Place de l'approche syndromique et des techniques conventionnelles dans le diagnostic des parasitoses intestinales

Dr Charline Miossec

Service de Parasitologie-Mycologie, Hospices Civils de Lyon

1- Contexte

- **Techniques conventionnelles :**

- Chronophages +++

- Sensibilité / Spécificité opérateur dépendant : expérience +++

- Accréditation difficile

1- Contexte

- **PCR :**

Plus sensibles et plus spécifiques → **solution miracle ?**

Limite de détection *Cryptosporidium spp:*

PCR : 10 - 500 oocysts / mL

Coloration à l'auramine : 1000 oocyst/mL

Immunofluorescence : 6000 oocysts/mL

Ziehl-Nielsen modifié ou ELISA : 3.10^5–10^6 oocysts/mL

Quid des **panels syndromiques** ? Autres panels **multiplex** ?

2- Quelle extraction ?

- **Différence majeure des parasites vs virus et bactéries**

→ difficultés à extraire le matériel génétique

→ Faibles charges parasitaires

Sensibilité PCR **SEULEMENT SI**

L'extraction est efficace

ET la quantité initiale de selles importante

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***

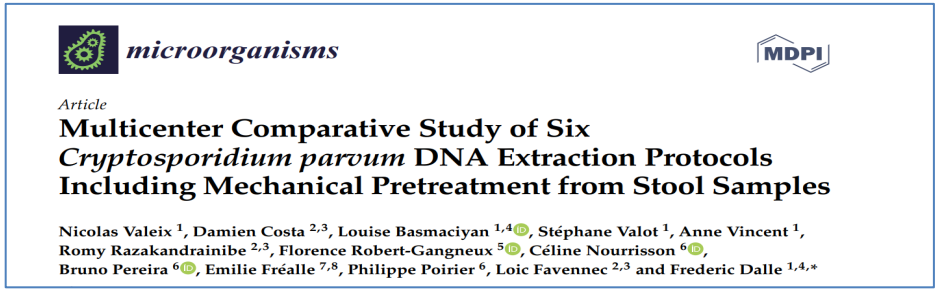
Paroi épaisse +++ (3 couches de glycoproteines filamenteuses et de lipides acido-résistants)

→ étape supplémentaire de **broyage mécanique**
(billes céramique/verre)

→ **pas de recommandation des fournisseurs** pour cette étape

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***


microorganisms MDPI

Article

Multicenter Comparative Study of Six *Cryptosporidium parvum* DNA Extraction Protocols Including Mechanical Pretreatment from Stool Samples

Nicolas Valeix [1], Damien Costa [2,3], Louise Basmaciyan [1,4], Stéphane Valot [1], Anne Vincent [1], Romy Razakandrainibe [2,3], Florence Robert-Gangneux [5], Céline Nourrisson [6], Bruno Pereira [6], Emilie Fréalle [7,8], Philippe Poirier [6], Loic Favennec [2,3] and Frederic Dalle [1,4,*]

Etude publiée en 2021 :

6 protocoles manuels ou automatiques

1 étude pour évaluer l'impact des modalités de broyage

Sensibilité très variables pour les faibles concentrations :

10 oocysts/mL : **0 – 94.4%**

50 oocysts/mL : **33.3 – 100%**

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***

Table 3. Characteristics of the DNA extraction kits.

Participating Centers	Kits (Company)	Abbreviated Name	Extraction System	Stool Test Sample (µL)	Elution Volume (µL)	Type of Lysis	Mechanical Pretreatment	Purification Support/Technology	Maximum No. of Samples/Run
Center 3	1. QIAamp Power fecal DNA kit® (Qiagen)	QP	M	250	100	C + T	Included Bead Tubes, Dry Garnet® (Qiagen)	Silica column	
Center 2	2. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit® (Qiagen)	QF	M	200	200	C + T + E	Not included	Silica column	
Center 4	3. Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep® (Zymo Research)	ZR	M	150	100	C	Included ZR BashingBead Lysis Tubes ®	Silica column	
Center 2	4. Elite Ingenius® (ELITechGroup)	IN	A	200	A choice: 50 or 100	C	Not included	Magnetic silica/Magtration® technology	12
Center 1	5. Nuclisens® easyMAG® with Nuclisens® easyMAG® Silice magnet (bioMérieux)	EM	A	400	100	C	Not included	Magnetic silica/Boom® technology	24
Center 5	6. MagnaPure 96 System® with MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume® (Roche Diagnostics)	MP: MagnaPure 96 without grinding MPG: MagnaPure 96 with grinding	A	200	100	C + T + E	Not included	Magnetic silica/technology based on the use of magnetic glass beads	96

M, manual; A, automated; T, thermic; E, enzymatic; C, chemical.

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***

Table 3. Characteristics of the DNA extraction kits.

