



**HAL**  
open science

# Étude épidémiologique portant sur la détection moléculaire d'un panel de dix parasites gastro-intestinaux, à Marseille

Estelle Menu

► **To cite this version:**

Estelle Menu. Étude épidémiologique portant sur la détection moléculaire d'un panel de dix parasites gastro-intestinaux, à Marseille. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02154179

**HAL Id: dumas-02154179**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02154179>**

Submitted on 12 Jun 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT  
A LA FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 29 MAI 2019

PAR

Mme **Estelle MENU**

Née le 4 Février 1992 à Quimperlé

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**  
**ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE PORTANT SUR LA DETECTION  
MOLECULAIRE D'UN PANEL DE DIX PARASITES GASTRO-  
INTESTINAUX, A MARSEILLE.**

**THESE ARTICLE**

----oOo----

**JURY :**

Président : Pr Philippe COLSON – PU-PH (IHU Méditerranée Infection)

Membres : Dr Fadi BITTAR (Directeur de thèse) – MCU (IHU Méditerranée Infection)  
Pr Stéphane RANQUE – PU-PH (IHU Méditerranée Infection)  
Dr Coralie L'OLLIVIER – MCU-PH (IHU Méditerranée Infection)  
Dr Charles MARY – MCU-PH (IHU Méditerranée Infection)



## THESE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT  
A LA FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE  
LE 29 MAI 2019

PAR

**Estelle MENU**

Née le 4 Février 1992 à Quimperlé

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**  
**ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE PORTANT SUR LA DETECTION  
MOLECULAIRE D'UN PANEL DE DIX PARASITES GASTRO-  
INTESTINAUX, A MARSEILLE.**

**THESE ARTICLE**

----oOo----

**JURY :**

Président : Pr Philippe COLSON – PU-PH (IHU Méditerranée Infection)

Membres : Dr Fadi BITTAR (Directeur de thèse) – MCU (IHU Méditerranée Infection)

Pr Stéphane RANQUE – PU-PH (IHU Méditerranée Infection)

Dr Coralie L'OLLIVIER – MCU-PH (IHU Méditerranée Infection)

Dr Charles MARY – MCU-PH (IHU Méditerranée Infection)

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

**ADMINISTRATION :**

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. JeanClaude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

**DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**  
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

**PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT  
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE  
INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE  
INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

## A.H.U

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

## DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

## PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-  
MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## A.H.U

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

## MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

## MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

## A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

## ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

---

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

## REMERCIEMENTS

### **A Monsieur le Professeur Philippe COLSON,**

Vous me faites l'honneur et le plaisir de présider ce jury de thèse. Je tiens à vous assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

### **A Monsieur le Docteur Fadi BITTAR,**

Merci de me faire l'honneur de diriger cette thèse. Je te remercie pour ta disponibilité et ta confiance témoignée en me confiant la réalisation de ce travail. Tes conseils m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti chercheur ». Sois assuré de mon profond respect et de mon entière reconnaissance.

### **A Monsieur le Professeur Stéphane RANQUE,**

Merci de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir intégré à l'équipe de Parasitologie-Mycologie de l'IHU Méditerranée Infection de Marseille, et pour la confiance que vous me témoignez. Soyez assuré de mon profond respect et de mon entière reconnaissance.

### **A Monsieur le Docteur Charles MARY,**

Merci de participer à mon jury de thèse et pour l'honneur que vous me faites en jugeant mon travail. Je vous remercie pour vos multiples conseils qui m'ont fait progresser, notamment dans le domaine de la Biologie moléculaire. J'ai appris beaucoup à vos côtés, je vous exprime donc toute ma gratitude ainsi que mon infini respect.

**A Madame le Docteur Coralie L'OLLIVIER,**

Merci de participer à mon jury de thèse. Merci pour ces moments passés au laboratoire en ta présence à partager tes connaissances sans faille, ta passion pour la discipline, pour tes multiples conseils et ton soutien pour ce projet et d'autres. J'ai appris et j'apprends beaucoup à tes côtés. Ta disponibilité, ta patience et ta pédagogie sont admirables et exemplaires pour bon nombre d'internes. Je te serais toujours reconnaissante d'avoir accepté de m'encadrer pour ma thèse de science à venir. Merci à toi.

**A toute l'équipe de Parasitologie,** qui ne fait pas partie de mon jury,

Carole et Bella, Merci pour votre bonne humeur quotidienne, quel plaisir de travailler avec vous.

**Mes plus profonds remerciements vont à ma famille.**

**A mes parents,**

Merci pour votre soutien indéfectible et vos encouragements dans mes projets personnels et professionnels, aussi bien Méditerranéens qu'Outre-Atlantique. C'est grâce à vous que j'ai pu réaliser ces longues et belles études et que j'exerce aujourd'hui un fabuleux métier.

Je vous en serai éternellement reconnaissante.

**A mon frère et ma sœur,**

Victor, Merci pour ta joie de vivre, la fierté que tu me procures et d'être toujours présent, même quand il faut retarder un départ à l'étranger.

Barbara, Merci d'être présente en toutes circonstances, de me soutenir dans toutes mes décisions et de demeurer mon modèle.

**A Rémi,**

Mon amour, Merci de m'avoir suivi dans tous mes projets, et pour les conseils et l'aide précieuse que tu m'as apporté durant ce travail. Merci pour ton amour, tous les merveilleux moments déjà passés ensemble, et les futurs que je n'imagine pas sans toi ...

**A mes amis,**

**Jeanne**, tu me soutiens depuis 27 ans et ce malgré la distance, Merci.

**Marine, Catherine, Charlotte, Anne-Charlotte, Maud et Sach,**

A tous les bons moments passés ensemble, en Bretagne, à Marseille et à l'étranger ! Vous êtes mon roc.

**Audrey**, je résume mes remerciements en une phrase culte « gracia por el amor ».

**Maud M.**, mon binôme pour toujours. J'ai pensé à toi tout au long de la mise en page de cette thèse en souvenir de notre projet mené à bien.

**Stéphanie**, que de chemin parcouru depuis le lycée ...

**Léa**, je suis heureuse de partager cette journée avec toi. On se suit depuis 5 ans et ce n'est pas près de s'arrêter. Et à Jeremy.

**Maude**, Bretonne de cœur, Marseillaise d'adoption, quel bonheur que l'on se soit trouvées après notre « grande migration ». Et à Bobby.

**Clémence**, mère Noël d'exception, en souvenir de nos sessions thés dans ta chambre d'internat. Et à Guillaume.

**Thibault et Julien**, difficile de résumer nos souvenirs en une phrase. Parce qu'avoir des amis comme vous est inestimable, Merci d'avoir toujours été présents. A tous nos futurs moments partagés.

**Baptiste**, reviens à Marseille, je suis sûre que le pastis est mauvais en Suisse.

**Lina**, pour nos rendez-vous au QG. Merci pour ton soutien, tes conseils, tes anecdotes...

**Jean Selim**, pour tes blagues quotidiennes et ton amour pour les PKO.

**Damien**, Merci pour la blague sur les nénuphars et toutes les autres ...

**Maxime et Stéphanie**, hâte de découvrir Lyon avec vous.

**Jordan**, Merci pour ton bronzage toujours impeccable,

**Chloé, Florence et Pauline**, un trio de choc, merci pour vos encouragements pour cette thèse.

**La team Master 2,**

**Anne**, Merci pour nos sessions shopping décompression, même en présence de Jeanne qui a rajouté des moments mémorables.

**Sophie**, Merci pour ta bonne humeur sans faille, nos parties mémorables de « pandémie ».

**David et Simon**, La touche masculine de cette team de choc.

**La Team Guyane**,

**L'équipe du Centre Hospitalier de Cayenne** pour leur investissement au quotidien et leurs grandes qualités humaines.

**Emma**, la meilleure colocataire que j'ai connue, la forêt amazonienne n'a (presque) plus de secret pour nous.

**Mathilde**, qui m'a ouvert les yeux sur l'épreuve que représente la thèse.

**Paul**, Merci pour ton humour permanente et tes précieux conseils.

**Félix**, Merci pour tes déguisements toujours aussi impressionnants.

**Stéphanie, Laure, Elsa**, pour nos souvenirs Canoë - Carbets qui m'ont fait rêver quand je passais mes journées à rédiger cette thèse.

**A tous mes co-internes**, parce qu'un choix d'interne est toujours exceptionnel.

A toutes les personnes que j'ai pu croiser dans mon cursus, car chaque rencontre est unique.

Merci à tous les ingénieurs et techniciens qui ont contribué à ce projet.

***« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »***

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>19</b>
<b>PARTIE I – Revue de la littérature – Parasites gastro-intestinaux d’intérêt médical et leurs Méthodes diagnostiques au laboratoire</b> .....	<b>22</b>
<b>1. Les Protozoaires et Microsporidies d’intérêt médical</b> .....	<b>23</b>
1.1 Généralité sur les protozoaires .....	23
1.2 Épidémiologie des parasites gastro-intestinaux dans les pays développés.....	24
1.3 Mode de transmission, cycle, pathogénicité.....	26
<i>Balantidium coli</i> .....	26
<i>Blastocystis</i> spp.....	27
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i> .....	27
<i>Cyclospora cayetanensis</i> .....	29
<i>Cystoisospora belli</i> .....	30
<i>Dientamoeba fragilis</i> .....	31
<i>Entamoeba histolytica</i> .....	32
Microsporidies : <i>Encephalitozoon intestinalis</i> , <i>Enterocytozoon bienewisi</i> .....	33
<i>Giardia intestinalis</i> .....	34
1.4 Traitement.....	38
<b>2. Les Méthodes diagnostiques au laboratoire</b> .....	<b>38</b>
2.1 Le diagnostic microscopique .....	39
2.2 Détection d’antigènes dans les selles.....	45
<b>3. Le diagnostic moléculaire au laboratoire</b> .....	<b>49</b>
3.1 Principe et intérêt .....	49
3.2 La PCR en temps réel.....	52
3.3 Le prétraitement.....	56
3.4 L’extraction d’ADN.....	57
3.5 Les nouvelles techniques de diagnostic.....	58
<b>PARTIE II – Article</b> .....	<b>60</b>
1. Introduction et résumé de l’article .....	61
2. Articles .....	62
2.1. Article 1 : Étude préliminaire.....	63
2.2. Article 2 : Étude principale .....	70
<b>PARTIE III – Discussion</b> .....	<b>79</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>87</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>88</b>
<b>ANNEXE 1. Serment de Galien</b> .....	<b>107</b>

## *LISTE DES TABLEAUX*

TABLEAU 1. RESUME DE LA TRANSMISSION ET DE LA PATHOGENICITE DES PROTOZOAIRES ET MICROSPORIDIES PATHOGENES D'INTERET MEDICAL (REALISE A PARTIR DE L'ETUDE DE FLETCHER ET AL. [5]). .....	36
TABLEAU 2. TRAITEMENT DES INFECTIONS A PROTOZOAIRES ET MICROSPORIDIES.....	38
TABLEAU 3. LES PRINCIPALES METHODES DE CONCENTRATION DE PARASITES DANS LES SELLES (HORS KITS PRET A L'EMPLOI) .....	42
TABLEAU 4. ANTIGENES DETECTES DANS LES KITS DISPONIBLES SUR LE MARCHE.....	48
TABLEAU 5. LISTE NON EXHAUSTIVE PRESENTANT LA DIVERSITE DES PANELS DE PROTOZOAIRES ET MICROSPORIDIES DETECTES PAR PCR MULTIPLEX DANS DIFFERENTES ETUDES PUBLIEES DANS LA LITTERATURE.....	53
TABLEAU 6. LISTE DES KITS COMMERCIAUX MULTIPLEX DISPONIBLES SUR LE MARCHE ET DES DIFFERENTS PATHOGENES DETECTES.....	55

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. CLASSIFICATION DES PROTISTES PROPOSEE PAR LA SOCIETE INTERNATIONALE DES PROTISTOLOGUES [22].....	24
FIGURE 2. CARTE DE L'EUROPE REALISEE A PARTIR DE L'ETUDE DE FLETCHER ET AL. [5], REPRESENTANT LA REPARTITION DES PROTOZOAIRES D'INTERET MEDICAL. ....	25
FIGURE 3. FORMES PARASITAIRES OBSERVEES APRES DIFFERENTES COLORATIONS ET/OU EXAMEN DIRECT (LISTE NON EXHAUSTIVE) <b>A.</b> OOCYSTES DE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> SPP. APRES COLORATION ZIEHL NEELSEN MODIFIEE (GROSSISSEMENT x500) <sup>1</sup> ; <b>B.</b> KYSTES D'ENTAMOEBIA HISTOLYTICA APRES COLORATION AU LUGOL (GROSSISSEMENT x400) <sup>2</sup> ; <b>C.</b> BLASTOCYSTIS SPP. APRES COLORATION TRICHROME <sup>3</sup> ; <b>D.</b> KYSTES D'ENTAMOEBIA HISTOLYTICA APRES EXAMEN DIRECT (GROSSISSEMENT x400) <sup>2</sup> ; <b>E.</b> KYSTE DE <i>GIARDIA INTESTINALIS</i> APRES CONCENTRATION PAR LA METHODE DE BAILENGER (GROSSISSEMENT x400) <sup>2</sup> ; <b>F.</b> FORMES VEGETATIVES DE <i>GIARDIA INTESTINALIS</i> APRES EXAMEN DIRECT (GROSSISSEMENT x400) <sup>2</sup> ; <b>G.</b> GRAPPE DE SPORES D'ENCEPHALITOOZON INTESTINALIS APRES COLORATION TRICHROME <sup>3</sup> ; <b>H.</b> FORMES VEGETATIVES DE <i>BALANTIDIUM COLI</i> APRES EXAMEN DIRECT (GROSSISSEMENT x400) <sup>3</sup> ; <b>I.</b> FORME VEGETATIVE DE <i>DIENTAMOEBIA FRAGILIS</i> APRES COLORATION AU LUGOL (GROSSISSEMENT x400) <sup>3</sup> ; <b>J.</b> OOCYSTE DE <i>CYSTOISOSPORA BELLI</i> APRES EXAMEN DIRECT (GROSSISSEMENT x400) <sup>3</sup> ; <b>K.</b> OOCYSTES DE <i>CYCLOSPORA CAYETANENSIS</i> APRES COLORATION ZIEHL NEELSEN MODIFIEE (GROSSISSEMENT x500) <sup>3</sup> .....	44
FIGURE 4. PRINCIPE D'UN TEST IMMUNO-CHROMATOGRAPHIQUE.....	46
FIGURE 5. PRINCIPE D'UN TEST ELISA DIRECT. ....	46
FIGURE 6. PRINCIPE DE LA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). ....	50

## *TABLE DES ABREVIATIONS*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomale

Ct : Cycle Threshold

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert

HSH : Homme ayant des rapports avec des hommes

Hsp-70 : Heat Shock Protein 70 (Protéine du choc thermique)

ITS : Internal Transcribed Spacer

LAMP : Loop Mediated Isothermal Amplification (amplification d'ADN à température constante via une structure en boucle)

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight

PCR : Polymerase chain reactions (Réaction en chaîne par polymérase)

qPCR : Polymerase chain reactions quantitative en temps réel

SIDA : Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise

SMX : Sulfaméthoxazole

ST : Sous-type

TDR : Test de Dépistage Rapide

TMP : Triméthoprime

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine

VO : Voie orale

# INTRODUCTION

Les infections par des parasites gastro-intestinaux représentent un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 3,5 milliards de personnes sont infectées par des parasites intestinaux dans le monde, et que 450 millions d'entre elles en sont malades, majoritairement des enfants [1]. Parmi les maladies tropicales, les infections impliquant les protozoaires et les helminthes sont négligées alors qu'elles jouent un rôle majeur dans les principaux troubles du système digestif à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité à travers le monde [2]. Les diarrhées étaient responsables de plus de 1.4 million de décès en 2010, représentant ainsi la 7<sup>ème</sup> cause de décès à laquelle les enfants sont les plus vulnérables [3].

Peu d'attention a été porté vis à vis des modifications écologiques dans les pays industrialisés, malgré la mobilité grandissante des populations, probablement due aux meilleures normes sanitaires déjà en places. De plus, une estimation de l'incidence des infections parasitaires est compliquée à cause du manque de données disponibles due à un sous-diagnostic conjugué à un manque de surveillance épidémiologique [4]. Nous associons jusqu'ici les maladies parasitaires à des régions tropicales et subtropicales bien éloignées. Cependant, toutes les maladies parasitaires intestinales ne sont pas importées. Dans les pays industrialisés, des parasites gastro-intestinaux comme les protozoaires ont été isolés chez 1 à 65% des patients présentant des diarrhées [5], avec une forte représentation de *Blastocystis* spp. *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis* et *Giardia intestinalis*. Cela peut s'expliquer en partie par la fréquence croissante des voyages dans des pays à risques sanitaires, la migration globale, la mondialisation, les voies de transport rapides pour les aliments frais et les modifications climatiques. Malgré une réelle demande venant des cliniciens dans les pays industrialisés [6], aucune étude prospective à visée épidémiologique n'a été réalisée jusqu'alors en France.

A ce jour, l'examen microscopique des prélèvements de selles est considéré comme le gold standard pour détecter et identifier les protozoaires intestinaux au laboratoire. Cette technique manque cependant de sensibilité, de spécificité et de reproductibilité particulièrement dans les investigations épidémiologiques [7]. De plus, le diagnostic actuel par microscopie est opérateur-dépendant, nécessite de l'expérience et une présence du parasite intègre dans les échantillons. L'utilisation d'outils moléculaires a eu un succès grandissant ces dernières années [8] permettant ainsi de s'affranchir de telles restrictions. En effet, la réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (qPCR) et la PCR conventionnelle ont démontrées leur sensibilité pour les helminthes et les protozoaires intestinaux [7,9]. Ces outils diagnostiques innovants ont pour avantage d'améliorer la détection de patients infectés notamment lors de faible intensité parasitaire [10] et permettent l'indentification exacte d'espèces morphologiquement identiques [8]. La qPCR est plus intéressante que la PCR conventionnelle du point de vue méthodologique car elle réduit le risque de contamination, elle est plus rapide, plus sensible, plus spécifique et le coup des réactifs est moindre [11,12]. Cependant, les méthodes moléculaires sont particulièrement sensibles à la qualité ainsi qu'à la pureté de l'ADN initialement extrait [13]. Le choix d'une technique d'extraction adaptée est donc une étape critique : elle doit être extrêmement performante aussi bien pour l'extraction de l'ADN et sa purification que pour la spécificité et la sensibilité de l'amplification par PCR. Lors de la recherche de protozoaires, l'extraction doit ainsi être suffisamment efficace pour rompre les kystes et les oocystes de protozoaires et éliminer les inhibiteurs de PCR tels que les sels biliaires, l'urée, l'hémoglobine ou l'héparine, fréquemment présents dans les selles [14].

A ce jour, plusieurs essais par qPCR ont été développés indépendamment afin de détecter les principaux helminthes et protozoaires intestinaux [7], et la comparaison avec la microscopie a montré la supériorité des techniques moléculaires concernant la sensibilité de détection des parasites [9,15,16]. Mais jusqu'à présent, la plupart des études utilisent la qPCR pour un nombre limité de protozoaires [10,11,17]. Avec l'avènement des laboratoires Point Of Care ces

dernières années, des kits de PCR multiplex pouvant détecter jusqu'à une vingtaine de pathogènes dont des parasites ont vus le jour [18–20]. D'autres outils innovants dans le domaine de la protéomique sont également disponibles tels que la spectrométrie de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight (MALDI-TOF MS) mais ils rencontrent de nombreuses difficultés freinant leur développement [21].

