléotide qui doit toujours être hybridé et détecté.
- Les « gridding controls » ou contrôle de fluorescence : il s'agit de sondes imprimées directement sur le micro-réseau de la puce à ADN qui doivent toujours émettre une fluorescence. Cela permet de s'assurer de la bonne impression de la puce à ADN par la mesure de la fluorescence lors de l'étape finale de révélation.

Un algorithme intégré à l'instrument analyse à la fois le signal d'amplification en temps réel et l'image du micro-réseau de la puce à ADN afin de rendre un résultat qualitatif final pour chacune des 26 cibles parasitaires.

3. Préparation de la cartouche Novodiag® Stool Parasites et lancement d'un run

3.1. Phase pré analytique

Le matériel utilisé pour la préparation de la cartouche :

- Tube ESwab™ (Copan) à bouchon rose : dispositif stérile de prélèvement contenant le milieu de transport Amies liquide (1mL) et un écouvillon sécable floqué avec des fibres de nylon
- Tubes coniques stériles
- Tube MagNA Lyser Green Beads contenant des billes en céramique de 1.4 mm de diamètre
- MagNA Lyser Instrument
- Pipettes Pasteur stériles en plastique à usage unique
- Micropipettes et embouts stériles
- Cartouches Novodiag® Stool Parasites
- Instrument Novodiag® System
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II

Sous PSM II, prélever la selle avec l'écouvillon stérile fournit avec le tube ESwab™. Ce prélèvement doit se faire à plusieurs endroits de la selle afin d'augmenter la sensibilité de la détection et la matière fécale doit recouvrir l'ensemble de l'écouvillon sans être trop abondant comme présenté sur la figure 23.



Figure 23: Prélèvement de la bonne quantité de selles sur écouvillon (tube ESwab™™)

Puis l'extrémité de l'écouvillon est placée dans le tube ESwab™, la partie sécable est rompue afin de pouvoir fermer le tube et réaliser une homogénéisation par vortex durant 5 secondes (figure 24, étape 1). En cas de selles liquides 200 µL de selles sont prélevées puis directement ajoutés dans le tube ESwab™.

L'intégralité du contenu de l'ESwab™ est ensuite transférée dans un tube MagNA Lyser qui est agité à 7000 rpm pendant 90 secondes (figure 24, étape 2). Cette étape va permettre la lyse cellulaire par broyage mécanique grâce aux billes présentes dans le tube et la libération des acides nucléiques dans le surnageant. La cartouche Novodiag® Stool Parasites est ouverte et identifiée par un numéro patient, puis 600 µL de l'échantillon présent dans le tube à MagNA Lyser sont introduit dans la partie supérieure de la cartouche à l'aide d'une pipette stérile à usage unique. Cette dernière est ensuite refermée par le bouchon fourni (figure 24, étape 3).

La figure 24 illustre les étapes pré-analytiques avant analyse dans l'instrument Novodiag®.

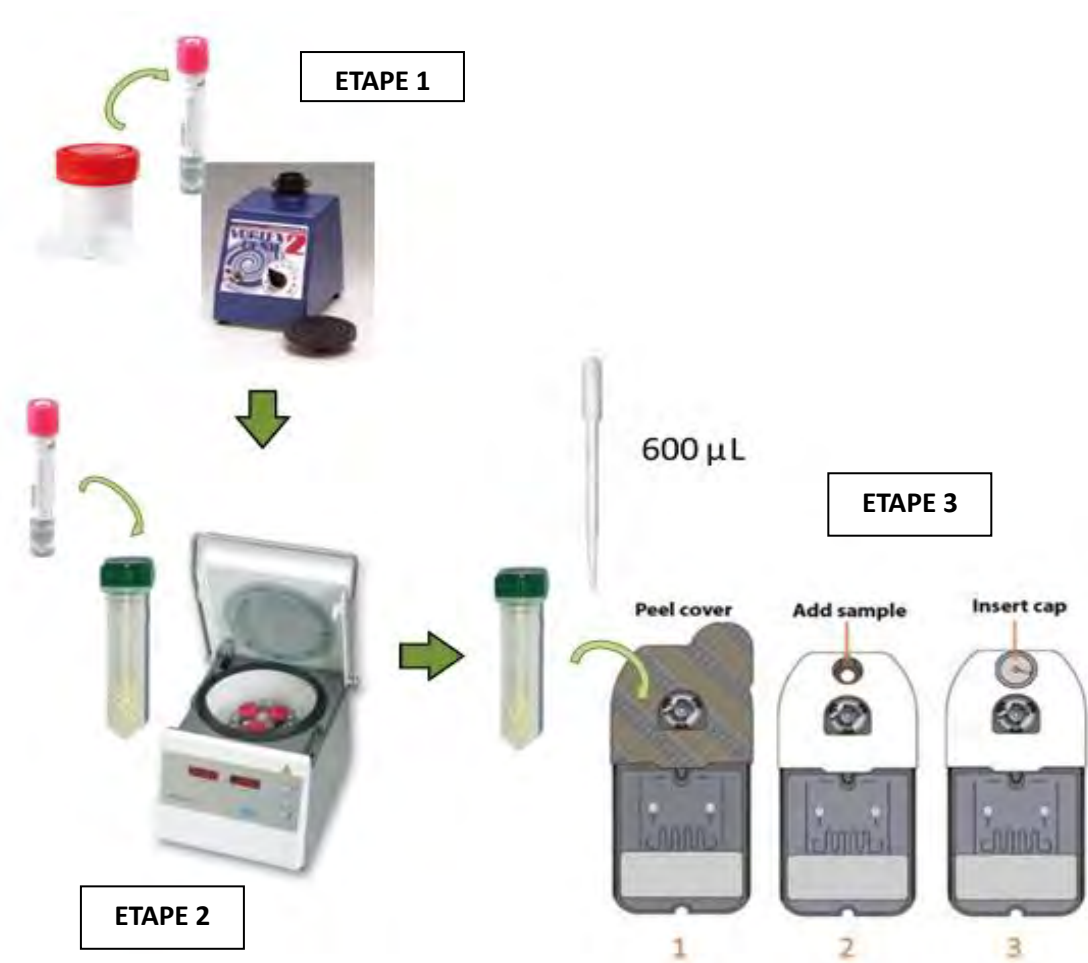


Figure 24: Préparation de la cartouche Novodiag® Stool Parasites

Les caractéristiques des cartouches et les données « patients » sont récupérées par scan des étiquettes spécifiques. Les cartouches sont alors insérées, seules ou par série (jusqu'à 4 cartouches) dans les modules de l'instrument Novodiag® pour 86 min de réaction (figure 25).



Figure 25: Lancement d'un run (source : Mobidiag®)

3.2. Phase analytique : amplification et détection

Aucune intervention de l'opérateur n'est nécessaire une fois que les cartouches sont chargées dans l'instrument Novodiag®. En effet, les étapes de lyse de l'échantillon, d'extraction et de concentration des acides nucléiques, ainsi que la réhydratation des réactifs, l'amplification, la détection et l'interprétation des signaux sont effectuées automatiquement.

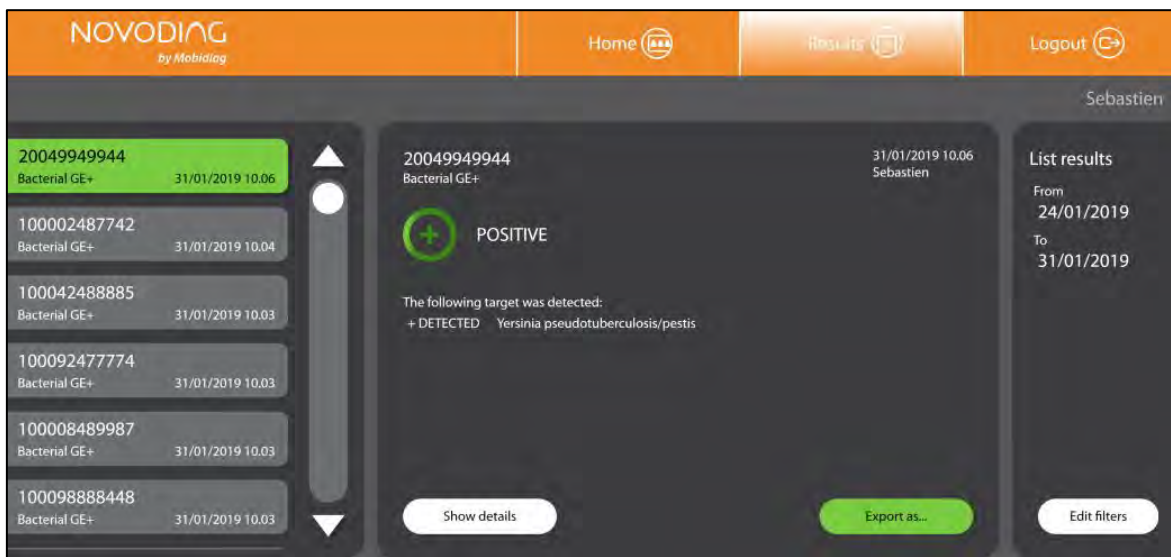
Les acides nucléiques contenus dans l'échantillon vont être transférés dans les chambres PCR où ils seront reconnus par des amorces spécifiques présentes dans les réactifs de la cartouche. La réaction de PCR débute et l'ADN est amplifié.