Participating Centers	Kits (Company)	Abbreviated Name	Extraction System	Stool Test Sample (µL)	Elution Volume (µL)	Type of Lysis	Mechanical Pretreatment	Purification Support/Technology	Maximum No. of Samples/Run
Center 3	1. QIAamp Power fecal DNA kit® (Qiagen)	QP	M	250	100	C + T	Included Bead Tubes,	Silica column	
Center 2	2. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit® (Qiagen)	QF							
Center 4	3. Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep® (Zymo Research)	ZR							
Center 2	4. Elite Ingenius® (ELITechGroup)	IN							
Center 1	5. Nuclisens® easyMAG® with Nuclisens® easyMAG® Silice magnet (bioMérieux)	EM							
Center 5	6. MagnaPure 96 System® with MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume® (Roche Diagnostics)	MP: MagnaPure 96 without grinding MPG: MagnaPure 96 with grinding	A	200	50	C + T + E	Not included	Silica/technology based on the use of magnetic glass beads	96

M, manual; A, automated; T, thermic; E, enzymatic; C, chemical.

Table 4. Performances of six *C. parvum* DNA pretreatment/extraction protocols studied.

Pretreatment/Extraction Protocol	Proportion of Positive Samples at Each Concentration (%)					Overall Proportion of Positive Samples (%)
	10 oocysts/mL	50 oocysts/mL	100 oocysts/mL	500 oocysts/mL	1000 oocysts/mL	
QF	0	33.3	50	100	100	56.7
MP	44.4	66.7	88.9	100	100	80
IN	44.4	72.2	88.9	100	100	81.1
MPG	66.7	94.4	100	100	100	92.2
EM	66.7	100	100	100	100	93.3
QP	83.3	88.9	100	100	100	94.4
ZR	94.4	100	100	100	100	98.9

QF, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit®, Qiagen; MP, MagnaPure 96® without grinding, Roche Diagnostics; IN, ELITE InGenius® ELITechGroup; MPG, MagnaPure 96® with grinding, Roche Diagnostics; EM, Nuclisens® EasyMAG®, bioMérieux; QP, QIAamp Power Fecal DNA Kit®, Qiagen; ZR, Quick DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep®, ZymoResearch.

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***

Table 3. Characteristics of the DNA extraction kits.

Participating Centers	Kits (Company)	Abbreviated Name
Center 3	1. QIAamp Power fecal DNA kit® (Qiagen)	QP
Center 2	2. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit® (Qiagen)	QF
Center 4	3. Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep® (Zymo Research)	ZR
Center 2	4. Elite Ingenius® (ELITechGroup)	IN
Center 1	5. Nuclisens® easyMAG® with Nuclisens® easyMAG® Silice magnet (bioMérieux)	EM
Center 5	6. MagnaPure 96 System® with MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume® (Roche Diagnostics)	MP: MagnaPure 96 without grinding MPG: MagnaPure 96 with grinding

M, manual; A, automated; T, thermic; E, enzymatic; C, chemical.

Kits les plus performants → manuels

Table 4. Performances of six *C. parvum* DNA pretreatment/extraction protocols studied.

Pretreatment/Extraction Protocol	Proportion of Positive Samples at Each Concentration (%)					Overall Proportion of Positive Samples (%)
	10 oocysts/mL	50 oocysts/mL	100 oocysts/mL	500 oocysts/mL	1000 oocysts/mL	
QF	0	33.3	50	100	100	56.7
MP	44.4	66.7	88.9	100	100	80
IN	44.4	72.2	88.9	100	100	81.1
MPG	66.7	94.4	100	100	100	92.2
EM	66.7	100	100	100	100	93.3
QP	83.3	88.9	100	100	100	94.4
ZR	94.4	100	100	100	100	98.9

QF, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit®, Qiagen; MP, MagnaPure 96® without grinding, Roche Diagnostics; IN, ELITE InGenius®, ELITechGroup; MPG, MagnaPure 96® with grinding, Roche Diagnostics; EM, Nuclisens® EasyMAG®, bioMérieux; QP, QIAamp Power Fecal DNA Kit®, Qiagen; ZR, Quick DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep®, ZymoResearch.

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***

Kit le moins performant
→ Manuel SANS broyage

Table 3. Characteristics of the DNA extraction kits.

Participating Centers	Kits (Company)	Abbreviated Name
Center 3	1. QIAamp Power fecal DNA kit® (Qiagen)	QP
Center 2	2. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit® (Qiagen)	QF
Center 4	3. Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep® (Zymo Research)	ZR
Center 2	4. Elite Ingenius® (ELITechGroup)	IN
Center 1	5. Nuclisens® easyMAG® with Nuclisens® easyMAG® Silice magnet (bioMérieux)	EM
Center 5	6. MagnaPure 96 System® with MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume® (Roche Diagnostics)	MP: MagnaPure 96 without grinding MPG: MagnaPure 96 with grinding

M, manual; A, automated; T, thermic; E, enzymatic; C, chemical.