Afin d'apporter des données épidémiologiques Françaises nous avons réalisé, à Marseille, une étude prospective recherchant par qPCR simultanément les dix parasites gastro-intestinaux (huit protozoaires et deux microsporidies) les plus fréquemment retrouvés dans les pays développés. Le choix des parasites recherchés est fondé sur les données de la littérature. D'après la revue de Fletcher et al. [5], les principaux protozoaires gastro-intestinaux présentant un intérêt du point de vue de la santé publique sont : *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Blastocystis* spp., *Cystoisospora belli*, et *Balantidium coli* et deux microsporidies *Enterocytozoon bieneusi* et *Encephalitozoon intestinalis*.

PARTIE I – Revue de la littérature –  
Parasites gastro-intestinaux d'intérêt  
médical et leurs Méthodes diagnostiques  
au laboratoire

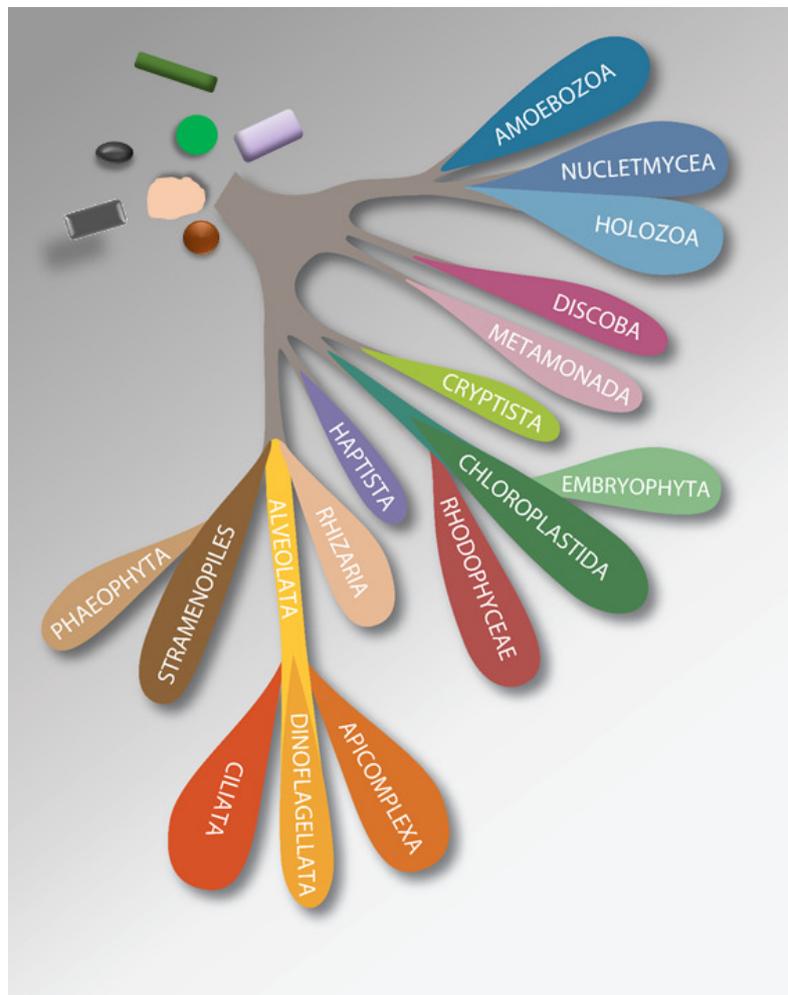
# 1. Les Protozoaires et Microsporidies d'intérêt médical

Cette première partie a pour objectif de faire la synthèse sur les connaissances actuelles concernant dix protozoaires gastro-intestinaux et microsporidies d'intérêt médical chez l'Homme, concernant leur mode de transmission (cycle), leur pathogénicité, leur traitement, et leur épidémiologie dans les pays développés.

## 1.1 Généralité sur les protozoaires

Le terme protozoaire (du grec *protos*, premier et *zoon*, animal) fait traditionnellement référence aux protistes chimio-organotrophes. Ce sont des eucaryotes unicellulaires qui forment un groupe paraphylétique complexe très diversifié. Comme ils sont unicellulaires, les différentes fonctions vitales doivent toutes se dérouler dans une seule cellule. Ils se constituent donc d'un noyau, de vacuoles, de mitochondrie et d'un réseau membranaire. Depuis la description en 1674 du premier protozoaire (« animacule ») par Antonie van Leeuwenhoek, la taxonomie des protistes a été soumise à des remaniements constants. Au cours du vingtième siècle, leur classification reposait sur des critères morphologiques et l'on distinguait habituellement quatre principaux groupes fondés sur leurs moyens de locomotion : les flagellés (*Mastigophora*), les ciliés (*Infusoria* ou *Ciliophora*), les amibes (*Sarcodina*) et les formes stationnaires (*Sporozoa*). Ils sont aujourd'hui répartis dans de nombreux clades grâce aux outils moléculaire, morphologiques, biochimiques et phylogénétiques (Figure 1). Néanmoins leur taxonomie reste un domaine de recherche active.

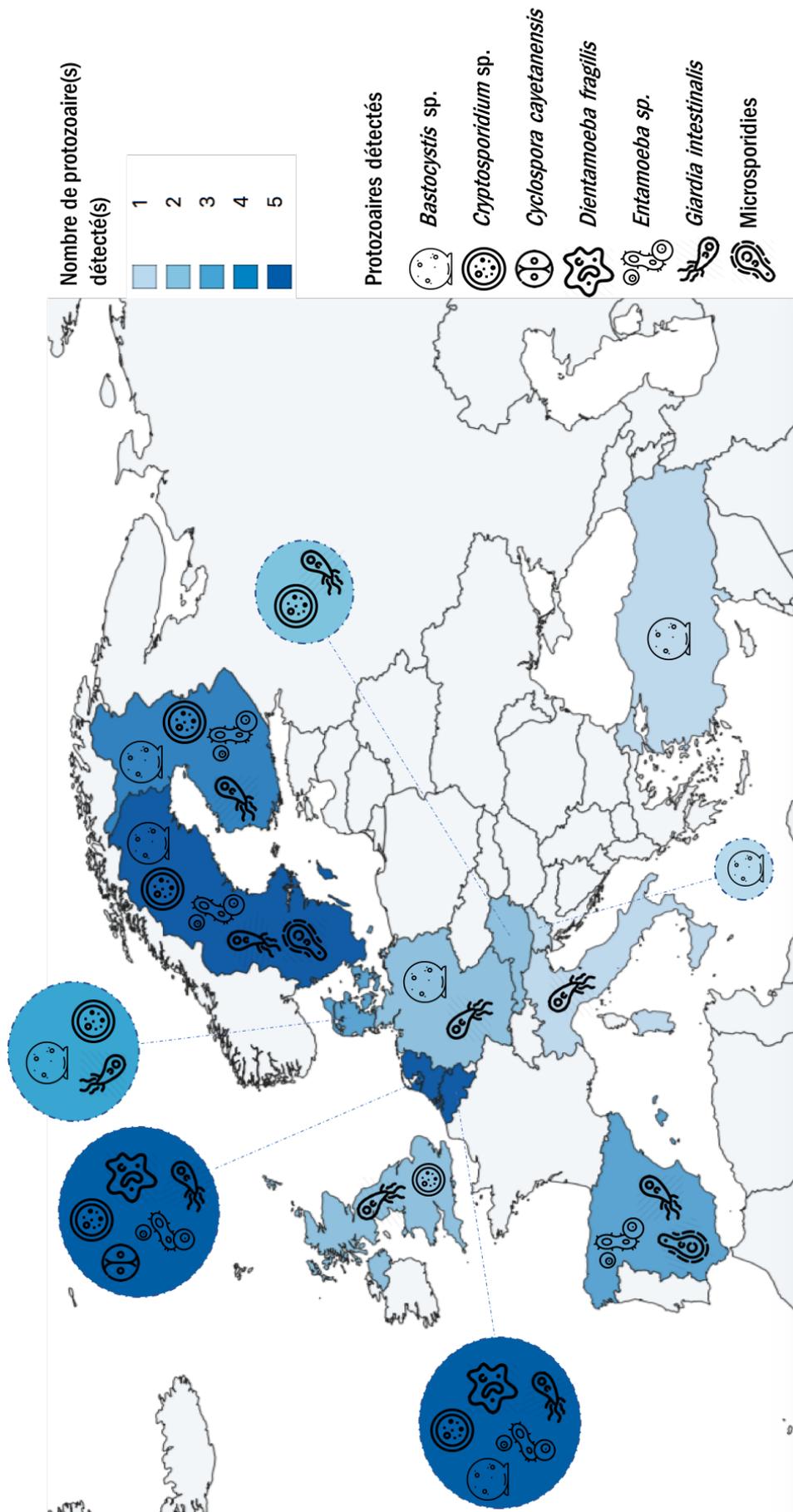
Figure 1. *Classification des protistes* proposée par la Société Internationale des Protistologues [22].



## 1.2 Épidémiologie des parasites gastro-intestinaux dans les pays développés

L'étude de Fletcher et al. publiée en 2012 estime le nombre de parasites intestinaux isolés chez des patients diarrhéiques entre 1 et 65%, dans les pays développés [5]. Ces parasites sont principalement des protozoaires. Cette revue de la littérature réalisée depuis les années 1980, fourni une estimation de la prévalence des parasites gastro-intestinaux dans les pays développés. La figure 2, réalisée à partir des données de cette étude, résume la répartition de ces protozoaires en Europe.