Les amplicons ainsi produits se lieront aux sondes de capture spécifiques à chaque séquence d'espèce parasitaire recherchée au niveau du micro-réseau. L'instrument va ensuite produire des ondes lumineuses qui vont exciter les fluorophores correspondant aux séquences d'acides nucléiques hybridées sur le micro-réseau. L'image produite par la fluorescence des sondes contrôles et des éventuelles sondes liées aux ADN cibles sera alors analysée par un algorithme et un résultat qualitatif sera rendu pour chacun des parasites recherchés dans la cartouche.

3.3. Phase post analytique : rendu des résultats

Les résultats sont affichés automatiquement en fin de réaction sur l'écran tactile de l'ordinateur de l'instrument Novodiag®.

Le résultat est qualitatif et rendu NEGATIF, POSITIF ou INVALIDE (figure 26).



Symbol	Result
	Test result is NEGATIVE. The test was technically successful and the internal controls were detected.
	Test result is POSITIVE. The test was technically successful and one or more of the test targets were detected.
	Test result is INVALID. None of the test targets nor the internal controls were detected.
	Run result has FAILED. An error has occurred in the Novodiag® System.

Figure 26: Analyse automatisée et affichage clair des résultats (source : Mobidiag)

Si aucune cible n'est détectée et que la détection des contrôles internes est conforme dans chaque chambre, le résultat est rendu « NEGATIF ».

Si une ou plusieurs cibles parasitaires sont détectées le résultat est rendu « POSITIF » avec un affichage clair de chacune de ces cibles.

Si au moins un contrôle interne a échoué (contrôle d'amplification, contrôle d'hybridation ou contrôle de fluorescence du micro-réseau) le résultat est rendu « INVALIDE ». Ce type de résultat traduit la présence d'un inhibiteur de réaction PCR présent dans l'échantillon, d'un dysfonctionnement au sein de la cartouche ou d'un dysfonctionnement de l'instrument. La selle peut être testée à nouveau en partant d'une nouvelle prise d'essai (nouveau tube ESwab™ de l'échantillon d'origine). Si après repassage le résultat demeure « INVALIDE » cela renforce l'hypothèse d'un inhibiteur de PCR et l'échantillon peut être dilué avec du tampon ESwab afin de diluer l'inhibiteur et pouvoir permettre l'amplification d'un éventuel acide nucléique cible. Pour cela 1 mL de solution ESwab™ est ajouté au mélange déjà contenu dans le tube à MagNA Lyser centrifugé lors du précédent passage (run numéro 2). Puis le contenu du tube est mélangé par vortex durant 10 secondes et testé dans une nouvelle cartouche.

PARTIE III : EVALUATION DES PERFORMANCES

1. Introduction

La microscopie optique est la technique de référence pour le diagnostic de routine en parasitologie au laboratoire. Cependant, il existe un intérêt croissant pour les méthodes de biologie moléculaire dans le but de surmonter les limites de l'examen microscopique, qui est à la fois chronophage et fortement dépendant de l'expertise de l'opérateur. Ces méthodes de biologie moléculaire, bien que coûteuses, bénéficient d'une sensibilité supérieure à la microscopie ainsi qu'une plus grande facilité de mise en œuvre.

Dans ce contexte, une nouvelle solution diagnostique basée sur la biologie moléculaire vient d'être commercialisée par la firme Mobidiag. Il s'agit du Novodiag® Stool Parasites, test qui permet l'amplification et la détection automatisée d'un large panel d'acides nucléiques de parasites intestinaux. Cette technique innovante allie la PCR et le procédé de puces à ADN ou micro-array et permet d'offrir une détection multiplexe de 26 cibles parasitaires dont 10 cibles de protozoaires et microsporidies. Il s'agit là de la toute première évaluation de ce système de diagnostic.

2. Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est d'évaluer les performances du test qualitatif Novodiag® Stool Parasites (Mobidiag) permettant l'amplification et la détection automatisées d'un large panel d'acides nucléiques de parasites intestinaux.

L'évaluation portera sur la détection de 10 espèces de protozoaires et microsporidies dans des échantillons de selles. Les performances du test Novodiag® Stool Parasites seront évaluées comparativement aux techniques actuellement utilisées en routine dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse : les techniques microscopiques (MIF coloration et Ovatec® Plus) d'une part et les techniques de biologie moléculaire (PCR commerciale Amplidiag® Stool Parasites et une PCR maison détectant les microsporidies *Encephalitozoon sp.* et *Enterocytozoon sp.*) d'autre part.

3. Matériels et méthodes

3.1. Prélèvements collectés

Cette nouvelle technique a été évaluée de façon rétrospective en utilisant un panel de 82 échantillons de selles de 76 patients (homme, femme ou enfant) collectés au sein du service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse entre février 2018 et juillet 2020. Ces selles sont issues de patients ayant bénéficié d'un examen parasitologique des selles et/ou d'une recherche ciblée de cryptosporidies et/ou microsporidies.

75 selles ont été sélectionnées dès lors qu'elles étaient positives pour la détection d'un protozoaire par techniques microscopiques (forme végétative ou kystique) ou par technique de biologie moléculaire. La sélection a été faite de manière à obtenir le maximum de variété de protozoaires possibles présents dans des charges parasitaires les plus variables possibles (Ct).

Par ailleurs, 7 selles négatives toutes techniques confondues (techniques microscopiques ou techniques de biologie moléculaire) ont été analysées.

L'échantillonnage comprenait des selles fraîches natives conservées à +4°C, des aliquotes de selles fraîches natives congelés à -20°C ainsi que des échantillons de selles fraîches natives (une œse ou 500 µL si selle liquide) dilués dans 1 mL de solution de PBS et conservés à +4°C.

3.2. Méthodes microscopiques de comparaison

Le diagnostic microscopique des protozoaires digestifs a été réalisé après coloration au MIF³⁵ et après concentration par technique de flottation par Ovatec® Plus (Zoetis). Ce diagnostic a été effectué par du personnel habilité à la préparation et la lecture microscopique des examens parasitologique des selles.

Lorsqu'un protozoaire du complexe *Entamoeba histolytica/dispar* était identifié en microscopie, une détermination précise de l'espèce en cause était effectuée par PCR en temps réel Amplidiag® Stool Parasites.

3.3. Méthodes moléculaires de comparaison

Les étapes de prétraitement des échantillons de selles et d'extraction de l'ADN ont été réalisées selon les procédures du laboratoire. Deux cents microlitres de suspension de selles ont été transférés dans un tube contenant des billes MagNa Lyser. Cinq cents microlitres de tampon BLB (Bacteria Lysis Buffer, Roche) ont été ajoutés et le tube a ensuite été passé au MagNa Lyser (Roche) à 7000 tr/min pendant 70 secondes puis brièvement centrifugé. L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant le kit High Pure PCR Template Preparation (Roche) selon les recommandations du fournisseur. A partir de l'ADN extrait, la détection moléculaire des *Giardia intestinalis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cryptosporidium sp* et *Entamoeba histolytica* a été réalisée sur un automate CFX96 (Bio-Rad) grâce au kit de PCR en temps réel Amplidiag® Stool Parasites selon les recommandations du fournisseur. En cas de positivité de la PCR *Cryptosporidium sp*, la détermination de l'espèce a été effectuée par séquençage moléculaire sur un automate ABI 3130 XL (Applied Biosystem) en utilisant les amorces décrites par Mary C. *et al*³¹.

La détection moléculaire des microsporidies a été réalisée sur automate LightCycler 480 (Roche Diagnostic) selon le protocole décrit par Polley *et al*³⁶. Cette PCR permet de détecter les genres *Encephalitozoon sp.* et *Enterocytozoon sp.*

3.4. Novodiag® Stool Parasites

La préparation des cartouches pour les tests Novodiag® Stool Parasites a été réalisée par un seul opérateur afin de limiter les biais et selon le protocole standardisé fourni par le fournisseur. En cas d'échantillon de selles conservées en solution de PBS, le protocole suivi était le même que pour une selle liquide (200 µL de selles directement ajoutées dans le tube ESwab™). Cette étude étant ciblée sur les protozoaires, les détections d'ADN d'helminthe n'ont pas été prises en compte dans l'analyse.