Table 4. Performances of six *C. parvum* DNA pretreatment/extraction protocols studied.

Pretreatment/Extraction Protocol	Proportion of Positive Samples at Each Concentration (%)					Overall Proportion of Positive Samples (%)
	10 oocysts/mL	50 oocysts/mL	100 oocysts/mL	500 oocysts/mL	1000 oocysts/mL	
QF	0	33.3	50	100	100	56.7
MP	44.4	66.7	88.9	100	100	80
IN	44.4	72.2	88.9	100	100	81.1
MPG	66.7	94.4	100	100	100	92.2
EM	66.7	100	100	100	100	93.3
QP	83.3	88.9	100	100	100	94.4
ZR	94.4	100	100	100	100	98.9

QF, QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit®, Qiagen; MP, MagnaPure 96® without grinding, Roche Diagnostics; IN, ELITE InGenius®, ELITechGroup; MPG, MagnaPure 96® with grinding, Roche Diagnostics; EM, Nuclisens® EasyMAG®, bioMérieux; QP, QIAamp Power Fecal DNA Kit®, Qiagen; ZR, Quick DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep®, ZymoResearch.

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***

Table 3. Characteristics of the DNA extraction kits.

Participating Centers	Kits (Company)	Abbreviated Name	Extraction System	Stool Test Sample (µL)	Elution Volume (µL)	Type of Lysis	Mechanical Pretreatment	Purification Support/Technology	Maximum No. of Samples/Run
Center 3	1. QIAamp Power fecal DNA kit® (Qiagen)	QP	M	250	100	C + T	Included Bead Tubes,	Silica-column	
Center 2	2. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit® (Qiagen)	QF							
Center 4	3. Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep® (Zymo Research)	ZR							
Center 2	4. Elite Ingenius® (ELITechGroup)	IN							
Center 1	5. Nuclisens® easyMAG® with Nuclisens® easyMAG® Silice magnet (bioMérieux)	EM							
Center 5	6. MagnaPure 96 System® with MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume® (Roche Diagnostics)	MP: MagnaPure 96 without grinding MPG: MagnaPure 96 with grinding	A	200	100	C + T + E	Not included	Silica technology based on the use of magnetic glass beads	96

M, manual; A, automated; T, thermic; E, enzymatic; C, chemical.

Table 4. Performances of six *C. parvum* DNA pretreatment/extraction protocols studied.

Pretreatment/Extraction Protocol	Proportion of Positive Samples at Each Concentration (%)					Overall Proportion of Positive Samples (%)
	10 oocysts/mL	50 oocysts/mL	100 oocysts/mL	500 oocysts/mL	1000 oocysts/mL	
QF	0	33.3	50	100	100	56.7
MP	44.4	66.7	88.9	100	100	80
IN	44.4	72.2	88.9	100	100	81.1
MPG	66.7	94.4	100	100	100	92.2
EM	66.7	100	100	100	100	93.3

Ajout de l'étape de broyage

Meilleure sensibilité

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***

Table 3. Characteristics of the DNA extraction kits.

Participating Centers	Kits (Company)	Abbreviated Nam
Center 3	1. QIAamp Power fecal DNA kit® (Qiagen)	QP
Center 2	2. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit® (Qiagen)	QF
Center 4	3. Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep® (Zymo Research)	ZR
Center 2	4. Elite Ingenius® (ELITechGroup)	IN
Center 1	5. Nuclisens® easyMAG® with Nuclisens® easyMAG® Silice magnet (bioMérieux)	EM
Center 5	6. MagnaPure 96 System® with MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume® (Roche Diagnostics)	MP: MagnaPure 96 without grinding MPG: MagnaPure 96 with grinding

M, manual; A, automated; T, thermic; E, enzymatic; C, chemical.

Table 7. Average of Ct values and standard deviation of real-time PCR results according to the pretreatment/extraction protocol and to oocyst concentration.

Pretreatment/Extraction Protocol	Average of Ct Values ± Standard Deviation		
	100 oocysts/mL	500 oocysts/mL	1000 oocysts/mL
QF	37.60 [a] ± 1.03	35.99 ± 0.84	35.27 ± 0.84
IN	35.70 [b] ± 0.94	33.13 ± 0.23	32.66 ± 0.28
MP	34.20 [c] ± 0.45	33.23 ± 0.44	33.46 ± 0.57
MPG	34.30 ± 0.81	30.86 ± 0.25	31.11 ± 0.48
EM	33.60 ± 0.48	31.53 ± 0.32	30.86 ± 0.31
QP	33.54 ± 0.39	31.48 ± 0.24	29.88 ± 0.20
ZR	31.91 ± 0.18	29.86 ± 0.16	28.89 ± 0.37

[a], average

Ajout de l'étape de broyage

> 100 oocysts/mL :
difference de **2.36 Ct**

2- Quelle extraction ?