Figure 2. Carte de l'Europe réalisée à partir de l'étude de Fletcher et al. [5], représentant la répartition des protozoaires d'intérêt médical.



Dans les pays développés, les protozoaires les plus fréquemment retrouvés sont :

- *Giardia intestinalis* 0.2% à 29.2%
- *Cryptosporidium* spp. 0.1% à 9.1%
- *Entamoeba* spp. 0.2% à 12.5%
- *Cyclospora cayetanensis* 0.2% à 4.3%
- *Blastocystis* spp. 0.4% à 18.1%
- *Dientamoeba fragilis* 0.4% à 6.3%

Ainsi, on constate qu'aucune donnée n'est disponible en France, et que dans la majorité des pays Européens concernés par cette étude, seul(s) un à trois parasite(s) est (sont) détecté(s).

De plus, les études citées par Fletcher et al. reposent en majorité sur la détection microscopique des protozoaires; ainsi la prévalence est probablement sous-estimée. Ce qui souligne le besoin d'apporter des données épidémiologiques précises et détaillées en Europe.

### 1.3 Mode de transmission, cycle, pathogénicité

#### ***Balantidium coli***

*Balantidium coli* est un protozoaire cilié appartenant à l'embranchement des Ciliophora. Il existe sous deux formes : végétative (trophozoïte) et kystique [23]. L'un des hôtes habituels de *B. coli* est le porc domestique ou d'élevage. Le risque majeur d'infection chez l'Homme est lié au contact avec le porc ou ses fèces [24]. L'homme se contamine accidentellement par ingestion de kystes présents dans les selles de porcs, d'homme [25], ou en ingérant de l'eau contaminée [26]: c'est une transmission oro-fécale. Les trophozoïtes vont ensuite coloniser le gros intestin et se multiplier par scissiparité. Après enkystement, ils seront éliminés dans les fèces.

*Balantidium coli* est responsable de la balantidiase. Cette maladie est majoritairement asymptomatique, ainsi les porteurs servent de réservoir d'infection dans la communauté [25]. Mais la symptomatologie peut être bruyante : l'infection se manifeste alors par une diarrhée non sanglante, des crampes et des douleurs abdominales consécutives à l'invasion du gros

intestin par des trophozoïtes. Ce syndrome dysentérique peut se compliquer d'hémorragies intestinales voir de perforation intestinale [27]. Bien que la balantidiase soit majoritairement intestinale, on retrouve également des atteintes urinaires [28] et pulmonaires [29].

### ***Blastocystis spp.***

*Blastocystis* spp. est un protozoaire intestinal cosmopolite appartenant au groupe des Straménophiles. Il existe sous six différentes formes morphologiques : vacuolaire, avacuolaire, multivacuolaire, granulaire, amiboïde et kystique [30]. On dénombre aujourd'hui 17 sous-types de *Blastocystis*. Bien que décrit depuis le début des années 1900, le rôle de *Blastocystis* spp. en santé humaine ainsi que son cycle restent méconnus. De nombreux animaux sont des hôtes naturels de ce parasite [31,32]. Une transmission zoonotique a été décrite pour certains sous-types de *Blastocystis* spp..

La pathogénicité de *Blastocystis* spp. est à l'heure actuelle très controversée. Une colonisation par ce protozoaire est fréquente chez des porteurs asymptomatiques [33] mais son pouvoir pathogène a été démontrée *in vitro* [34] avec mise en évidence de facteurs de virulence : diverses enzymes et structures aux effets immuno-modulatrices [34,35]. Des études conduites ces dernières années, semblent pencher en faveur d'une pathogénicité de certains sous-types [35]. Ainsi, le sous-type 4 (ST4) qui est le plus fréquemment retrouvé en Europe [36] a été associé à des diarrhées infectieuses [37]. De même, le sous-type 6 (ST6) qui a jusqu'alors principalement été décrit chez des oiseaux suggérant une transmission zoonotique [31,32] a récemment été associé à un groupe de patients ayant des symptômes gastro-intestinaux [30].

### ***Cryptosporidium parvum/hominis***

*Cryptosporidium* sp. est un coccidie, parasite unicellulaire appartenant à l'embranchement des Apicomplexa. Le genre *Cryptosporidium* regroupe 30 espèces distinctes [38], parmi lesquelles on retrouve *C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* et *C. muris*, capables

d'infecter l'homme [39,40]. Les oocystes sporulés, contenant 4 sporozoïtes, sont excrétés par l'hôte infecté au niveau des matières fécales ou plus exceptionnellement des excréctions respiratoires. Les oocystes, sont des formes de dissémination résistantes dans l'environnement. Des voies de transmission directes et indirectes de *Cryptosporidium* ont été identifiées. La transmission directe se fait par voie féco-orale, les oocystes étant directement infectant lors de l'excrétion, à partir d'hôtes infectés. Elle peut être zoonotique (animal-homme) [41,42] ou anthroponotique (homme-homme) [43], et est à l'origine d'épidémies familiales [44] et nosocomiales [45]. La transmission indirecte, liée au péril fécal, implique l'ingestion accidentelle d'oocystes par l'intermédiaire d'eau ou d'aliments contaminées [46]. De nombreuses épidémies d'origine hydrique ont été décrites [26,47,48]. Un autre mode de transmission, par inhalation d'oocystes, a été rapporté chez des patients immunodéprimés et des enfants [49]. Après ingestion par un hôte approprié, les sporozoïtes mobiles sont libérés et parasitent les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal. La prolifération et la différenciation s'effectue dans une vacuole intracellulaire dite vacuole parasitophore située au niveau du pôle apical des entérocytes. Les parasites subissent une multiplication asexuée (schizogonie) puis sexuée (gamétogonie) produisant des microgamontes (mâle) et macrogamontes (femelle). Les microgamontes deviennent plurinucléés et chaque noyau qu'ils contiennent s'incorpore dans un microgamète. Les macrogamontes demeurent uninucléés en devenant des macrogamètes. La fécondation des macrogamètes par les microgamètes engendre un zygote diploïde qui se différencie en oocyste. Deux types d'oocystes sont produits, le type à paroi épaisse, généralement excrété de l'hôte, et le type à paroi mince (20% des oocystes formés) qui est principalement impliqué dans l'auto-infection [50].

*Cryptosporidium* spp. est responsable de la cryptosporidiose. Les deux principales espèces responsables d'infection humaine sont *Cryptosporidium parvum* et *C. hominis* [51], représentant plus de 90% des cas de cryptosporidiose [52]. La maladie se caractérise par une diarrhée liquide qui peut être profuse ou prolongée [53]. Elle peut s'accompagner de symptômes

aspécifiques tels que des douleurs abdominales, anorexie, myalgies, céphalées et une sensation de malaise [53]. La sévérité de la cryptosporidiose est variable, allant d'une élimination asymptomatique des oocystes à une maladie grave et potentiellement mortelle [46]. La sévérité dépend en partie du statut immunitaire du patient : un individu immunocompétent aura une symptomatologie bénigne, spontanément résolutive en deux à trois semaines [46]. Pour un individu immunodéprimé la cryptosporidiose peut être une maladie grave caractérisée par des symptômes persistants conduisant à une déshydratation et un syndrome de malabsorption voir au décès [54]. Chez les enfants de moins de deux ans, immunocompétents, il existe un risque important de déshydratation [55], et des retards de croissance [56]. Enfin, l'infection à *Cryptosporidium* spp. peut provoquer des manifestations atypiques extra-gastro-intestinales parmi lesquelles des atteintes des voies biliaires, des pancréatites et des atteintes des voies respiratoires [57].

### ***Cyclospora cayetanensis***

*Cyclospora cayetanensis* est une coccidie, parasite unicellulaire appartenant à l'embranchement des Apicomplexa. Les sujets atteints d'une infection à *Cyclospora cayetanensis* excrètent des oocystes non sporulés, et donc non directement infectants dans leurs matières fécales [58]. Dans l'environnement, les oocystes nécessitent de 7 à 15 jours dans des conditions idéales (23 à 27°C) pour sporuler et devenir infectieux pour l'Homme. La transmission est majoritairement indirecte via l'eau [59,60] ou les aliments contaminés [61–63]. Une fois les oocystes infectieux ingérés par l'hôte, les sporozoïtes sont libérés et infectent les cellules épithéliales du duodénum et du jéjunum. Dans ces cellules, les parasites subissent une multiplication asexuée (schizogonie) puis sexuée (gamétogonie) produisant des gamétocytes. Le macrogamétocyte est alors fécondé par le microgamétocyte et produit un zygote. Les oocystes non sporulés vont ensuite se former [58]. Bien que responsable d'infection principalement humaines [64], le

parasite a été isolé dans des fèces de poulets [65], de canards [66] et de chiens [67], suggérant que ces animaux représentent des réservoirs potentiels [58].

*Cyclospora cayetanensis* est responsable de la cyclospore. Cette pathologie se caractérise par une anorexie, des nausées, des flatulences, de la fatigue, des crampes abdominales, de la diarrhée, une fièvre légère et une perte de poids [62,68]. Les symptômes apparaissent 1 à 2 semaines après l'infection [62]. La symptomatologie est accentuée chez les patients infectés par le VIH où l'on observe des pertes de poids importante [69], et une diarrhée souvent prolongée [70]. Des atteintes biliaires ont également été rapportés dans la littérature [70,71], et des syndromes de Guillain-Barré [72] et de Reiter [73] ont été décrit à la suite d'infections à *Cyclospora*.