3.5. Statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SIGMA Stat1 (2.03 ; Jandel Corporation, San Jose, CA). Les données ont été exprimées sous forme de moyenne +/- EC. Le test de Student a été utilisé pour les comparaisons entre deux groupes. Pour comparer les caractéristiques des patients dans chaque groupe, le test du chi-deux ou le test exact de Fisher a été utilisé selon le cas. Une comparaison a été considérée comme statistiquement significative si $P < 0,05$.

4. Résultats

4.1. Description des échantillons de l'étude

75 échantillons de selles ont été sélectionnés, du fait de la présence d'un ou plusieurs protozoaires.

Ces protozoaires ont été mis en évidence soit en microscopie (n=44), soit en biologie moléculaire (n=53). Pour 36 selles, aucun protozoaire n'a été mis en évidence en microscopie et 29 selles étaient négatives en PCR (PCR Amplidiag® Stool Parasite et PCR microsporidies).

7 selles étaient à la fois négatives en microscopie et en PCR.

Pour l'évaluation des différentes espèces de *Cryptosporidium sp.*, 12 selles positives ont été sélectionnées. Pour 10 d'entre elles, l'espèce de *Cryptosporidium sp.* a pu être séquencée. Pour 2 selles, la faible charge parasitaire n'a pas permis un séquençage contributif.

16 selles positives présentant des protozoaires non pathogènes, comme *Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli* et *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* et *Chilomastix mesnili*, et non détectés par la cartouche Novodiag® Stool Parasites ont également été inclus dans l'étude.

Le tableau 3 présente en détail les caractéristiques des échantillons sélectionnés.

Nombre de selles		82
Espèces sélectionnées	En microscopie ¹	En biologie moléculaire ²
	n=43	n=53
<i>Blastocystis sp.</i>	19	NA
<i>Cryptosporidium sp.</i>	NA	12
<i>C. parvum</i>	NA	5
<i>C. hominis</i>	NA	2
<i>C. felis</i>	NA	2
<i>C. canis</i>	NA	1
Séquençage non contributif	NA	2
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	20
<i>Encephalitozoon sp.</i>	NA	1
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	NA	4
<i>E. histolytica/dispar</i>	3	NA
<i>E. histolytica</i> confirmé par PCR	NA	4
<i>Giardia intestinalis</i>	6	13
<i>E. coli/hartmanni</i>	8	NA
<i>Endolimax nana</i>	7	NA
<i>Chilomastix mesnili</i>	1	NA
<i>Pseudolimax butschlii</i>	1	NA
Absence de protozoaires	36	29

Tableau 3: Descriptif de la population d'étude dans le cadre de l'évaluation du kit Novodiag® Stool Parasites

¹Microscopie après MIF et/ou Ovatec® Plus dont 5 selles contenant de 2 à 4 protozoaires

² 49 en PCR Amplidiag® Stool parasite et 5 en PCR microsporidies

NA : non applicable

4.2. Performances analytiques du test Novodiag® Stool Parasites

Les performances du Novodiag® Stool Parasites ont été évaluées en calculant la sensibilité et la spécificité pour chaque cible parasitaire par rapport aux méthodes de référence microscopiques ou à la PCR.

4.2.1. Sensibilité et spécificité par rapport aux techniques microscopiques (tableau 4)

	Microscopie n=79		Novodiag® n=79		Sensibilité	Spécificité
	Positif	Négatif	Positif	Négatif		
Protozoaires par espèce						
<i>Giardia intestinalis</i>	7	72	9	70	100%	97,2%
<i>Blastocystis hominis</i>	21	59	38	42	100%	71,2%
<i>Dientamoeba fragilis</i>	1	79	14	66	100%	83,5%
<i>Entamoeba histolytica</i>	1 ¹	79	2	78	100%	98,7%
Amibes non pathogènes ²	16	64	0 ³	80	NA	100%
Protozoaire potentiellement pathogène⁴	33	47	50	30	100%	63,8%

Tableau 4: Sensibilité et spécificité du test Novodiag® Stool Parasites par rapport aux techniques microscopiques utilisées en routine au laboratoire (MIF coloration et Ovatec®)

N.B : Les microsporidies et *Cryptosporidium sp.* ne sont pas détectés en microscopie en routine au laboratoire

¹ confirmés *E.histolytica* par PCR Amplidiag® Stool parasites

² Groupe incluant *E. dispar/coli/hartmanni*, *Endolimax nana*, *Chilomastix mesnili*

³ Amibes non pathogènes non détectées par le test Novodiag® Stool Parasites

⁴ Groupe incluant *Giardia intestinalis*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*

La sensibilité du Novodiag® Stool Parasites est au moins égale à celle des techniques microscopiques pour *Giardia intestinalis*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis* et *Entamoeba histolytica*. En effet, toutes les selles détectées positives en microscopie pour ces protozoaires ont correctement été détectées en Novodiag® Stool Parasites.

La spécificité pour *G. intestinalis* est très bonne et évaluée à 97,2%, avec deux échantillons de selles supplémentaires détectés positifs en Novodiag® Stool Parasites par rapport à la microscopie.

La spécificité pour *D. fragilis* est de 83,5%, avec 13 échantillons supplémentaires détectés positifs en Novodiag® Stool Parasites par rapport à la microscopie.

La spécificité pour *Blastocystis hominis* est de 71,2%. En effet, 17 échantillons de plus ont été détectés en Novodiag® Stool Parasites pour *B. hominis* par rapport à la microscopie.

La spécificité pour *Entamoeba histolytica* est également très bonne et évaluée à 98,7%. Dans ce cas, la selle positive pour la présence du complexe *E. histolytica/dispar* en microscopie avait préalablement été confirmée positive à *E. histolytica* en biologie moléculaire (Amplidiag® Stool Parasites). Une selle supplémentaire a été détectée positive en Novodiag® Stool Parasites.

Pour 16 autres selles positives à l'examen direct microscopique avec des protozoaires non pathogènes (*Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli* et *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana*, *Chilomastix mesnili* et *Pseudolimax butschlii*), la spécificité est de 100%. En effet, les résultats du Novodiag® Stool Parasites étaient négatifs, comme attendu car ces espèces ne figurent pas parmi les cibles détectées par le kit Novodiag® Stool Parasites.

4.2.2. Sensibilité et spécificité par rapport aux techniques de biologie moléculaire (tableau 5)

	Biologie moléculaire ¹		Novodiag® n=82		Sensibilité	Spécificité
	Positif	Négatif	Positif	Négatif		
Protozoaires par espèce						
<i>Giardia intestinalis</i> n=82	14 [26,61-35,15]*	69	10	73	71%	100%
<i>Cryptosporidium</i> sp. n=82	12 [25,13-40,95]*	70	7	76	53,8%	100%
<i>Dientamoeba</i> <i>fragilis</i> n=82	20 [16,23-35,49]*	63	14	69	70%	100%
<i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i> n=82	4 [20,05-36,75]*	79	2	81	50%	100%
<i>Encephalitozoon</i> sp n=20	1 [36,04]	19	0	82	1 échantillon non détecté	100%
<i>Enterocytozoon</i> sp. n=20	4 [17,55-28,85]*	16	4	79	100%	100%
Ensemble des protozoaires	54	29	37	46	68,5%	100%

Tableau 5: Sensibilité du test Novodiag® Stool Parasites par rapport aux PCR utilisées en routine au laboratoire (Amplidag® stool parasite) et PCR microsporidies (PCR Encephalitozoon sp/Enterocytozoon sp)

*[x - y] = plage de valeurs des Ct obtenus en PCR

¹ PCR Amplidag® Stool parasite et/ou PCR microsporidies

N.B : *Blastocystis* sp. n'est pas détecté par biologie moléculaire en routine au laboratoire

Les spécificités de détection du Novodiag® Stool Parasites par rapport aux techniques de biologie moléculaire étaient excellentes (Sp=100%) pour l'ensemble des protozoaires évalués. En effet, aucun faux positif n'a été détecté.

Les sensibilités variaient de 50 à 71% en fonction du parasite recherché.