- **Exemple de *Cryptosporidium***

CIL CNR Cryptosporidiose :

Même PCR,
extraction différente !

Résultats des participants Selles B			
Techniques PCR utilisées			
Extraction	**Amplification**	**Positif (Ct)**	**Négatif**
Emag (Biomérieux)	Amplidiag stool Parasites Mobidiag	Ct = 30 (n=1)	
BD max	BD max Enteric Parasite Becton Dickinson	Ct (29.6) Ct (26.4) (n=2)	
Ingenius (Elitech)	Kit Paragénie crypto/micro (Ademtech)	Ct (30.89) (n=1)	
EasyMag	Kit Paragénie Crypto-micro (Ademtech)	Ct (30.9) (n=1)	
QIAamp Fast DNA Stool	Mary et al 2013	Ct (30.85) (n=1)	
Ingenius (Elitech)	Mary et al 2013	Ct (31) (n=1)	
EMag	R-Biopharm Rida Gene	Ct (27.29) (n=1)	
Quick DNA Fecal/soil Microbe Zymoresearch	Le Govic et al 2016	Ct (25.73) (n=1)	
Easymag	Brunet et al. 2016	Ct (24.3) (n=1)	
Easymag	Seegene Allplex GI	Ct (27) (n=1)	
Starlet	Seegene Allplex GI	Ct (37.3) Ct (34.08) Ct (37.24) (n=3)	
PowerFecal kit	Hadfield et al. 2010	Ct (26.67) (n=1)	
Filmarray	Ct non communiqué (n=1)		

3- Cibles parasitaires

Approche syndromique ⟹

Détection **simultanée** par biologie moléculaire de **microorganismes** potentiellement incriminés dans **un type de pathologies infectieuses**

- Utilisation au coup par coup
- Réduction du temps analytique
- Prescription orientée seulement sur la symptomatologie

…avantage en parasitologie ???

3- Cibles parasitaires

- **Panels syndromiques :**

Peu de « vrais » panels syndromiques

xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel (GPP) (Luminex)	. *Giardia duodenalis* . *Entamoeba histolytica* . *Cryptosporidium spp. (C. parvum/hominis)* + bactéries/virus
FilmArray® GI Panel (Biomerieux)	. *Giardia duodenalis* . *Entamoeba histolytica* . *Cryptosporidium* . *Cyclospora cayetanensis* + bactéries/virus

BD MaxTM Enteric Parasite Panel (Becton Dickinson)	. *Giardia duodenalis* . *Entamoeba histolytica* . *Cryptosporidium spp.* (*C. parvum/hominis*)
Allplex™ Gastro-Intestinal - Panel 4 (Seegene Eurobio Ingen)	. *Giardia duodenalis* . *Entamoeba histolytica* . *Cryptosporidium spp.* . *Cyclospora cayetanensis* . *Dientamoeba fragilis* . *Blastocystis hominis*

Panels séparés pour bactéries et virus

3- Cibles parasitaires

- **Panels PCR multiplex :**

Protozoaires / coccidies :

G-DiaParaTM (Diagenode Diagnostics)	. *Giardia duodenalis* . *Entamoeba histolytica* . *Cryptosporidium parvum*
ParaGENIE Giardia-Amoeba Real-Time PCR Kit (Ademtech)	. Giardia intestinalis . Entamoeba histolytica . *Entamoeba dispar/moshkovskii*
RIDA®GENE Parasitic Stool Panel I (R-BioPharm)	. *Giardia duodenalis* . *Entamoeba histolytica* . *Cryptosporidium spp.* . *Dientamoeba fragilis*
Amplidiag® Stool Parasites (Mobidiag)	. *Giardia duodenalis* . *Entamoeba histolytica* . *Cryptosporidium spp.* . *Dientamoeba fragilis*

Non exhaustif !

