

Place de la biologie moléculaire dans l'examen parasitologique des selles

L. Favennec

J'imagine que vous
venez pour diarrhée !



J'utilise le
microscope ou la pcr
????



- 1/ Quel parasite rechercher ?
- 2/ Comment optimiser ma recherche ?
- 3/ Place de la recherche d'antigène
- 4/ Place de la biologie moléculaire

Quelle population pour quelle
recherche de parasite ?
patientèle de médecine générale

**Patient de métropole n'ayant pas voyagé et ne
présentant pas d'hyperéosinophile**

- *Giardia duodenalis*
- *Cryptosporidium spp.*
- *Dientamoeba fragilis*
- *Blastocystis hominis*
- (*Entamoeba histolytica*)

Epidémiologie diarrhée des enfants chez le généraliste (Maas et al., 2013)

- 171 enfants (61% avec diarrhée de plus de 2 semaines et 39% avec suspicion de parasitose)

<i>D. fragilis</i>	101/171
<i>B. hominis</i>	49/171
<i>G. duodenalis</i>	16/171
<i>C. parvum</i>	0%
<i>E. histolytica</i>	0%

Gastrointestinal symptoms, no. (%)	Treated patients (n = 89)			Untreated patients (n = 15)			PCR-negative (n = 44)		
	T0	T6	p-value	T0	T6		T0	T6	p-value
Abdominal pain	69 (78)	29 (33)	<0.05	11 (73)	4 (27)	<0.05	36 (82)	22 (50)	<0.05
Nausea	27 (30)	9 (10)	<0.05	4 (27)	2 (13)	NS	12 (27)	5 (11)	<0.05
Altered bowel habits	24 (27)	17 (19)	NS	5 (33)	2 (13)	NS	15 (34)	6 (14)	<0.05
Chronic diarrhoea	15 (17)	5 (6)	<0.05	1 (7)	0	NS	11 (25)	4 (9)	<0.05
Weight loss	12 (14)	6 (7)	NS	2 (13)	0	NS	8 (18)	2 (5)	NS
Anal itching	13 (15)	4 (5)	<0.05	3 (20)	1 (7)	NS	5 (11)	1 (2)	NS
Vomiting	12 (14)	1 (1)	<0.05	2 (13)	0	NS	5 (11)	2 (5)	NS
Acute diarrhoea	11 (12)	1 (1)	<0.05	1 (7)	0	NS	4 (9)	0	NS
Mean VAS score	5.9	4.8	<0.05	5.4	4.5	NS	5.3	4.5	<0.05

NS, not significant; VAS, visual analogue scale.

Quelle population pour quelle recherche de parasite ?

- Patients immunodéprimés
 - *Encephalitozoon intestinalis*
 - *Enterocytozoon bienewisi*
 - *Cyclospora cayetanensis*
 - *Cystoisospora belli*
 - *Strongyloides stercoralis*
 - *Cryptosporidium spp.*

Quelle population pour quelle recherche de parasite ?

- Patients présentant une hyperéosinophile
 - *Schistosoma spp.*
 - *Fasciola hepatica*
 - *Taenia spp.*
 - *Diphyllobothrium latum*
 - *Enterobius vermicularis*
 - *Trichuris trichiura*
 - *Strongyloides stercoralis*
 - Ankylostomes