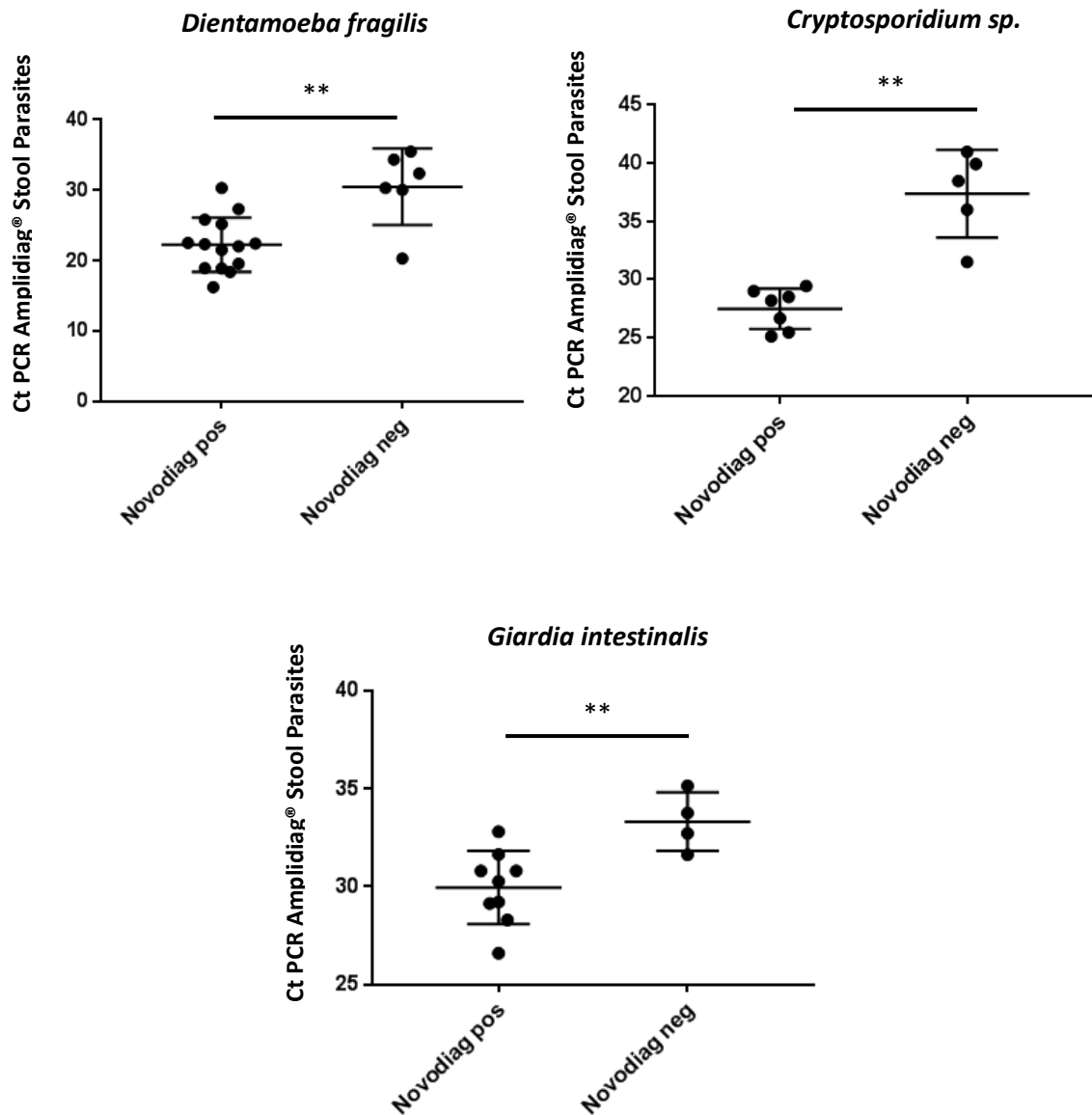


Figure 27: Détection de *D. fragilis*, *Cryptosporidium sp.* et *G. intestinalis* par le kit Novodiag® Stool Parasites en fonction des Ct mesurés en PCR Amplidia® Stool Parasites

** t-test p<0,01

Comme indiqué sur la figure 27, pour *Dientamoeba fragilis*, *Cryptosporidium sp.* et *Giardia intestinalis* les selles détectées positives par le test Novodiag® Stool Parasites correspondent aux échantillons possédant les charges parasitaires les plus élevées (Ct les plus forts ; $p < 0,05$).

Concernant *Dientamoeba fragilis*, les selles détectées positives par les techniques de routine et par le kit Novodiag® Stool Parasites avaient des Ct allant de 16,23 à 30,31 en Amplidiag® Stool Parasites. Les 6 faux négatifs avaient tous des Ct significativement plus élevés (de 30,04 à 35,49) à l'exception d'une selle avec une charge parasitaire forte (Ct 20,27) pourtant non détectée en Novodiag® Stool Parasites. Cet échantillon de selle a de nouveau été testé en Amplidiag® Stool Parasites (en double) et confirmé positif pour *D. fragilis* (Ct = 20,29 et 20,25).

Concernant le genre *Cryptosporidium sp.*, 12 selles positives en PCR Amplidiag® Stool Parasites ont été testées (Ct de 25,13 à 40,95) et seules 7 ont été correctement détectées par le kit Novodiag® Stool Parasites correspondant aux Ct les plus forts (Ct de 25,13 à 29,45). Les 5 selles négatives en Novodiag® Stool Parasites correspondaient à des selles contenant une charge parasitaire significativement plus faible (Ct de 31,51 à 40,95 en PCR Amplidiag® Stool Parasites).

Concernant *Giardia intestinalis*, 9 selles positives en PCR Amplidiag® Stool Parasites (Ct de 26,61 à 35,15) ont été correctement détectées par le kit Novodiag® Stool Parasites. Les 4 selles non détectées positives correspondaient aux charges parasitaires les plus faibles (Ct de 31,63 à 35,15).

Concernant le genre *Entamoeba* sp., 4 selles étaient positives à *Entamoeba histolytica* en PCR Amplidiag® Stool Parasites (Ct de 20,05 à 36,75). Parmi elles, 2 selles correspondant aux charges parasitaires les plus fortes (Ct = 20,05 et 29) (et dont une présentait des kystes d'*Entamoeba histolytica/dispar* à l'examen direct), ont été correctement détectées en Novodiag® Stool Parasites. Les 2 autres selles avec des Ct plus élevés en PCR Amplidiag® Stool Parasites pour *E. histolytica* (Ct = 31,25 et 36,75) n'ont pas été détectées sur Novodiag® Stool Parasites. Elles étaient, par ailleurs, aussi négatives en microscopie.

Concernant la détection des microsporidies, les 4 selles positives avec des charges parasitaires fortes d'*Enterocytozoon* sp en PCR maison (Ct de 17,55 à 28,85) ont toutes été détectées en Novodiag® Stool Parasites.

L'unique selle positive à *Encephalitozoon* sp. et présentant une faible charge parasitaire (Ct = 36,04) n'a pas été détectée par le kit Novodiag® Stool Parasites.

Les performances du kit Novodiag® Stool Parasites ont été évaluées en fonction des espèces de *Cryptosporidium* sp. (tableau 6). Le kit Novodiag® Stool Parasites a permis la détection d'au moins un échantillon contenant les espèces *C. parvum*, *C. hominis* et *C. felis*. En outre, la seule selle positive à *C. canis* avec une faible charge parasitaire n'a pas été détectée par Novodiag® Stool Parasites (comme attendu car cette espèce en particulier ne fait pas partie des cibles reconnues par ce kit).

Trois selles positives à *Cryptosporidium* sp. dont les séquençages d'espèce n'ont pas été contributifs en raison d'une faible charge parasitaire (Ct = 39,90 ; 40,41 et 40,95) n'ont pas été détectées par Novodiag® Stool Parasites.

	Novodiag® positif	Novodiag® négatif	Sensibilité	Spécificité
<i>Cryptosporidium parvum</i> n= 5	5 [25,13 - 29,45]	0	100%	100%
<i>Cryptosporidium hominis</i> n= 2	1 [28,2]	1 [38,44]	50%	100%
<i>Cryptosporidium felis</i> n= 2	1 [28,5]	1 [35,98]	50%	100%
<i>Cryptosporidium canis</i> * n= 1	0	1 [31,51]	1 échantillon non détecté	100%
<i>Cryptosporidium sp.</i> n= 2	0	2 [39,07 ; 40,95]	0	100%

Tableau 6: Détection du genre Cryptosporidium sp. en fonction des espèces et du Ct

[x - y] = plage de valeurs des Ct obtenus en Amplidiag® Stool Parasites

[x] = valeurs ponctuelles des Ct obtenus en Amplidiag® Stool Parasites

* L'espèce *C. canis* n'est pas détectée par Novodiag® Stool Parasites³⁷

4.3. Caractéristiques des échantillons avec résultats invalides

Lors de cette étude, 8 tests ont été rendus invalides par l'instrument. Les données caractérisant ces échantillons et leurs analyses ont été rassemblées (tableau 7) afin de déterminer une éventuelle corrélation. Il ne semble toutefois pas y avoir de caractéristique spécifique partagée par l'ensemble ou une majorité de ces selles.