Coccidies / microsporidies:

ParaGENIE Crypto-Micro Real-Time PCR (Ademtech)	. *Cryptosporidium spp.* . *Enterocytozoon bieneusi* . *Encephalitozoon intestinalis*

3- Cibles parasitaires

- **Panels PCR multiplex :**

Protozoaires / coccidies / microsporidies / helminthes :

Novodiag® Stool Parasites (Mobidiag)	*. Giardia intestinalis* *. Entamoeba histolytica* *. Cryptosporidium spp.* *. Cyclospora cayetanensis* *. Blastocystis spp.* *. Dientamoeba fragilis* *. Encephalitozoon spp.* *. Enterocytozoon bieneusi*	*. Ancylostoma duodenale* *. Ascaris lumbricoides / suum* *. Balantidium coli* *. Clonorchis sinensis / Opisthorchis spp. / Metorchis spp.* *. Cystoisospora belli* *. Diphyllobothrium latum / nihonkaiense* *. Enterobius vermicularis* *. Fasciola spp.* *. Fasciolopsis buski* *. Hymenolepis diminuta* *. Hymenolepis nana* *. Necator americanus* *. Schistosoma mansoni* *. Schistosoma spp.* *. Strongyloides stercoralis* *. Taenia saginata / asiatica* *. Taenia solium* *. Trichuris spp.*

4- Performances

- **Expérience lyonnaise :**

Référentiel	Luminex GPP		Filmarray GI		EPP sur BD Max		PSP (rBiopharm)	
Cryptosporidies n=15	+	-	+	-	+	-	+	-
Positif	0	15	5	10	3	12	4	11
Négatif	0	49	0	49	0	49	0	49
Total	0	64	5	59	3	61	4	60
Sensibilité	0,0%		33,3%		20,0%		26,7%	
Spécificité	100,00%		100,0%		100,0%		100,0%	
Giardia n=16	+	-	+	-	+	-	+	-
Positif	1	15	2	14	1	15	1	15
Négatif	0	48	0	48	0	48	0	48
Total	1	63	2	62	1	63	1	63
Sensibilité	6,3%		12,5%		6,3%		6,25%	
Spécificité	100,0%		100,0%		100,0%		100,0%	

Performances

Globalement, homogènes entre eux

- Performances médiocres par rapport aux PCRs « maison »

Hypothèses

- Prise d'essais très différente par rapport aux techniques « maison »: **jusqu'à 50mg de selles versus 1 oese ou quelques mg suivant les techniques**
- Limite de notre étude (rétrospectif sur selles congelées…)

4- Performances

- **Données de la littérature :**

BD MaxTM Enteric Parasite Panel

G-DiaParaTM

RIDA®GENE Parasitic Stool Panel I

Parasite **25**, 48 (2018)
© B. Autier et al., published by EDP Sciences, 2018
https://doi.org/10.1051/parasite/2018049

PARASITE

Available online at:
www.parasite-journal.org

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Comparison of three commercial multiplex PCR assays for the diagnosis of intestinal protozoa

Brice Autier[1], Sorya Belaz[1], Romy Razakandrainibe[2], Jean-Pierre Gangneux[1], and Florence Robert-Gangneux[1,*]

Table 2. Performances of the multiplex PCR assays compared to microscopy on 93 positive samples analysed routinely na: not applicable; nd: not determined.

	Sensitivity *n/N* (%)			Specificity *n/N* (%)		
	BD Max™	G-DiaPara™	RIDA®GENE	BD Max™	G-DiaPara™	RIDA®GENE
G. intestinalis	39/44 (89%)	28/44 (64%)	18/44 (41%)	20/21 (95%)	20/21 (95%)	48/49 (98%)
Cryptosporidium sp.	6/11 (55%)	8/11 (73%)	11/11 (100%)	54/54 (100%)	54/54 (100%)	82/82 (100%)
C. parvum/hominis	6/8 (75%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	na	na	na
D. fragilis	na	na	20/28 (71%)	na	na	63/65 (97%)
E. histolytica/dispar	nd[1]	nd[1]	nd[1]	nd[1]	nd[1]	nd[1]

[1] As microscopy does not enable species identification, sensitivity and specificity could not be determined for *E. histolytica* detection. However, concordant positive results were obtained with the 3 PCR assays for 1 sample.

→ **Aucuns résultats satisfaisants pour l'ensemble des parasites simultanément**
→ **Extraction d'ADN = étape critique.**

4- Performances

- **Données de la littérature :**

Allplex™ Gastro-Intestinal - Panel 4

microorganisms MDPI

Article

Evaluation of the Allplex™ Gastrointestinal Panel—Parasite Assay for Protozoa Detection in Stool Samples: A Retrospective and Prospective Study

Brice Autier, Jean-Pierre Gangneux and Florence Robert-Gangneux *

Table 3. Overall sensitivity of the Allplex™ PCR assay and the routine procedure on the prospective cohort (n = 586).

	Sensitivity		
	By Routine Procedure % (n/N)	By PCR % (n/N)	Statistical Significance [1]
Giardia duodenalis	60.7% (17/28)	100% (28/28)	**
Cryptosporidium spp.	100% (2/2)	100% (2/2)	ns
Dientamoeba fragilis	13.8% (10/72)	97.2% (70/72)	***
Blastocystis hominis	44.2% (72/163)	99.4% (162/163)	***
Cyclospora cayetanensis	na [2]	na [2]	na [2]
Entamoeba histolytica	50% (3/6)	100% (6/6)	ns

[1] **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ns: not significant; [2] no *C. cayetanensis* was diagnosed during the study.