### ***Cystoisospora belli***

*Cystoisospora belli* est un parasite coccidien intracellulaire obligatoire, appartenant à l'embranchement des Apicomplexa. Il est émis dans les selles sous forme d'oocyste immature, contenant habituellement un unique sporoblaste [74]. Du fait de cette immaturité, une transmission directe anthroponotique est improbable. La transmission est indirecte par l'intermédiaire d'eau [26] ou d'aliments contaminés [75]. Durant la maturation de l'oocyste, le sporoblaste se divise en deux par scissiparité. Il est alors infectieux. Les sporoblastes se transforment ensuite en sporocystes. Ces derniers se divisent deux fois pour produire quatre sporozoïtes chacun. Après ingestion d'oocystes infectieux, les sporocystes sont libérés dans l'intestin grêle et envahissent les cellules épithéliales. Dans ces cellules, les parasites subissent une multiplication asexuée (schizogonie) puis sexuée (gamétogonie) produisant des gamétocytes. La fécondation des gamétocytes entraîne le développement d'oocystes immatures excrétés dans les selles [74].

*Cystoisospora belli* est responsable de la cystoisosporose. La symptomatologie varie en fonction du statut immunitaire du patient. Chez le sujet immunocompétent, la maladie est

généralement bénigne et se caractérise par de la fièvre, associée à des symptômes gastro-intestinaux à type de nausées, vomissements et diarrhée aqueuse [76,77]. Ce parasite a récemment été décrit comme un commensal de la vésicule biliaire chez l'immunocompétent [78] cependant on retrouve dans la littérature un cas rapporté de cholécystite chronique [79]. L'éosinophilie périphérique est une caractéristique distincte de ce pathogène [76]. Chez le sujet immunodéprimé, les diarrhées sont plus graves et prolongées [80,81], et l'on retrouve également des manifestations extra-intestinales telles que l'atteinte des voies biliaires [82,83]. Plus récemment, un nouveau facteur de risque de développer des infections sévères à *Cystoisospora* a été mis en évidence : la co-infection par le virus HTLV-1 (Human T-Cell-Leukemia-Virus-1) [84,85].

### ***Dientamoeba fragilis***

*Dientamoeba fragilis* est un protozoaire intestinal cosmopolite appartenant à l'ordre des Trichomonadida. Décrit pour la première fois il y a 100 ans [86], *Dientamoeba fragilis* était initialement considéré comme une amibe entérique. Il s'est plus tard avéré que ce parasite était en fait un protozoaire flagellé [87]. Son cycle n'est que partiellement élucidé et des hypothèses ont été établies sur la base de données cliniques [88]. Historiquement, cette espèce n'était connue que depuis le stade trophozoïte à un ou deux noyaux dans les selles des individus infectés [89]. En 2014, les stades kyste et pré-kyste ont été décrits pour la première fois dans des échantillons cliniques humains [90,91]. Ces données sont toujours considérées comme préliminaires et des études supplémentaires doivent être effectués pour valider l'existence de ces étapes chez l'hôte humain. Une transmission par voie fécale-orale anthroponotique ou zoonotique est probable [90]. Récemment, un mode de transmission par l'intermédiaire d'un vecteur, *Enterobius vermicularis*, ou d'œufs d'autres helminthes a été proposée [87] mais ne semble représenter qu'une voie mineure de transmission de ce parasite. A part l'Homme, peu

d'hôtes ont été documentés [92] parmi lesquels on retrouve des porcs d'élevage [93], des chats et chiens domestiques [94] et des gorilles [95].

Tout comme sa taxonomie, les données concernant la potentielle pathogénicité de ce parasite ont évoluées au cours du temps, et elle reste aujourd'hui très controversée [92]. Ainsi, le pouvoir pathogène de *D. fragilis* a été démontré au travers de nombreuses études associant une infection par ce parasite à l'apparition de symptômes gastro intestinaux telles que des douleurs abdominales, des diarrhées ou des flatulences [96–98]. Ces études ont été corroborées par l'observation de Stark et al. [99]: le traitement et l'éradication du parasite sont suivis par résolution des symptômes. D'autres études ont à l'inverse démontré qu'il n'existerait pas de relation entre ce parasite et une symptomatologie gastro-intestinale [100]. *D. fragilis* serait un commensal chez les enfants [101,102]. Enfin, Röser et al. [103] a remis en question l'utilité de traiter ces infections.

### ***Entamoeba histolytica***

*Entamoeba histolytica* appartient au sous-embranchement des Sarcodina ou Rhizopodes. Cette amibe hématophage pathogène existe sous deux formes : le trophozoïte (forme végétative) mobile grâce à ses pseudopodes, ingérant des globules rouges, et le kyste, forme de résistance et de dissémination dans l'environnement. Les kystes et les trophozoïtes d'*E. histolytica* sont rejetés dans les matières fécales [104]. La transmission féco-orale est liée au péril fécal et se fait par l'ingestion d'aliments et d'eaux contaminés par des kystes amibiens matures éliminés par les matières fécales [105]. Une contamination interhumaine manuportée existe [106] ainsi qu'une transmission liée à des pratiques sexuelles par contact oro-anal principalement chez les homosexuels [107]. Les trophozoïtes sont libérés et migrent vers le gros intestin. Ils se multiplient par scissiparité et produisent des kystes qui seront évacués dans les fèces. Cette amibe, doté d'un arsenal chimique et enzymatique, peut également envahir la muqueuse intestinale, et progresser dans les matrices extracellulaires profondes [108]. En raison de la

protection conférée par leurs parois, les kystes peuvent survivre plusieurs jours à plusieurs semaines dans l'environnement extérieur et sont responsables de la transmission et la dissémination [109]. Les trophozoïtes éliminés dans les selles sont rapidement détruits une fois dans l'environnement. S'ils étaient ingérés, ils ne survivraient pas à l'exposition acide de l'environnement gastrique.

L'amoebose, maladie résultant de l'infection à *Entamoeba histolytica*, est un problème majeur de santé publique. On estime à 500 millions le nombre de personnes infectées dans le monde par ce parasite [110]. Dans 90% des cas, les patients sont asymptomatiques [105]. Pour les 10% restant, la maladie se présente sous deux formes : intestinale et extra-intestinale (tissulaire). L'amibiase intestinale se caractérise par une symptomatologie digestive bruyante : douleurs abdominales, colites, syndrome dysentérique sans fièvre [111]. En cas d'amibiase tissulaire, le principal point d'appel clinique est la présence d'une fièvre associée ou non à des douleurs abdominales et une perte de poids [112]. La maladie se présente le plus souvent sous la forme d'un abcès hépatique mais, on peut retrouver également des atteintes pulmonaires telles que des pneumonies, des péricardites et plus rarement des atteintes cérébrales [113,114].

### **Microsporidies : *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi***

Les microsporidies sont des eucaryotes appartenant au règne des champignons. Ubiquitaires dans l'environnement [115], ils sont capables d'infecter presque tous les vertébrés et les invertébrés [116]. La spore est la forme infectieuse et de résistance des microsporidies. Ces spores sont souvent décrites comme omniprésentes et ont été détectées dans divers réservoirs environnementaux allant des bouches d'évacuation en haute mer [117] à la poussière [118]. La spore infecte la cellule hôte par l'intermédiaire de son filament ou tube polaire [119] puis injecte son contenu cellulaire, le sporoplasme, dans la cellule hôte eucaryote. Le sporoplasme subit alors une multiplication extensive se produisant directement en contact avec le cytoplasme de la cellule hôte pour *E. bieneusi* ou à l'intérieur d'une vacuole appelée vacuole parasitophore

pour *E. intestinalis*. Libre dans le cytoplasme ou à l'intérieur d'une vacuole parasitophore, les microsporidies évoluent alors en spores matures. Lorsque les spores augmentent en nombre et remplissent complètement le cytoplasme de la cellule hôte, la membrane cellulaire hôte est alors fragilisée entraînant la libération des spores matures qui peuvent infecter de nouvelles cellules et poursuivre ainsi le cycle. Le mode de transmission n'est cependant pas complètement élucidé.

Les microsporidies sont responsables de la microsporidiose. Il existe plus de 1300 espèces de microsporidies connues, 15 sont capables d'infecter l'Homme [120]. *Enterocytozoon bienewisi* et *Encephalitozoon intestinalis* sont les plus fréquemment identifiés lors d'infections à microsporidies chez l'Homme. Elles sont reconnues comme des agents pathogènes opportunistes chez les patients immunodéprimés, mais la microsporidiose est de plus en plus courante chez les personnes immunocompétentes [121]. *Enterocytozoon bienewisi* se trouve principalement dans le tractus gastro-intestinal supérieur et est associé à une diarrhée chronique, à une malabsorption et à une perte de poids. Des cas d'infection à *E. bienewisi* dans des échantillons respiratoires ont été rapportés [115]. L'infection à *Encephalitozoon intestinalis* ne se limite pas toujours aux entérocytes de l'intestin grêle; il peut également infecter les macrophages et provoquer une microsporidiose disséminée [115]. Les microsporidies ont été détectées dans pratiquement tous les organes et peuvent provoquer des symptômes liés à leur localisation extra-intestinales chez les sujets immunodéprimés [122]. Des cas d'entéropathie, de kératoconjonctivite, de sinusite, de trachéobronchite, d'encéphalite, de néphrite interstitielle, d'hépatite, de cholécystite, d'ostéomyélite et de myosite ont été décrits [115].