Les raisons d'invalidité ne semblent donc pas explicables par les caractéristiques de la selle telles que la date du prélèvement (de mai 2018 à janvier 2020), la consistance de départ (normale, molle, liquide, glaireuse...) ou le mode de conservation.

	Aspect de la selle	Date de prélèvement de la selle	Conservation de la selle	Date du test Novodiag® Stool Parasites	N° slot
Selle 1	Molle	15/04/2019	PBS	16/07/2020	3
Selle 2	Normale	22/01/2020	+4	08/04/2020	3
Selle 3	Molle	21/08/2018	Congelée	04/12/2019	1
Selle 4	Pâteuse	17/05/2018	Congelée	04/12/2019	2
Selle 5	Pâteuse + sang	23/11/2019	+4	29/11/2019	1
Selle 6	Molle	17/09/2019	PBS	15/07/2020	1
Selle 7	Normale	13/12/2019	+4	07/04/2020	4
Selle 8	Molle	07/05/2019	+4	04/12/2019	2

Tableau 7: Caractéristiques de la selle et du run concernant chaque échantillon rendu invalide par le test Novodiag® Stool Parasites

Etant donné la potentielle criticité de ce paramètre, le mode de conservation a fait l'objet d'une évaluation spécifique.

4.4. Influence de la conservation des échantillons de selles

L'hétérogénéité des modes de conservation des prélèvements a été évaluée spécifiquement (tableau 8). Il n'y a pas de différence significative entre les proportions d'échantillons dont les résultats sont faussement négatifs ou dont le test a été rendu invalide en fonction des différents modes de conservation des selles.

Conservation des selles	Total des selles positives (n=83)	Résultat FN (n = 18)		Invalides (n = 8)	
		n (%)	P value	n (%)	P value
+4°C	47 (57%)	8 (44,4%)	0,374*	4 (50%)	1**
Solution PBS	16 (19%)	5 (27,8%)	0,406*	2 (25%)	0,652**
Congélation -	20 (24%)	5 (27,8%)	0.806*	2 (25%)	1**

Tableau 8: Pourcentage de résultats rendus faussement négatifs et invalides par le test *No-vodiag*® Stool Parasites en fonction du mode de conservation des selles

* Chi-2

**Test exact de Fisher

Il n'y a pas de différence significative entre les proportions d'échantillons présentant un résultat « faux négatifs » ou « invalide » et les répartitions des selles selon leurs modes de conservations.

5. Discussion

5.1. Sensibilité et spécificité par rapport aux techniques microscopiques

Pour la recherche de protozoaires dans les selles, l'examen microscopique est à l'heure actuelle un examen de référence permettant la recherche d'une très grande variété de parasite. Cependant, du fait d'une faible sensibilité, le diagnostic microscopique en parasitologie entraîne fréquemment une sous-estimation de la prévalence réelle des protozooses.

C'est la raison pour laquelle, étant donné la faible charge digestive de certains parasites et/ou leur élimination parfois irrégulière dans les selles, il est recommandé de renouveler cet examen microscopique au moins 3 fois, à plusieurs jours d'intervalle, pour en assurer une sensibilité optimale.

Lors de cette évaluation du kit Novodiag® Stool Parasites, la sensibilité par rapport à la microscopie était de 100% pour la détection de *Giardia intestinalis*, *Blastocystis sp.*, *Dientamoeba fragilis* et *Entamoeba histolytica* car toutes les selles positives en microscopie ont été correctement détectées pour ces 4 cibles. La sensibilité du Novodiag® Stool Parasites est donc au moins égale à celle des techniques microscopiques pour *Giardia intestinalis*, *Blastocystis hominis* et *Dientamoeba fragilis* et *Entamoeba histolytica*.

Au cours de cette étude, les données de spécificité du Novodiag® Stool Parasites étaient également très bonnes (71,2 à 98,7%) par rapport à la microscopie.

Pour *D. fragilis* la spécificité était de 83,5% (n = 14). En effet, 13 échantillons considérés comme des « faux positifs » ont été détectés en Novodiag® Stool Parasites par rapport à la microscopie. En réalité, il ne s'agit pas de réels faux positifs car la présence de *D. fragilis* non vus en microscopie pour ces 13 échantillons a été confirmée par la technique de biologie moléculaire de routine (PCR Amplidiag® Stool Parasites).

Il en est de même pour *G. intestinalis*, où la spécificité du Novodiag® Stool Parasites est également très bonne et évaluée à 97,2% (n = 10) et où 2 faux positifs ont été détectés par rapport à la microscopie mais confirmés par PCR Amplidiag® Stool Parasite.

La spécificité pour *Entamoeba histolytica* était également très bonne et évaluée à 98,7% (n = 2). Comme précédemment, concernant l'échantillon caractérisé comme faux positif, il ne s'agit pas d'un réel faux positif car la présence d'*Entamoeba histolytica* a été confirmée par la technique de biologie moléculaire de routine.

Pour *B. hominis*, la spécificité a été évaluée à 71,2% (n = 38). 17 faux positifs ont été détectés en Novodiag® Stool Parasites par rapport à la microscopie. Pour ce protozoaire, aucune autre technique ne permettait d'affirmer qu'il s'agissait de réels faux positifs ou d'une sensibilité supérieure du Novodiag® Stool Parasites par rapport à la microscopie. Cependant comme vu plus haut, la sensibilité de la microscopie étant faible et le diagnostic morphologique de cette espèce difficile, on peut supposer que la microscopie sous-estime largement la détection de cette espèce. Cela expliquerait la valeur probablement artificiellement abaissée de la spécificité du test Novodiag® Stool Parasites pour la détection de *Blastocystis sp.*

Par ailleurs, 16 selles positives à l'examen direct avec des protozoaires non pathogènes (*Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli* et *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana*, *Chilomastix mesnili* et *Pseudolimax butschlii*), et ne figurant pas parmi les cibles détectées par le Novodiag® Stool Parasites, ont été détectées négatives, suggérant une absence de réaction croisée avec ces cibles couramment retrouvés dans les selles.

5.2. Sensibilité et spécificité par rapport aux techniques de biologie moléculaire

Les résultats obtenus nous permettent également d'établir des données de performances de l'instrument Novodiag® en routine par rapport à des techniques de biologie moléculaire :

- PCR Amplidiag® Stool Parasites détectant *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium sp*, *Dientamoeba fragilis* et *Entamoeba histolytica*
- PCR maison détectant *Encephalitozoon sp.* et *Enterocytozoon sp.*

Les données de sensibilité du Novodiag® Stool Parasites pour *Cryptosporidium sp*, *Dientamoeba fragilis* sont respectivement de 53,8% et 70%. Pour ces protozoaires, le kit Novodiag® Stool Parasites a permis une détection correcte pour les selles ayant une forte charge parasitaire. En revanche, lorsque la charge parasitaire était plus faible ($Ct \geq 30$), ces parasites n'ont pas été détectés.

Pour *Giardia intestinalis*, la sensibilité du kit Novodiag® Stool Parasites a été évaluée à 71% dans cette étude. 6 selles à la fois positives en microscopie et en PCR Amplidiag® Stool Parasites, correspondant aux Ct les plus forts (Ct de 26,61 à 30,81), ont été correctement détectées.

Pour les 7 autres selles négatives en microscopie mais positives en PCR Amplidiag® Stool Parasites (Ct de 30,27 à 35,15), le kit Novodiag® Stool Parasites aurait permis de rattraper un diagnostic de giardiose dans trois cas non détectés en microscopie (Ct de 30,27 ; 31,65 et 32,81).

Concernant *Entamoeba histolytica*, 4 selles étaient positives à *E. histolytica* en PCR Amplidiag® Stool Parasites (Ct de 20,05-36,75). Parmi elles, seules les 2 selles correspondant aux charges parasitaires les plus fortes (Ct = 20,05 et 29) ont été détectées par le Novodiag® Stool Parasites. Cependant, une seule de ces 2 selles présen-

tait des kystes d'*Entamoeba histolytica/dispar* à l'examen direct et elle a été correctement détectée par le Novodiag® Stool Parasites. Pour un laboratoire ne possédant pas de technique de biologie moléculaire de routine, le kit Novodiag® Stool Parasites aurait donc permis dans ce cas de faire un diagnostic supplémentaire d'amibiase à *Entamoeba histolytica* par rapport à la microscopie.