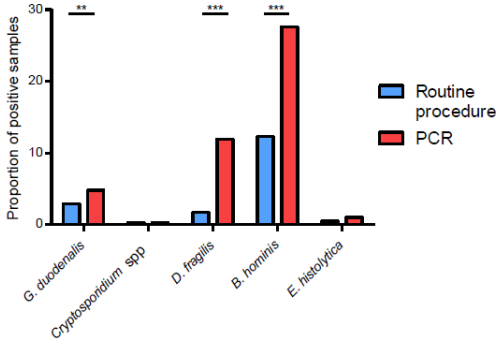


Figure 1. Proportion of positive samples on the prospective cohort (n = 586), using routine microscopy and multiplex PCR. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

4- Performances

- **Données de la littérature :**

ParaGENIE Crypto-Micro Real-Time PCR

> Diagn Microbiol Infect Dis. 2019 Sep;95(1):34-37. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.04.004. Epub 2019 Apr 15.

Assessment of the first commercial multiplex PCR kit (ParaGENIE Crypto-Micro Real-Time PCR) for the detection of Cryptosporidium spp., Enterocytozoon bieneusi, and Encephalitozoon intestinalis from fecal samples

Florent Morio [1], Philippe Poirier [2], Yohann Le Govic [3], Adrien Laude [4], Stéphane Valot [5], Guillaume Desoubeaux [6], Nicolas Argy [7], Céline Nourrisson [2], Christelle Pomares [8], Marie Machouart [9], Frédéric Dalle [10], Françoise Botterel [11], Nathalie Bourgeois [12], Estelle Cateau [13], Marion Leterrier [14], Jessica Beser [15], Rose-Anne Lavergne [4], Patrice Le Pape [4]

Table 1
Performances of the ParaGENIE Crypto-Micro Real-Time multiplex PCR assay for the detection of *Cryptosporidium* spp., *E. bieneusi*, and *E. intestinalis* ($n = 114$).

	Positive for both reference and ParaGENIE PCR	Positive for reference but negative by ParaGENIE PCR	Negative for reference but positive by ParaGENIE PCR	Negative for both reference and ParaGENIE PCR	Sensitivity (Se) Specificity (Sp)
Cryptosporidium spp.	43	4[a]	1[b]	66	Se =91.7% Sp = 100%
Enterocytozoon bieneusi	36	1[c]	1[d]	76	Se = 97.3% Sp = 98.7%
Encephalitozoon intestinalis	0	0	0	114	Se = ND Sp = 100%

Note: "Reference" refers to the findings of the reference panel and includes the modified Ziehl–Neelsen for *Cryptosporidium* spp. or PCR assay for microsporidia.
[a] Two of these samples positive by the modified Ziehl–Neelsen staining could not be confirmed by the external PCR assay but were positive by antigen detection (Xpect *Cryptosporidium*, Remel).
[b] This sample initially considered negative in the reference panel was also confirmed to be positive by the external PCR assay (false negative in the reference panel).
[c] This sample was confirmed positive by the external PCR assay (false negative by the ParaGENIE multiplex PCR assay).
[d] This sample was confirmed negative by the external PCR assay (false positive by the ParaGENIE multiplex PCR assay).

→ **Détection de 12 espèces de *Cryptosporidium.***
→ **Excellentes performances de sensibilité et spécificité**

4- Performances

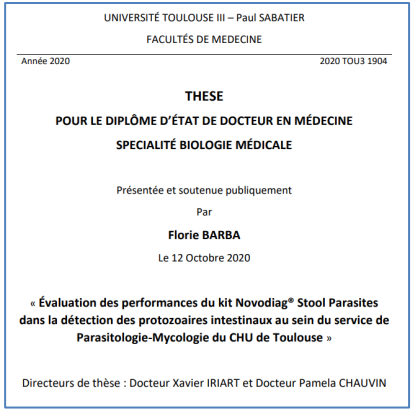
- **Données de la littérature :**

Novodiag® Stool Parasites (Mobidiag)

- Etude de 2020 (Thèse Florie Barba, Toulouse)

- **26 cibles** / évaluation de la détection des **protozoaires**

- **Kit vs microscopie/PCR** utilisées en routine (Amplidiag® Stool Parasites (Mobidiag) + PCR microsporidie)



UNIVERSITÉ TOULOUSE III – Paul SABATIER

FACULTÉS DE MEDECINE

Année 2020 2020 TOU3 1904

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

4- Performances

- **Données de la littérature :**

Novodiag® Stool Parasites (Mobidiag))