### ***Giardia intestinalis***

*Giardia intestinalis* est un entéroparasite extracellulaire appartenant au sous-embranchement des Mastigophora qui prolifère dans l'intestin grêle des hôtes vertébrés [123]. Ce protozoaire existe sous deux formes : le trophozoïte (forme végétative) mobile, et le kyste, forme de

résistance et de dissémination dans l'environnement. Pratiquement tous les mammifères peuvent être infectés par ce protozoaire [124]. Les kystes représentent le stade de *G. intestinalis*, au métabolisme ralenti, capable de survivre à l'extérieur de l'hôte. Ils sont émis dans les déjections et donc responsables de la transmission. La transmission peut être directe anthroponotique (homme-homme), féco-orale ou manuportée. Mais dans la majorité des cas, la transmission est indirecte, liée au péril fécal, par ingestion accidentelle de kystes lors de consommation de nourriture ou d'eau contaminée (notamment l'eau des piscines), ou suite au contact avec des surfaces contaminées (main-bouche) [125]. Après ingestion de kystes, les formes végétatives flagellées (contenus dans le kyste quadri-nucléé) sont libérées dans l'intestin grêle proximal de l'hôte sous l'action des sucs digestifs et du pH. Les trophozoïtes se multiplient par scissiparité dans le jéjunum médian [126]. Un enkystement se produit lorsque les parasites transitent vers le côlon : il y a alors excrétion dans les selles d'une centaine de kystes par jour, et ce durant une période prolongée [127]. L'ingestion d'une dizaine de kystes suffit pour entraîner des symptômes digestifs [127,128]. Enfin, les animaux peuvent être également infectés par *Giardia intestinalis*, mais leur importance en tant que réservoir n'est pas claire.

*Giardia intestinalis* est responsable de la giardiose. La symptomatologie se manifeste après 7 à 12 jours d'incubation et se caractérise par la présence de diarrhées, pouvant s'accompagner d'un syndrome de malabsorption, de nausées, vomissements et de perte de poids [129]. Chez certains patients, la maladie peut être bénigne et spontanément résolutive [130]. D'autres vont développer une symptomatologie chronique ne répondant pas à un traitement normal [130]. Ces infections chroniques peuvent entraîner des complications telles que le syndrome du côlon irritable, des allergies alimentaires, des arthrites ou des syndromes de fatigue chronique, et une cassure de la courbe de poids chez l'enfant [130].

Tableau 1. Résumé de la transmission et de la pathogénicité des protozoaires et microsporidies pathogènes d'intérêt médical (réalisé à partir de l'étude de Fletcher et al. [5]).

Parasites	Hôtes	Mode de transmission	Symptômes	Individus à risque
<i>Balantidium coli</i>	Humains, cochons, primates, chats, rongeurs	Kystes dans l'eau non traitée ou peu traitée et sur les aliments non cuits ou insuffisamment cuits ; personne à personne ; zoonotique	Diarrhée, dysenterie	Personnes vivant à proximité de porcs, voyageurs se rendant dans des pays non industrialisés (Asie du Sud-Est, Iles du Pacifique occidental, Amérique du Sud rurale)
<i>Blastocystis</i> spp.	Humains et autres mammifères	Kystes dans l'eau non traitée ou peu traitée et sur les aliments non cuits ou insuffisamment cuits ; personne à personne ; zoonotique	Douleurs abdominales et diarrhées	N'importe qui, surtout dans les garderies ou autres établissements
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Humains, autres mammifères, et oiseaux	Oocystes dans l'eau et sur des aliments non cuits ou insuffisamment cuits ; personne à personne ; zoonotique	Diarrhées	Manutentionnaires d'animaux, voyageurs, HSH, traiteurs, personnel de garderie
<i>Cyclospora cayentanensis</i>	Humains et autres mammifères	Oocystes dans l'eau et sur des aliments non cuits ou insuffisamment cuits ; personne à personne	Diarrhées	Voyageurs dans des pays non industrialisés (Amérique du Sud) ; risque majeur d'épidémie de nourriture et d'eau
<i>Cystoisospora belli</i>	Humains	Oocystes dans l'eau et sur des aliments non cuits ou insuffisamment cuits ; personne à personne	Diarrhées	Voyageurs dans des pays non industrialisés, patients atteints du VIH et populations autochtones (États-Unis)
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Humains	Feco-orale ; incertain	Diarrhées	Enfants et adultes, populations immunocompétentes et immunodéprimées

<i>Entamoeba histolytica</i>	Humains et autres mammifères	Kystes dans l'eau non traitée ou peu traitée et sur les aliments non cuits ou insuffisamment cuits ; personne à personne ; zoonotique	Dysenterie, abcès du foie	Immigrants / voyageurs se rendant dans des zones d'endémicité, HSH, patients atteints du VIH et personnes en institution
<i>Giardia intestinalis</i>	Humains, autres mammifères, et oiseaux	Kystes dans l'eau non traitée ou peu traitée et sur les aliments non cuits ou insuffisamment cuits ; personne à personne ; zoonotique	Diarrhée, malabsorption	Jeunes adultes, HSH, personnel de garderie
Microsporidies	Humains et autres mammifères	Ingestion de spores ; personne à personne ; zoonotique	Diarrhée persistante	Patients immunodéprimés et VIH / SIDA, patients immunocompétents, voyageurs

---

**HSH : hommes ayant des rapports avec des hommes**

## 1.4 Traitement

Les traitements des différents parasites gastro-intestinaux d'intérêt sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Traitement des infections à protozoaires et microsporidies.

<i>Parasites</i>	<i>Traitement (posologie)</i>
<b>Protozoaires</b>	
<i>Blastocystis</i> spp.	Métronidazole (250 mg à 750 mg 3 fois par jour pendant 10 jours) Ou Cotrimoxazole (6 mg/kg Triméthoprime (TMP), 30 mg/kg Sulfaméthoxazole (SMX) par jour pendant 7 jours) Ou Nitazoxanide (500 mg deux fois par jour pendant 3 jours)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Nitazoxanide (500 mg deux fois par jour pendant 3–14 jours)
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Cotrimoxazole (160 mg TMP et 800 mg SMX, deux fois par jour pendant 7 jours) Ou Ciprofloxacine (500 mg deux fois par jour)
<i>Cystoisospora belli</i>	Cotrimoxazole (160 mg TMP plus 800 mg SMX, quatre fois par jour pendant 10 jours) Ou Ciprofloxacine (500 mg deux fois par jour pendant 7 jours)
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Iodoquinol (650 mg trois fois par jour pendant 20 jours) Ou Métronidazole (500–750 mg trois fois par jour pendant 10 jours) Ou Paromomycine (25–35 mg/kg/J pendant 7 jours)
<i>Entamoeba histolytica</i> forme invasive	Luminal agent, i.e. Paromomycine (8–12 mg/kg ou 500 mg VO trois fois par jour pendant 7 jours) Ou Iodoquinol (650 mg VO trois fois par jour pendant 20 jours)
<i>Entamoeba histolytica</i> forme digestive	Paromomycine (8–12 mg/kg ou 500 mg trois fois par jour pendant 7 jours) Ou Iodoquinol (650 mg VO trois fois par jour pendant 20 jours)
<i>Giardia intestinalis</i>	Métronidazole (250 mg par jour pendant 3 jours), Tinidazole (2 g dose unique) ou Albendazole (200–400 mg deux fois par jour pendant 5 jours)
<b>Microsporidies</b>	
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Albendazole (400 mg deux fois par jour pendant 28 jours)
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	Fumagilline (20 mg trois fois par jour pendant 14 jours)

## 2. Les Méthodes diagnostiques au laboratoire

Cette seconde partie a pour objectif de faire la synthèse des méthodes diagnostiques des parasites gastro-intestinaux d'intérêt médical, allant de la microscopie qui reste le gold standard, aux méthodes moléculaires les plus actuelles.

## 2.1 Le diagnostic microscopique

### 2.1.1 Pré-analytique

L'examen microscopique des selles, à la recherche de formes végétatives et kystiques est la méthode de dépistage de référence des protozoaires dans les selles [131]. Ce diagnostic n'est pas invasif, et nécessite une préparation adaptée du patient afin que sa sensibilité soit optimale. Un régime sans résidu doit être observé 48 heures précédant le recueil des selles afin d'éviter la présence de substances pouvant gêner la lecture au microscope. De même certaines substances médicamenteuses sont à éviter trois à quatre jours avant l'examen telles que la consommation de laxatifs dont l'huile de paraffine, de charbon, de pansements intestinaux ou de baryte.

L'examen parasitologique des selles doit être répété à trois reprises en respectant un intervalle d'un à deux jours entre chaque prélèvement, dû à l'émission intermittente de certains parasites [132]. En effet, la multiplicité des prélèvements augmente la sensibilité de l'examen.

Cet examen doit être réalisé à partir de selles fraîchement émises, ce qui permet d'observer les formes végétatives lorsqu'elles sont présentes. Le délai d'acheminement des selles est donc un point essentiel de ce diagnostic. Les échantillons une fois prélevés, ne peuvent être congelés ou conservés au réfrigérateur. Ils doivent être acheminés le plus rapidement possible au laboratoire et conservés à une température entre 15-25°C si possible. La conservation au réfrigérateur (+4°C) de la selle est déconseillée car elle entraîne une lyse des trophozoïtes et donc une diminution de la sensibilité de l'examen. Un délai inférieur à 2 heures est optimal, mais un délai allant jusqu'à 24 heures à température ambiante reste acceptable. En cas de selles molles et diarrhéiques, un délai maximum de 1 heure est à respecter entre la défécation et l'analyse des selles afin d'observer les formes végétatives de protozoaires, si elles sont présentes, qui se lysent rapidement et d'apprécier leur mobilité. En cas de selles moulées et pâteuses, un délai maximum de 24 heures est à respecter entre la défécation et l'analyse des selles afin d'observer les éventuelles larves ou les œufs présents pouvant continuer leur évolution.

Si l'examen parasitologique des selles ne peut être réalisé dans un délai optimal, on peut avoir recours à l'ajout de fixateurs afin de préserver les éléments parasitaires. Les conservateurs les plus souvent utilisés sont les solutions aqueuses de formol à 8% ou à 10%, le fixateur M.I.F. (Merthiolate - Iodine - Formaldéhyde) de Sapero, Lawless et Strome et la solution Acéto-Acétique Formolée (AAF) de Junod. Simples, et peu coûteux, ces fixateurs permettent une conservation prolongée des œufs d'helminthes et des kystes de protozoaires. Cependant ils peuvent entraîner une modification de la morphologie des formes végétatives, et la fixation empêche une analyse moléculaire.