Les 2 autres selles, négatives en microscopie et avec des Ct plus élevés en PCR Amplidiag® Stool Parasites (Ct = 31,25 et 36,75) n'ont pas été détectées sur Novodiag® Stool Parasites.

Ceci corrobore les données trouvées précédemment pour *Cryptosporidium sp.* et *Dientamoeba fragilis* où les protozoaires ne sont plus détectables en Novodiag® Stool Parasites dès lors que la charge parasitaire est faible.

La signification clinique de ces faibles charges parasitaires est incertaine. Cela peut correspondre un protozoaire entier viable, non viable ou à la seule détection de trace d'ADN de protozoaires.

Parmi les 4 espèces de *Cryptosporidium* évaluées, le kit Novodiag® Stool Parasites a permis la détection d'au moins un échantillon des espèces *C. parvum*, *C. hominis* et *C. felis*. Cependant, la seule selle positive à *C. canis*, dont la charge parasitaire était faible, n'a pas été détectée par Novodiag® Stool Parasites. Ceci est en accord avec la notice du kit Novodiag® Stool Parasites³⁷, qui mentionne la non-détection de cette espèce. Les données 2018 du CNR *Cryptosporidium*³⁸ montrent que la non-détection de cette espèce n'est pas un problème majeur car elle est à l'origine de très peu d'infections symptomatiques chez l'Homme : *C. canis* a été mis en évidence dans les selles de seulement 0,4% (1/251 selles) des isolats séquencés de selles positives à *Cryptosporidium sp.* adressés en 2018 au CNR-LE et au laboratoire collaborateur.

Concernant la détection des microsporidies, la sensibilité de détection des *Enterocytozoon sp* était de 100%. Cependant, cette valeur a été calculée sur des échantillons positifs (n = 4) présentant tous des charges parasitaires fortes. Une étude complémentaire incluant un nombre d'échantillons plus important avec une plus grande variété de charges parasitaires pourrait ainsi s'avérer utile.

Pour *Encephalitozoon sp.*, l'unique selle positive de la coprothèque présentant une faible charge parasitaire (Ct = 36,04) n'a pas été détectée par le kit Novodiag® Stool Parasites et un calcul de sensibilité n'a donc pas été possible.

Les spécificités par rapport aux techniques de biologie moléculaire étaient excellentes (Sp=100%) pour *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium sp*, *Dientamoeba fragilis* et *Entamoeba histolytica*. En effet, aucun faux positif n'a été mis en évidence par rapport à la PCR Amplidiag® Stool Parasites.

Les performances du système Novodiag® Stool Parasites pour la détection de *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *Dientamoeba fragilis* et *Cryptosporidium sp*. peuvent être comparées à celle du kit BD Max™ Enteric Parasite Panel, permettant lui aussi le diagnostic en multiplex de ces parasites fécaux³⁹.

Pour la détection de *Giardia intestinalis*, la sensibilité du BD Max™ Enteric Parasite Panel semblait être équivalente à celle obtenue pour le Novodiag® Stool Parasites (Se = 100%), lorsque la technique de référence était la microscopie. Pour *Dientamoeba fragilis*, l'étude de Mölling *et al.*³⁹ rapporte une sensibilité de 100% dans le cas du BD Max™ Enteric Parasite Panel contre 84% pour le kit Novodiag® Stool Parasites. Concernant les détections d'*Entamoeba histolytica* et de *Cryptosporidium sp*, les performances de ces deux kits ne sont pas comparables. En effet, dans l'étude de performances de Mölling *et al.*³⁹, les 12 selles sélectionnées positives en microscopie au complexe *Entamoeba histolytica/dispar* ont été négatives en BD Max™ Enteric Parasite Panel et confirmées comme étant de l'*E. dispar* en PCR maison. A l'inverse, les techniques microscopiques n'étant pas réalisées pour le diagnostic des

Cryptosporidium sp. au laboratoire de Parasitologie du CHU de Toulouse, les performances Novodiag® Stool Parasites n'étaient pas évaluables vis-à-vis de cette technique pour ce genre.

Dans le cas de l'évaluation de la sensibilité de ces kits par rapport aux techniques de biologie moléculaire (Amplidiag® Stool Parasites pour Novodiag® Stool Parasites et une PCR maison pour BD Max™ Enteric Parasite Panel), les sensibilités rapportées pour Novodiag® Stool Parasites et BD Max™ Enteric étaient proches pour la détection de *Giardia intestinalis* (71% vs 67%, respectivement). Pour les deux autres cibles (*Entamoeba histolytica* et *Cryptosporidium sp.*), l'évaluation du BD Max™ Enteric Parasite Panel rapporte une sensibilité de 100% contre respectivement 50% et 58% pour le Novodiag® Stool Parasites.

Néanmoins les résultats de cette comparaison sont à nuancer par le fait que les échantillons de dépôts ne sont pas comparables. En effet, concernant les selles utilisées pour l'évaluation des performances du kit BD Max™ Enteric Parasite Panel versus les techniques microscopiques (n=66 selles testées) 32 étaient positives en microscopie, contre 45 selles positives pour l'évaluation du kit Novodiag® Stool Parasites (n=82 selles testées). Concernant l'étude des performances versus les techniques moléculaires le nombre de selles positives en PCR maison était de 27 (n=66) pour le kit BD Max™ Enteric Parasite Panel, et 54 (n=82) pour le kit Novodiag® Stool Parasites.

De plus, le panel de protozoaires détectés par le kit BD Max™ Enteric Parasite Panel est beaucoup moins large et ce test ne permet pas de s'affranchir de certaines PCR spécifiques, notamment pour les microsporidies.

5.3. Avantages de l'utilisation de kits de PCR unitaires dans le diagnostic des protozooses

Les techniques conventionnelles de détection des parasites intestinaux pouvant être à l'origine d'une symptomatologie digestive sont chronophages, fastidieuses et requièrent un personnel technique hautement qualifié, notamment pour l'identification microscopique.

L'utilisation d'une PCR multiplex, telle que le Novodiag® Stool Parasites, permet de réduire considérablement le délai de rendu du résultat d'un examen de selles.

La réalisation d'un run Novodiag® Stool Parasites nécessite 10 minutes de manipulation sous hotte et 86 minutes d'amplification, hybridation et détection au sein de l'instrument. Un EPS en microscopie peut être réalisé en moins d'une heure. Cependant, le gain de temps lié à par l'utilisation de l'instrument Novodiag® est obtenu par le nombre d'échantillons pris en charge en même temps (multiplexage) et par l'automatisation de la technique ce qui permet au technicien d'être détaché à d'autres activités. Le gain de temps-technicien est donc d'autant plus important que le rendu des résultats se fait automatiquement et de façon qualitative pour chacune des 26 cibles recherchées.

Grâce à ses emplacements individualisés et à des cartouches contenant l'ensemble des réactifs nécessaires aux différentes phases de la réaction, l'instrument Novodiag® permet une utilisation « random access » c'est-à-dire au coup par coup. Au CHU de Toulouse par exemple la PCR Amplidiag® Stool Parasites est réalisée deux fois par semaine. L'utilisation du test Novodiag® Stool Parasites permettrait ainsi aux cliniciens d'obtenir un résultat dans la journée sans attendre 48h-72h les résultats de la biologie moléculaire.

Un module unique permet de prendre en charge 4 selles toutes les 90 minutes. Au laboratoire du CHU de Toulouse, le nombre d'échantillons reçus pour un examen parasitologique des selles est de 30 selles par semaine en moyenne, soit environ 5 selles par jour (avec des maximums autour de 15 selles/jour).

Ainsi, un seul module pourrait être suffisant pour un laboratoire ayant un flux de demande similaire au laboratoire du CHU de Toulouse. Cependant, pour des volumes supérieurs, des modules supplémentaires peuvent être ajoutés.

De plus, la mise en évidence de formes parasitaires lors de la lecture d'examen direct de selles au microscope est dépendante de l'expérience du technicien ce qui peut entraîner un biais inter-opérateur. Ceci n'est pas le cas dans les techniques de PCR multiplex où cette variabilité inter opérateur est moindre.