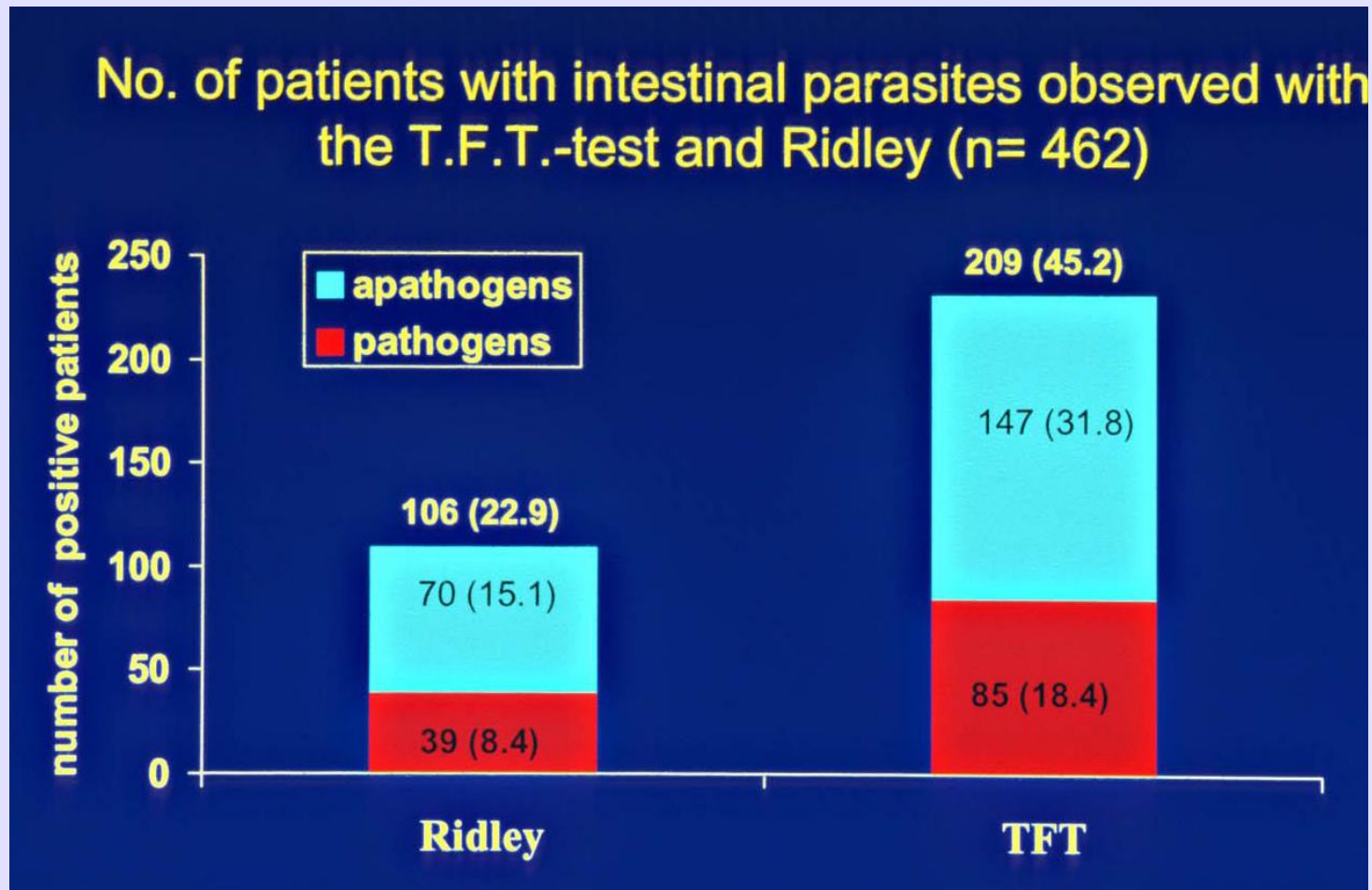
La microscopie : intérêt du fixateur et du prélèvement multiple : étude sur 462 patients, laboratoire hospitalier

(T. Mank, com. personnelle)

Parasite	Selle unique	Prélèvement triple avec fixateur
<i>Giardia duodenalis</i>	18	24
<i>Entamoeba histolytica</i>	14	18
<i>Dientamoeba fragilis</i>	0	45
<i>Entamoeba coli</i>	52	65
<i>Endolimax nanus</i>	42	47
<i>Chilosmatix mesnili</i>	7	10
<i>Pseudolimax butschlii</i>	6	12
<i>Blastocystis hominis</i>	0	124

La microscopie : intérêt du fixateur et du prélèvement multiple

(T. Mank, com. personnelle)



Recherche d'antigènes parasitaires : réactifs disponibles

Nom	Fabricant	Parasite
Triage parasite	Biosite	<i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> spp <i>E. histo/dispar</i>
Coris bioconcept	Crypto strip	<i>Cryptosporidium</i> spp
X/pect	Remel	<i>Giardia</i> solo
Rida Quick	r-biopharm	<i>Giardia</i> / <i>Crypto</i> combi
ImmunoCardSTAT	Meridian	<i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i> spp
CoproElisa, Coprostrip	Savyon Théradiag	<i>Giardia</i> , <i>Blastocystis</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Entamoeba</i> <i>Giardia</i> / <i>Crypto</i> combi





Performances des tests immunologiques

Nom

Species

T. Mank (personal data)

Triage parasite	<i>Giardia lamblia</i>	Se>93% Sp >98%
X/pect	<i>Giardia lamblia</i>	Se>95% Sp >98%
ImmunoCardSTAT	<i>Giardia lamblia</i>	Se>95% Sp >98%
Rida Quick	<i>Giardia lamblia</i>	Se>95% Sp >98%

Crypto-anofel (Agnamey et al., 2011, Favennec et al., in press)

Cryptostrip	<i>C. p</i> , <i>C. h</i> , <i>C. spp.</i>	Se 50%, 59%, 10%
Ridaquick	<i>C. p</i> , <i>C. h</i> , <i>C. spp.</i>	Se 73%, 73%, 20%
X Spect	<i>C. p</i> , <i>C. h</i> , <i>C. spp.</i>	Se 74%, 83%, 30%
Immunocard	<i>C. p</i> , <i>C. h</i> , <i>C. spp.</i>	Se 73%, 87%, 33%
Copro elisa	<i>C. p</i> , <i>C. h</i> , <i>C. spp.</i>	Se 100%, 93%, 95%

Comparaison RT PCR *Giardia Verweij* / RT PCR Primerdesign's /microscopie

(Boadi *et al.*, 2014)

Test	Analytical sensitivity (cysts/mL of stool)						
	71 000	14 200	2840	568	113.6	22.7	4.6
RMT	+	–	–	nt	nt	nt	nt
OCP-M	+	+	–	–	–	–	–
EIA	+	+	+	–	–	–	–
Primerdesign	+	+	+	+	+	–	–
Verweij real-time	+	+	+	+	+	+	+

The cysts were counted using C-Chip counting chamber and diluted 1 in 5 down to 4.6 cysts/ mL.