Enfin, l'examen parasitologique des selles doit être réalisé par un opérateur expérimenté. En effet, l'étude de Bogoch et al. [133] qui porte sur la comparaison inter-laboratoire de la détection des protozoaires intestinaux par microscopie dans un même prélèvement a montré une différence significative entre trois centres spécialisés dans le diagnostic des maladies tropicales : deux centres Européens, et un centre de l'Ouest Africain.

### 2.1.2 L'examen direct

L'examen direct est la première étape de l'examen parasitologique des selles, il ne faut pas la négliger. Elle consiste en un examen macroscopique suivi par un examen microscopique des selles, dans une goutte de solution saline.

L'examen macroscopique des selles permet d'apprécier l'aspect de la selle, ce qui peut orienter l'opérateur vers la recherche des formes végétatives de protozoaires en cas de selles molles ou diarrhéiques ou plutôt de kystes si les selles sont dures ou moulées. Les selles peuvent être classées selon une échelle visuelle : l'échelle de Bristol [134]. Développée à l'Université de Bristol, cette échelle permet de répartir les selles humaines en sept types, corrélés avec la mesure du temps de transit colique. Cet examen comporte également la recherche d'éléments ajoutés (sang ou mucus) qui peuvent contenir des formes parasitaires, ou des parasites macroscopiques dans le cas des helminthes (anneaux de cestodes, adultes d'oxyures ou

d'ascaris). Ainsi, des selles grasses, témoins d'une stéatorrhée, feront plutôt soupçonner *G. intestinalis*. Ainsi alors qu'une selle glairo-sanglante conduira à la recherche en urgence d'*E. histolytica*.

L'examen direct microscopique des selles consiste ensuite en l'observation de la selle dans une goutte de solution saline, comme du sérum physiologique. L'examen se fait par observation au grossissement (de x100 au x500 par microscopie optique sous lumière blanche). Au vu de l'hétérogénéité des formes recherchées (trophozoïtes et kystes de protozoaires, larves, œufs d'helminthes), des tailles, et de la quantité de parasites parfois faible, l'analyse est réalisée sur l'intégralité de la lamelle [135]. Une attention doit également être portée sur les éléments non parasitaires tels que des globules rouges, globules blancs ou encore des cristaux de Charcot-Leyden pouvant orienter le diagnostic.

### 2.1.3 L'examen des selles après méthode de concentration

Si le microorganisme présent dans la selle se trouve en faible quantité, l'examen direct peut être faussement négatif. De plus, les nombreux débris alimentaires et les bactéries peuvent gêner l'observation microscopique. C'est pourquoi, afin d'augmenter la sensibilité de l'examen, des méthodes de concentration sont utilisées. Elles consistent en l'élimination des débris et l'éclaircissement des préparations permettant alors de concentrer les œufs et larves d'helminthes, et kystes de protozoaires, mais ont l'inconvénient de détruire les formes végétatives, trop fragiles. On distingue trois principales méthodes de concentration : les techniques de flottation, les techniques diphasiques et les techniques de concentration par éclaircissement résumées dans le Tableau 3. Des kits prêts à l'emploi existent, tels que les kits EasyPara® (Servibio, Meudon, France), la gamme Parasep® SF (Eurobio, Les Ulis, France) ou Para-Selles® (Fumouze, Levallois, France).

La technique de Baerman ou la culture sur gélose sont également utilisées pour concentrer les larves d'anguillule dans les selles.

Tableau 3. Les principales méthodes de concentration de parasites dans les selles (hors kits prêt à l'emploi)

<i>Techniques</i>	<i>Principe</i>	<i>Solution</i>	<i>Dénomination</i>	<i>Identification</i>
Techniques de flottation	Dilution de la selle dans une solution de densité supérieure	Solution saturée de chlorure de sodium	Méthode de Willis	Œufs d'ankylostomes et d'ascaris fertiles
		Sulfate de Zinc	Technique de Faust	Œufs d'helminthes
		Solution iodo-mercurique	Méthode de Janeckso Urbanyi	Œufs d'helminthes
Techniques diphasiques	Mélange d'une phase aqueuse avec une phase organique généralement à base d'éther.	Tampon acétate/acide acétique à pH 5	Méthode de Bailenger	Kystes, Œufs d'helminthes (trichocéphales et ankylostomes) Oocystes de cryptosporidies
		Solution de M.I.F	M.I.F concentration	Kystes de protozoaires Œufs de grande douve, d'ascaris et de schistosomes
		Eau formolée à 10%	Méthode de Ritchie modifiée	Kystes de protozoaires, Œufs d'ascaris et de schistosomes
Techniques de concentration par éclaircissement	Préparation épaisse de selles rendue translucide par la solution de glycérine-vert malachite.	Glycérine-vert malachite.	Technique de Kato Katz	Œufs d'helminthes et coccidies (oocystes, sporocystes)

#### 2.1.4 L'examen des selles après coloration

Bien que facultative dans le diagnostic des amibes et flagellés intestinaux, les colorations peuvent toutefois faciliter le diagnostic d'espèces. On distingue deux types de colorations : les colorations extemporanées pour montage entre lame et lamelle et les colorations permanentes pour les frottis de selles fixés.

Parmi les colorations dites « extemporanées », le gold standard est la coloration merthiolate-iodine-formaldehyde (MIF) pour la détection des kystes et des formes végétatives de *G.*

*intestinalis* qui permet à la fois de concentrer et de colorer ces formes parasitaires. Cependant, l'une des plus courantes est la coloration à l'aide d'une solution iodo-iodurée à 1%, type Lugol, qui colore le glycogène et les noyaux de kystes quand ils sont présents. Les protozoaires sont alors colorés en jaune et des noyaux et vacuoles prennent une teinte brune.

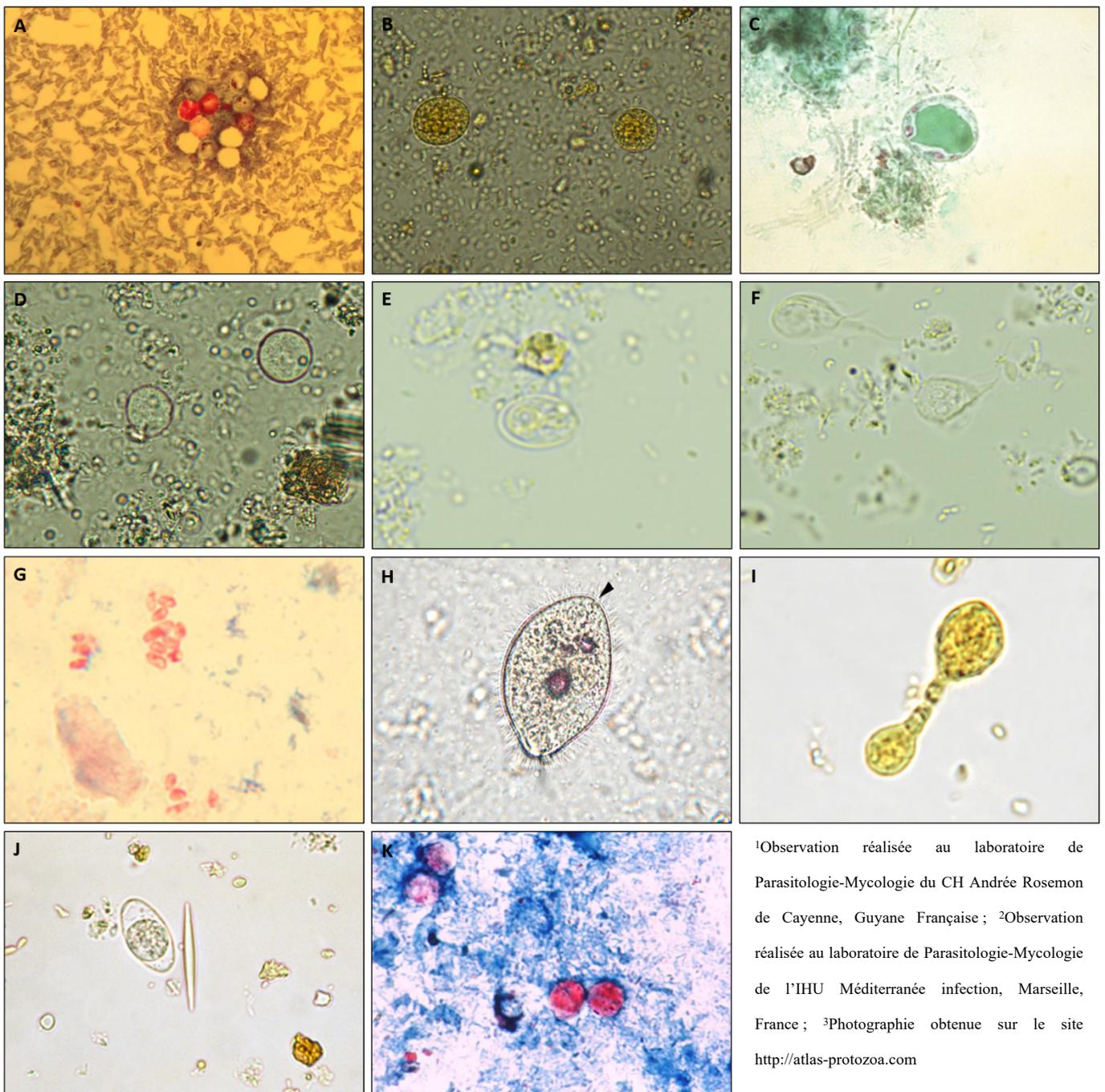
Parmi les colorations dites « permanentes », plus longues et complexes, on retrouve la coloration à l'hématoxyline ferrique et le trichrome de Gomori-Wheatley. La coloration Trichrome permet de colorer les protozoaires. Les solutions de carbol-xylène et le xylène utilisé dans cette technique, permettent de déshydrater et d'éclaircir la solution. Cette méthode n'est plus utilisée aujourd'hui en raison de la toxicité du xylène et de sa complexité de réalisation.