5.4. Limites de l'utilisation de kits de PCR unitaires dans le diagnostic des protozooses

5.4.1. Résultats qualitatifs

Les résultats rendus par les kits unitaires de PCR multiplex sont uniquement qualitatifs et indique la présence ou l'absence d'ADN pour une cible donnée. Cependant, aucun Ct n'est disponible, la charge parasitaire ne peut donc pas être estimée. De plus, contrairement à l'examen direct microscopique qui permet d'apprécier la vitalité des trophozoïtes ou l'aspect des kystes de protozoaires, ces PCR unitaires amplifient tout ADN présent dans l'échantillon et ne permettent pas de présumer de la viabilité du parasite. Dès lors, l'interprétation d'une persistance d'ADN parasitaire avec le test Novodiag® Stool Parasites sans évaluation des charges parasitaires présente peu d'intérêt dans le cadre du suivi thérapeutique.

5.4.2. Résultats invalides

Le taux de résultats invalides au cours de cette étude est non négligeable et atteint les 8,8% (8/91 selles).

Les invalidités observées lors de cette étude sur huit cartouches ne sont pas expliquées par :

- La consistance de la selle de départ
- L'hétérogénéité des modes et des températures de conservation des prélèvements
- Les emplacements (ou slots) de l'instrument Novodiag® utilisés.

De plus, lors de chaque run contenant un invalide (à l'exception d'un run contenant 2 invalides), les trois autres cartouches testées conjointement ont rendus des résultats interprétables. Ce phénomène semble donc aléatoire et probablement lié à un échec de contrôle interne au sein des cartouches due à la présence d'un « inhibiteur de PCR » (sels biliaires, complexes de polysaccharides).

Ces inhibiteurs de PCR peuvent inhiber le processus d'amplification par détérioration d'un réactif ou inhiber le système de révélation. Pour un même prélèvement, en cas de deux résultats « INVALIDE » consécutifs il est préconisé de diluer l'échantillon. Ceci permettra de diluer un éventuel inhibiteur présent dans le prélèvement de départ mais pourra entraîner une diminution globale de la sensibilité du test.

Dans cette étude, les prélèvements rendus invalides n'ont pas pu être repassés en Novodiag® Stool Parasites en raison du nombre limité de cartouches disponible.

5.5. Limites de l'étude

5.5.1. Cibles parasitaires peu représentées

L'évaluation de ces performances présente quelques limites. En effet, le nombre total d'échantillons analysés (n= 82) reste peu important. De plus, 6 cibles parasitaires, détaillées après, sont peu représentées dans le panel de départ. Dans le cas du genre *Encephalitozoon sp.* une seule selle positive a pu être testée, ce qui est insuffisant pour conclure quant aux performances diagnostiques du Novodiag® Stool Parasites. De la même manière, seulement 4 selles positives à *Enterocytozoon bieneusi* et 4 positives à *E. histolytica* ont été testées. Enfin, trois cibles parasitaires (*Balantidium coli*, *Cyclospora cayetanensis* ou *Cystoisospora belli*) n'ont pas été testées car aucun échantillon positif n'était disponible en coprothèque.

5.5.2. Prélèvements de selles itératifs (3 prélèvements)

Du fait de la détérioration des formes trophozoïtes des parasites après émission ainsi que de leur excrétion intermittente, la sensibilité de l'examen microscopique des selles est faible lorsque cet examen est unique. Selon une étude de Nazer *et al.*⁴⁰, les résultats sont variables en fonctions des espèces parasitaires mais il semblerait que trois échantillons de selles, à quelques jours d'intervalle, soient nécessaires afin de diminuer significativement le nombre de faux négatifs en microscopie.

Dans cette étude, du fait d'un nombre limité de cartouches l'intérêt des 3 selles itératives pour la recherche de protozooses chez un patient n'a pas pu être évalué.

5.5.3. Étude rétrospective

Etant donné le nombre limité de cartouches Novodiag® Stool parasites, le choix d'une étude rétrospective a été privilégié afin de pouvoir déterminer les sensibilités et spécificité de cette technique. Il a ainsi été possible d'évaluer la détection d'un maximum de cibles protozoaires. Cependant ce type d'étude peut entraîner des biais de sélection par rapport à une étude prospective. D'autre part, les études rétrospectives ne permettent pas d'évaluer les valeurs prédictives positives et négatives.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La microscopie est à ce jour l'examen de référence pour le diagnostic en routine des infections intestinales à protozoaires. Cependant, celle-ci reste limitée par la difficulté technique de cet examen et par sa faible sensibilité liée à l'excrétion intermittente ainsi qu'à la fragilité de certains microorganismes. Ainsi, les stratégies innovantes permettant la détection multiplexe des parasites digestifs constituent des alternatives intéressantes dans ce contexte.

Le kit Novodiag® Stool Parasites, évalué pour la première fois dans cette étude, permet la détection de l'ADN de la majorité des protozoaires intestinaux impliqués en pathologie humaine. Il s'agit d'une approche multiplexe novatrice associant une réaction de PCR avec une détection par puce à ADN. La technique présente plusieurs avantages, notamment sa facilité d'utilisation en réduisant les phases pré-analytiques et techniques. De plus, l'amplification, la détection et le rendu des résultats sont automatisés pour chacune des dix cibles de protozoaires recherchées. Enfin, son format de cartouche unitaire permet d'obtenir en une heure et demie un diagnostic pour un échantillon de selles donné.

Les performances analytiques de ce kit sont supérieures à celles du diagnostic par microscopie pour les principales espèces de protozoaires retrouvées chez les patients atteints de symptomatologie digestive (*Giardia intestinalis*, *Blastocystis sp.*, *Dientamoeba fragilis* et *Entamoeba histolytica*). Néanmoins, la sensibilité de cette technique reste inférieure à celle des techniques de détection par biologie moléculaire actuellement utilisées en routine dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse. Une évaluation sur un plus grand nombre d'échantillons permettrait d'affiner les résultats déjà obtenus et de calculer la sensibilité et la spécificité pour la détection des espèces parasitaires n'ayant pas pu être testées lors de cette étude.

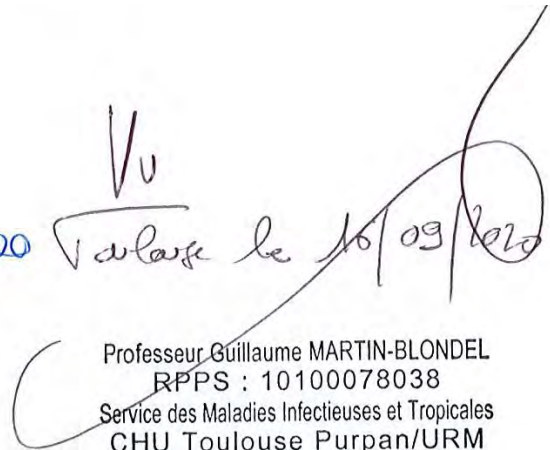
En conclusion, l'utilisation de ce kit pourrait améliorer le diagnostic de routine des protozooses par les laboratoires de biologie médicale privés ou publics, en étant beaucoup plus facile à mettre en œuvre, par rapport à la microscopie.

Toulouse, le 21 septembre 2020

Vu
Valase le 16/09/2020



Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine Purpan
D.CARRIE



Professeur Guillaume MARTIN-BLONDEL
RPPS : 10100078038
Service des Maladies Infectieuses et Tropicales
CHU Toulouse Purpan/URM
Place du Docteur BAYLAC - TSA 40031
31059 TOULOUSE Cedex 9

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ Huang DB, White AC. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35(2):291-viii. doi:10.1016/j.gtc.2006.03.006
- ² Haque R, Ali IKM, Clark CG, Petri WA Jr A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. *Parasitol Int*. 1998;47:201–2 10.1016/S1383-5769(98)00020-8
- ³ Shimokawa C, Kabir M, Taniuchi M, *et al.* *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. *J Infect Dis*. 2012;206(5):744-751. doi:10.1093/infdis/jis414
- ⁴ Royer TL, Gilchrist C, Kabir M, *et al.* *Entamoeba bangladeshi nov. sp.*, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18(9):1543-1544. doi:10.3201/eid1809.120122.
- ⁵ Costa D, Razakandrainibe R, Sautour M, *et al.* Human cryptosporidiosis in immunodeficient patients in France (2015-2017). *Exp Parasitol*. 2018;192:108-112. doi:10.1016/j.exppara.2018.08.001
- ⁶ Eurosurveillance.org, surveillance du *Cryptosporidium* en France, 2006 – 2009. www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.33.19642-en
- ⁷ Legua P, Seas C. *Cystoisospora* and *cyclospora*. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(5):479-483. doi:10.1097/01.qco.0000433320.90241.60
- ⁸ Ehsan MA, Casaert S, Levecke B, *et al.* *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational water in Belgium. *J Water Health*. 2015;13(3):870-878. doi:10.2166/wh.2015.268
- ⁹ Jepps MW, Dobell C. *Dientamoeba fragilis* n.g., n. sp., new intestinal amoeba from man. *Parasitology*. 1918;10:352–367.
- ¹⁰ Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Prospective study of the prevalence, genotyping, and clinical relevance of *Dientamoeba fragilis* infections in an