Index test	Sensitivity (SN)		Specificity (SP)	
	SN	95% CI	SP	95% CI
OCP-M	83.5	75.87 to 91.13	96.2	91.98 to 100.00*
Primerdesign	61.5	51.50 to 71.50	98.7	96.20 to 100.00*
Verweij	93.4	88.30 to 98.50	74.7	65.11 to 84.29

Le problème de spécificité de certaines PCR nécessite une vérification microscopique

Comparaison PCR simple / PCR multiplex/microscopie

(Stark *et al.*, 2014)

Method	No. of samples	No. of positive samples and sensitivity				
		<i>Blastocystis</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>D. fragilis</i>	<i>Entamoeba</i> complex	<i>Giardia</i>
EasyScreen	358	96% (51/53)	100% (9/9)	95% (41/43)	92% (22/24)	92% (24/26)
RT-PCR	358	96% (51/53)	89% (8/9)	95% (41/43)	100% (6/6) ^c	96% (25/26)
Microscopy	358	64% (34/53)	55% (5/9)	74% (32/43)	75% (18/24)	73% (19/26)

Remarque : pas d'utilisation systématique de fixateur.

Comparaison microscopie, détection antigène et PCR : *Giardia* (Elsafi *et al.*, 2013)

Iodine-stained wet mount	ImmunoCard STAT®	Real-time PCR	No. of specimens	Composite reference standard interpretation
Positive	Positive	Positive	17	True positive
Positive	Positive	Negative	0	True positive
Positive	Negative	Positive	1	True positive
Negative	Positive	Positive	3	True positive
Positive	Negative	Negative	0	True negative
Negative	Negative	Positive	2	True negative
Negative	Positive	Negative	1	True negative
Negative	Negative	Negative	124	True negative
Total			148	

Comparaison microscopie, détection antigène et PCR : *Cryptosporidium* (Elsafi *et al.*, 2013)

Kinyoun's acid-fast technique	ImmunoCard STAT®	Conventional PCR	No. of specimens	Composite reference standard interpretation
Positive	Positive	Positive	11	True positive
Positive	Positive	Negative	0	True positive
Positive	Negative	Positive	1	True positive
Negative	Positive	Positive	2	True positive
Positive	Negative	Negative	0	True negative
Negative	Negative	Positive	1	True negative
Negative	Positive	Negative	0	True negative
Negative	Negative	Negative	133	True negative
Total			148	

Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel

Bacteria and bacterial toxins

- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Campylobacter*
- *Clostridium difficile* Toxin A/B
- Enterotoxigenic *E. coli* (EPEC) LT/ST
- *E. coli* O157
- Shiga-like Toxin producing *E. coli* (STEC) stx 1/stx 2
- *Vibrio cholerae*
- *Yersinia enterocolitica*

Viruses

- Adenovirus 40/41
- Rotavirus A
- Norovirus GI/GII

Parasites

- *Giardia*
- *Entamoeba histolytica*
- *Cryptosporidium*

Evaluations du GPP luminex

Wessels *et al.*, 2013 : 393 selles « autochtones »:

Détection de 9 *Giardia*, 3 *Cryptosporidium* confirmés par RT-PCR
5 *E. histolytica* non confirmés.

**Non détectés : 17 *D. fragilis*, 11 *E. dispar*, 2 microsporidies,
1 schistosome et 1 *Strongyloides***

Beckmann *et al.*: 312 selles de patients de retour «des tropiques»:
185 adultes, 127 enfants :

Parasite	GPP luminex	microscopie
<i>Giardia</i>	1	5
<i>Cryptosporidium</i>	0	0
<i>E. histolytica</i>	0	9

**Non détectés : 42 *B. hominis*, 14 *E. nana*, 13 *E. hartmanii*,
3 *P. butschlii*, 3 helminthes**

Evaluations du GPP luminex

Sboromyrska *et al.*, 2014: 185 selles de patients de retour «des tropiques»:

Parasite	GPP luminex	microscopie	PCR de référence
<i>Giardia</i>	15	7	13
<i>Cryptosporidium</i>	0	0	0
<i>E. histolytica</i>	3	1	2

Non détectés : 5 *Cyclospora*

Lalani *et al.*, 2015: Etude des seuils de détection (extraction sans utilisation de billes)

Cryptosporidium : 106 oocystes non détectés

Giardia : 103 kystes détectés

Nécessité d'utilisation d'une extraction avec billes

Conclusions

- La microscopie sur selles fixées reste indispensable pour rechercher les parasites
- La PCR améliore la détection de *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Dientamoeba*
- Si patients sans atcd de voyage et sans hyperéosinophilie en soin primaire, l'utilisation de PCR seule sur un prélèvement peut être envisagée
- La rédaction de recommandation (ESCMID) est en cours

Je vais utiliser le
microscope et la pcr