	Biologie moléculaire[1]		Novodiag® n=82		Sensibilité	Spécificité
	Positif	Négatif	Positif	Négatif		
Protozoaires par espèce						
Giardia intestinalis n=82	14 [26,61-35,15]*	69	10	73	**71%**	**100%**
Cryptosporidium sp. n=82	12 [25,13-40,95]*	70	7	76	**53,8%**	**100%**
Dientamoeba fragilis n=82	20 [16,23-35,49]*	63	14	69	**70%**	**100%**
Entamoeba histolytica n=82	4 [20,05-36,75]*	79	2	81	**50%**	**100%**
Encephalitozoon sp n=20	1 [36,04]	19	0	82	**1 échantil-lon non détecté**	**100%**
Enterocytozoon 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 Encephalito-zoon sp/Enterocytozoon sp)

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

[1] PCR Amplidiag® Stool parasite et/ou PCR microsporidies

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

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – Paul SABATIER

FACULTÉS DE MEDECINE

Année 2020 — 2020 TOU3 1904

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

- Sensibilité au moins équivalente à la microscopie

- Sensibilité inférieure aux PCR utilisées en routine pour les faibles charges parasitaires

- Excellente spécificité

5- Interprétation

Prestation de conseil du biologiste +++

Identification de certains protozoaires plus fréquemment en PCR qu'en microscopie…

Question récurrente → *Dientamoeaba fragilis / Blastocystis hominis*…que faire ?

→ Fréquence :

- 20% à 50% (PED) pour *B. hominis*
- 0% à 82% pour *D. fragilis*

→ **protozoaires digestifs les plus fréquemment retrouvés chez l'homme !**

→ **Rôle pathogène toujours discuté**

→ Implique une **exposition à un risque fécal** : explorations complémentaires → pathogène strict ?

→ Plus fréquents dans les colopathies chroniques ? Variable selon les études, dépend de la colopathie ?

5- Interprétation

- ***Blastocystis hominis :***

Etude prospective multicentrique française, 2016

RESEARCH ARTICLE Open Access

Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France

Dima El Safadi[1†], Amandine Cian[1†], Céline Nourrisson[2,3], Bruno Pereira[4], Christelle Morelle[5], Patrick Bastien[5], Anne-Pauline Bellanger[6], Françoise Botterel[7], Ermanno Candolfi[8], Guillaume Desoubeaux[9], Laurence Lachaud[10], Florent Morio[11], Christelle Pomares[12], Meja Rabodonirina[13], Ivan Wawrzyniak[3], Frédéric Delbac[3], Nausicaa Gantois[1], Gabriela Certad[1], Laurence Delhaes[1,14], Philippe Poirier[2,3*†] and Eric Viscogliosi[1*†]

- N = 788 selles / 11 hopitaux / PCR

- **Prévalence = 18.1 % :**

  → **Plus élevée :** . en **été** (été = 23.2 % vs hiver 13.7 %)
  . chez **les voyageurs**
  . chez **les sujets infectés par d'autres parasites**

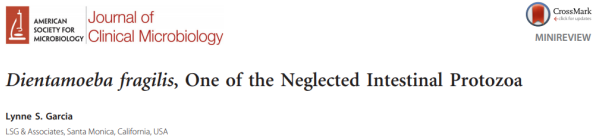
  → Pas de difference significative :
  . chez les patients symptomatiques
  . chez les patients atteints d'une pathologie chronique de l'intestin

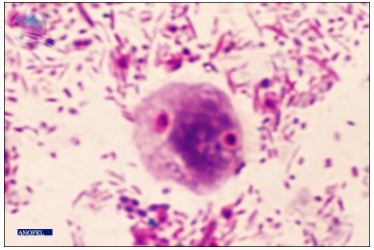
- Pas d'association significative entre le sous-type et les symptômes cliniques

5- Interprétation

- ***Dientamoeba fragilis :***

Revues de la littérature, 2016





- Difficilement observable en microscopie sans technique de coloration : très fréquemment isolé depuis la détection au sein de panels par PCR

- Cycle complet et mode de transmission toujours incertains

- Décrit chez des patients **asymptomatiques ou symptomatiques** (diarrhées, douleurs abdominales, fatigue…)

- La disparition des symptômes après élimination du protozoaire seraient en faveur d'un rôle pathogène

→ Diversité génétique…Certains génotypes non pathogènes ?

5- Interprétation

Prestation de conseil du biologiste +++

Identification de certains protozoaires plus fréquemment en PCR qu'en microscopie…

Question récurrente → *Dientamoeaba fragilis / Blastocystis hominis*…que faire ?