Australian population. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2718-2723.
doi:10.1128/JCM.43.6.2718-2723.2005

¹¹ Munasinghe VS, Vella NG, Ellis JT, Windsor PA, Stark D. Cyst formation and faecal-oral transmission of *Dientamoeba fragilis* - the missing link in the life cycle of an emerging pathogen. *Int J Parasitol.* 2013;43(11):879-883.
doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.003

¹² Stark D, Garcia LS, Barratt JL, *et al.* Description of *Dientamoeba fragilis* cyst and precystic forms from human samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2680-2683.
doi:10.1128/JCM.00813-14

¹³ Patrice Bourée^a, Francine Bisaro^a, *et al.* Balantidiasis : a zoonosis of pig, not always asymptomatic. *Revue Francophone des Laboratoires* Volume 2016, Issue 483, June 2016, Pages 57-62. doi.org/10.1016/S1773-035X(16)30200-3

¹⁴ Souppart L, Moussa H, Cian A, *et al.* Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. *Parasitol Res.* 2010;106(2):505-511.
doi:10.1007/s00436-009-1693-5

¹⁵ James, T., Kauff, F., Schoch, C. *et al.* Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443, 818–822 (2006).

¹⁶ Données non publiées, A. Faussart *et al.* *Médecine et maladies infectieuses*, 7e JNl, Bordeaux, Col2-SFP, S172

¹⁷ Données non publiées, Thèse A. Maillé. Détection moléculaire des espèces d'*Entamoeba* chez les patients ayant bénéficié d'un examen parasitologique des selles au CHU de Toulouse en 2018-2019 : évaluation de la prévalence et des facteurs de risque associés

¹⁸ Datry A, Sarfati C, Derouin F et le Réseau Français des microsporidies. Enquête nationale de prévalence des microsporidioses, cryptosporidioses et giardiases. Symposium international « L'eau, la santé et l'environnement », Rennes. 2000

¹⁹ cnrcryptosporidioses.chu-rouen.fr/wp-content/uploads/sites/54/2019/10/rapport-2018-CNR-LE-Cryptosporidioses-def.pdf

²⁰ Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):639-665. doi:10.1128/CMR.00022-08

²¹ Pinel C, Réjasse C, Picot S, Brenier-Pinchart MP, Grillot R, Ambroise-Thomas P. *Blastocystis hominis*: réflexions épidémiologiques et cliniques à propos de plus de 3,500 examens coprologiques [*Blastocystis hominis*: epidemiological and clinical remarks from more than 3,500 stool examinations]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1999;57(5):601-604.

²² Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F, Livrelli V. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):975-983. doi:10.1128/JCM.01392-10

²³ WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull.* 1997;18(1):13-14.

²⁴ Cui Z, Li J, Chen Y, Zhang L. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba* spp. *Infect Genet Evol.* 2019;75:104018. doi:10.1016/j.mee-gid.2019.104018

²⁵ Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(3):553-570. doi:10.1128/CMR.17.3.553-570.2004

²⁶ J.L. Barratt, et al. A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness *Gut Microbes*, 2 (2011), pp. 3-12, 10.4161/gmic.2.1.14755

²⁷ Cacciò, S. M. (2018). Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. *Acta Tropica*, 184, 73–77. doi:10.1016/j.actatropica.2017.06.029

-
- ²⁸ Alfa Cisse O, Ouattara A, Thellier M, Accoceberry I, Biligui S, Minta D, Doumbo O, Desportes-Livage I, Thera MA, Danis M, Datry A. Evaluation of an immunofluorescent-antibody test using monoclonal antibodies directed against *Enterocytozoon bie-neusi* and *Encephalitozoon intestinalis* for diagnosis of intestinal microsporidiosis in Bamako (Mali). *J Clin Microbiol.* 2002 May;40(5):1715-8
- ²⁹ Geurden T, Berkvens D, Martens C, Casaert S, Vercruyse J, Claerebout E. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology.* 2007;134(Pt.14):1981-1987. doi:10.1017/S0031182007003460
- ³⁰ Zagloul DA, Mohamed A, Khodari YA, Farooq MU. *Crypto-Giardia* antigen rapid test versus conventional modified Ziehl-Neelsen acid fast staining method for diagnosis of cryptosporidiosis. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6(3):212-215. doi:10.1016/S1995-7645(13)60025-5
- ³¹ Mary C, Chapey E, Dutoit E, *et al.* Multicentric evaluation of a new real-time PCR assay for quantification of *Cryptosporidium spp.* and identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis*. *J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2556-2563. doi:10.1128/JCM.03458-12
- ³² Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, *et al.* Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5491-5497. doi:10.1128/JCM.43.11.5491-5497.2005
- ³³ Amplidiag® Stool Parasites CE-IVD. For *in vitro* diagnostic use.
- ³⁴ da Silva A, Pieniazek N. Latest Advances and Trends in PCR-based Diagnostic Methods. In: Dionisio D, editor. *Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS.* Springer; 2003. p. 397-412.
- ³⁵ Parasitologie et mycologie médicales - Guide des analyses et des pratiques diagnostiques. ANOFEL, Ed. Masson
- ³⁶ Polley SD, Boadi S, Watson J, Curry A, Chiodini PL. Detection and species identification of microsporidial infections using SYBR Green real-time PCR. *J Med Microbiol.*

2011 Apr;60(Pt 4):459-466. doi: 10.1099/jmm.0.026781-0. Epub 2010 Dec 23. PMID: 21183599.

³⁷ Novodiag[®] Stool Parasites Instruction for use (NVD-SP-IFU) V4-0 – August 2020

³⁸ Rapport annuel d'activité 2019. Centre national de référence – Laboratoire Expert Cryptosporidioses.

cnrcryptosporidioses.chu-rouen.fr/wp-content/uploads/sites/54/2019/10/rapport-2018-CNR-LE-Cryptosporidioses-def.pdf

³⁹ Mölling P, Nilsson P, Ennefors T, *et al.* Evaluation of the BD Max Enteric Parasite Panel for Clinical Diagnostics. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):443-444. doi:10.1128/JCM.02100-15

⁴⁰ Nazer H, Greer W, Donnelly K, *et al.* The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. *Br J Clin Pract.* 1993;47(2):76-78.

AUTEUR : Florie BARBA

TITRE : **Évaluation des performances du kit Novodiag® Stool Parasites dans la détection des protozoaires intestinaux au sein du service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse**

DIRECTEURS DE THESE : Docteur Xavier IRIART/ Docteur Pamela CHAUVIN

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Salle des thèses de la Faculté de Médecine de Purpan, le 12 Octobre 2020

Résumé en français

L'examen parasitologique des selles par technique microscopique est l'examen de référence pour le diagnostic des parasitoses digestives. Cependant, du fait de la faible sensibilité de la microscopie, il existe un intérêt croissant pour les techniques de diagnostic moléculaire. Dans cette étude, les performances du kit Novodiag® Stool Parasites ont été évaluées. Il s'agit d'une technique innovante de détection multiplexe d'ADN parasitaire ciblant les protozoaires et microsporidies les plus fréquemment retrouvés en pathologie humaine. Il associe une amplification par PCR à une détection par puce à ADN. Ses performances analytiques sont au moins égales à celles du diagnostic microscopique (Se=100%) mais sont inférieures à celles des techniques de PCR en temps réel actuellement utilisées (Se= 50 à 70% selon les espèces).

Titre et résumé en anglais :

Performance evaluation of Novodiag® Stool Parasites kit in intestinal protozoa detection at the laboratory of Parasitology-Mycology at Toulouse University Hospital

Stool analysis, with a microscope search for microorganisms, remains the gold standard to diagnose intestinal parasitic infections. However, due to microscopy low sensitivity, there is a growing interest in molecular biology to assess the diagnosis. In this study, we investigate the Novodiag® Stool Parasites kit performance. It is an innovative technique for multiplex DNA detection of digestive parasites targeting ten of the most common protozoa in human pathology. Combining real-time Polymerase Chain Reaction with DNA-microarray detection. The analytical performances are equivalent when compared to microscopic diagnosis alone (Se=100%) but remains lower than molecular biology detection techniques currently used (Se=50-70% depending on species).

Mots-clés : protozoaires intestinaux, multiplexe, PCR temps réel, microarray

Discipline administrative : BIOLOGIE MEDICALE

Faculté de Médecine Rangueil – 133 route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 - France