Généralement, traitement si :

- présence en grande quantité (impossible à dire en PCR sans Ct !)
- à plusieurs reprises
- en l'absence **d'autre parasite pathogène prouvé et de tout autre étiologie**

6- PCR/EPS conventionnel

- **Comment faire un choix ?**

- **Quelle population de patients ?**
  - voyageurs, enfants adoptés…
  - immunodéprimés…
  - → Panels cohérents

- **Quelles techniques et compétences disponibles ?**
  - techniciens et biologistes expérimentés : réalisation ET interprétation !
  - maintien de compétence facile à réaliser ?
  - faisabilité des techniques (séries, coup/coup, temps de réalisation…)

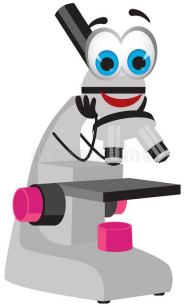
- **Quels objectifs ?**
  - screening ? Prescription orientée ?
  - suivi thérapeutique ?

- **Quelles performances ?**
  - extraction +++
  - PCR

- **Quel est le coût ?**

6- PCR/EPS conventionnel

- **Choix des hospices de Lyon :**



Examen parasitologique conventionnel systématique (Accrédité):

- examen direct (ED)
- méthode de concentration de Ritchie (diphasique)
- méthode de concentration de Willis (flottation)
- technique de Baermann (fonction du contexte)

+ **PCR Giardia / Amibes** : si demande spécifique/suivi thérapeutique/identification d'amibes à l'ED

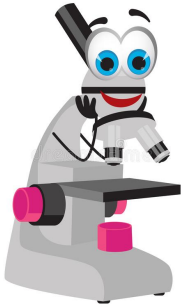
ParaGENIE *Cryptosporidium Microsporidies*
Real-Time PCR Kit

+ **PCR Cryptosporidie / Microsporidie :** prescription orientée du clinicien dans un contexte d'immunosuppression

ParaGENIE *Giardia-Amoeba*
Real-Time PCR Kit

6- PCR/EPS conventionnel

- **Choix des hospices de Lyon :**



Examen parasitologique conventionnel systématique (Accrédité):

- examen direct (ED)
- méthode de concentration de Ritchie (diphasique)
- méthode de concentration de Willis (flottation)

Avenir de l'EPS conventionnel à Lyon ???

- **Difficultés à habiliter le personnel :**

Turn over +++ des techniciens, départ des biologistes microscopistes expérimentés, moins de parasitoses importées (exceptés les migrants), moins de parasitoses opportunistes qu'au moment de l'émergence du VIH

- **Temps technicien +++**

- **Performances des PCR non équivalentes pour tous les parasites…Mais à l'avenir ?**

6- PCR/EPS conventionnel

- **En résumé :**

	EPS conventionnel	PCR
Réalisation technique	Temps techniciens : chronophage +++	**Rapide : automatisation extraction / amplification**
Compétence du personnel	Expérience +++	**Formation rapide** **Mais perte de compétences en microscopie**
Echantillonage	Faible	. Important pour les techniques réalisées en séries . Faible pour les techniques "au coup par coup" (panels syndromiques/PCR multiplex en système fermé)
Nombre d'échantillons de selles à tester	3 selles / 10 jrs	3 selles / 10 jrs
Sensibilité	. Opérateur dépendant +++ . Insuffisante pour le suivi thérapeutique (Giardiose...) . Difficultés de mise en évidence des formes végétatives, des parasites fragiles	**. Excellentes performances SEULEMENT SI l'extraction performante** . Résultats qualitatifs moins intéressants pour le suivi thérapeutique . Variable en fonction du pathogène pour certains panels
Spécificité	Limitée pour certains parasites (*E. histolytica* vs *E. dispar* par ex.)	**Excellente**
Accréditation	Difficile (notamment le maintien de compétence)	**Facile (marquage CE, excellente reproductibilité)**
Parasites détectés	Pas de restriction **(sauf techiques spécifiques comme Baermann)**	Panels parfois inadaptés
Cotation	**Nomenclature**	Hors nomenclature (RIHN non facturables au patients !)
Interprétation	**Prescription orientée du clinicien, dans un contexte épidémiologique particulier orientant la réalisation des techniques**	. Panels restreints : prescription orientée . Syndromique : pas de prescription orientée (difficultés d'interprétation) . Parasites viables ? Traces d'ADN ? . Problème en présence d'inhibiteurs

7- Conclusion

- Microscopie limitée aux **personnels expérimentés**
- **Complémentarité** des techniques au sein de son laboratoire
- Connaître les limites de ses techniques et **savoir rediriger vers un laboratoire spécialisé**
- **Savoir interpréter** ce que l'on rend (*Blastocystis hominis, Dientamoeba fragilis*…)
- Intérêt +++ de la PCR pour **Cryptosporidies / Microsporidies**

  - Recherche de cryptosporidies peu demandée :
  augmentation des diagnostics en ville depuis l'utilisation de panels qui ciblent *Cryptosporidium*

  - Recherche de microsporidies difficile en microscopie, même avec l'expérience