Il existe des colorations spécifiques des cryptosporidies parmi lesquelles, la plus populaire est la coloration Ziehl-Neelsen (ZN) modifiée [103] après concentration par la méthode de Bailenger. On observe alors des oocystes (Figure 3A), sphériques mesurant 4 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre. La technique de coloration au bleu de safranine-méthylène [136] fût une alternative, mais n'est plus utilisée aujourd'hui. L'auramine-phénol a également été utilisée pour la détection des cryptosporidies. Elle nécessite le recours à l'utilisation de la microscopie à épifluorescence, les oocystes apparaissent alors fluorescents en jaune-vert (excitation à 490 nm).

De même, des colorations spécifiques des microsporidies existent, telles que la coloration de Weber et l'Uvitex 2B [137]. D'autres colorations sont disponibles pour les amibes et flagellés intestinaux : le Giemsa ou des colorations commerciales comme le Kop-Color® (Fumouze Diagnostics).

Au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de La Timone, Marseille, France, l'examen microscopique des selles associe un examen direct dans une goutte de solution saline avec deux méthodes de concentrations : la technique de Bailenger, et la technique de Kato Katz. Une culture sur gélose pour la recherche d'anguillules est ajoutée à la demande.

Figure 3. Formes parasitaires observées après différentes colorations et/ou examen direct (liste non exhaustive) **A.** Oocystes de *Cryptosporidium* spp. après coloration Ziehl Neelsen modifiée (grossissement x500)<sup>1</sup>; **B.** Kystes d'*Entamoeba histolytica* après coloration au Lugol (grossissement x400)<sup>2</sup>; **C.** *Blastocystis* spp. après coloration Trichrome<sup>3</sup>; **D.** Kystes d'*Entamoeba histolytica* après examen direct (grossissement x400)<sup>2</sup>; **E.** Kyste de *Giardia intestinalis* après concentration par la méthode de Baileger (grossissement x400)<sup>2</sup>; **F.** Formes végétatives de *Giardia intestinalis* après examen direct (grossissement x400)<sup>2</sup>; **G.** Grappe de spores d'*Encephalitozoon intestinalis* après coloration Trichrome<sup>3</sup>; **H.** Formes végétatives de *Balantidium coli* après examen direct (grossissement x400)<sup>3</sup>; **I.** Forme végétative de *Dientamoeba fragilis* après coloration au Lugol (grossissement x400)<sup>3</sup>; **J.** Oocyste de *Cystoisospora belli* après examen direct (grossissement x400)<sup>3</sup>; **K.** Oocystes de *Cyclospora cayetanensis* après coloration Ziehl Neelsen modifiée (grossissement x500)<sup>3</sup>



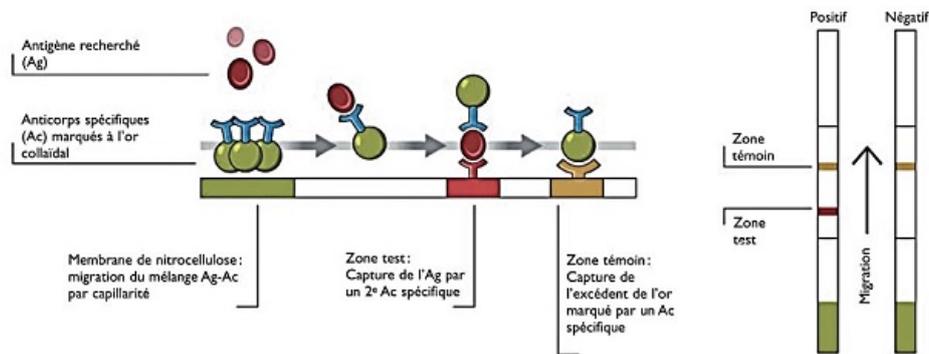
<sup>1</sup>Observation réalisée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CH Andrée Rosemon de Cayenne, Guyane Française; <sup>2</sup>Observation réalisée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IHU Méditerranée infection, Marseille, France; <sup>3</sup>Photographie obtenue sur le site <http://atlas-protozoa.com>

## 2.2 Détection d'antigènes dans les selles

Avec l'avènement, ces dernières années, des laboratoires de diagnostic rapide dit « Point-Of-Care », il semble crucial de faire un point sur les tests de détection antigénique de protozoaires d'intérêt médical. L'avantage de ces techniques réside dans leur rapidité et leur facilité de réalisation, contrairement à l'examen microscopique. Ainsi les tests disponibles sur le marché ciblent *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* et *Cryptosporidium* spp., mais ne sont actuellement pas disponibles pour les autres protozoaires gastro-intestinaux ni pour les microsporidies. On retrouve également des tests de diagnostics combinés [138]. Sur le marché, deux grandes catégories de tests sont disponibles (Tableau 4) : les tests de diagnostic rapide (TDR) fondés sur un procédé immuno-chromatographique, et les tests ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Essay*).

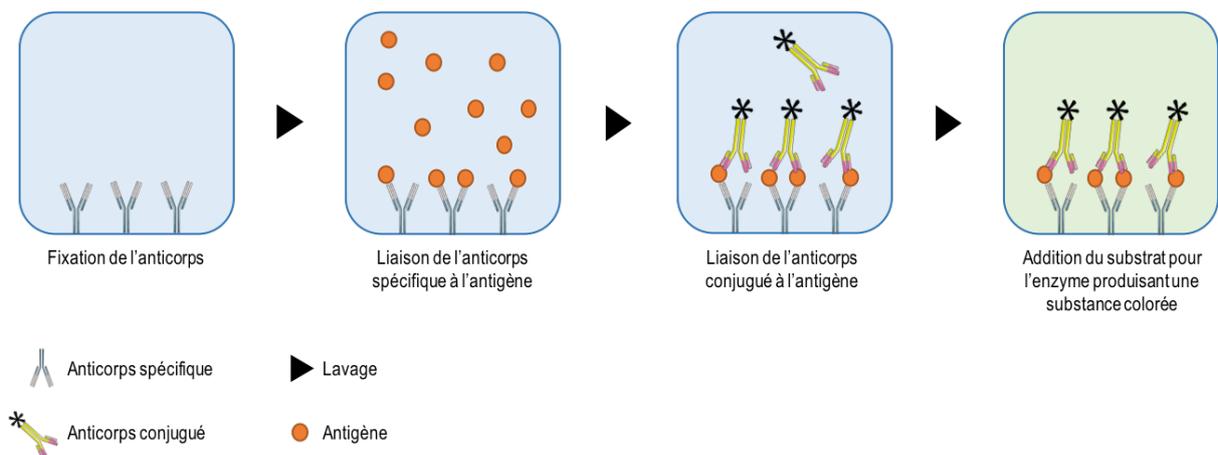
Les tests de diagnostic rapide, basés sur le principe de l'immuno-chromatographie (Figure 4), reposent sur la combinaison d'une réaction antigène-anticorps et d'une migration sur bandelette. Ils sont très populaires car allient une simplicité d'exécution à la présence de contrôles de réaction intégrés dans le test. Les antigènes parasitaires apportés par l'échantillon à tester vont se lier à des anticorps couplés le plus souvent à des microbilles de latex, particule de silice ou marqués à l'or colloïdal. Les complexes antigène-anticorps formés vont migrer par capillarité, sous l'effet d'un tampon de lyse-migration, sur la bandelette de nitrocellulose. Ils seront arrêtés par des anticorps de capture, dirigé contre l'antigène parasitaire recherché, fixés sur la membrane. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée permettant une simplicité de lecture. L'excès d'anticorps conjugué continue à migrer et est immobilisé par un anticorps (anti-lapin ou anti-souris) qui entraîne l'apparition d'une ligne colorée par accumulation : c'est le contrôle validant le bon fonctionnement de la réaction.

Figure 4. Principe d'un test immuno-chromatographique.



Le test ELISA est basé sur la formation d'un complexe antigène-anticorps en milieu liquide et sa détection (Figure 5). Les antigènes parasites apportés par l'échantillon à tester vont se lier à des anticorps fixés au préalable de façon covalente dans des puits. L'antigène d'intérêt se trouve donc lié à un support solide et est ensuite lavé. Une solution contenant un anticorps marqué par une enzyme et dirigé contre cet antigène est ajoutée : c'est la solution de révélation. Celle-ci contient un substrat qui est transformé en produit coloré par l'enzyme couplé à l'anticorps de révélation. La positivité du test sera déterminée grâce à la mesure de la densité optique du milieu, à une longueur d'onde donnée, à l'aide d'un spectrophotomètre. L'intensité de la coloration dépend de la quantité d'antigène présent. Ces tests sont réalisés sur plaques de 96 puits, parfois conditionnés en barrettes.

Figure 5. Principe d'un test ELISA direct.



Au vu de la quantité importante de tests disponibles sur le marché, de nombreuses études s'intéressant à la sensibilité et la spécificité de ces tests TDRs ou ELISA ainsi qu'à leur comparaison ont été réalisés. Elles ont montré une grande variabilité au niveau de leur sensibilité et de leur spécificité avec l'existence de faux positifs et de faux négatifs pour chacune d'entre elles [139].

A titre d'exemple dans le cas de la détection de *Cryptosporidium* spp., le test de diagnostic rapide a montré sa supériorité par rapport à la détection microscopique après coloration Ziehl-Neelsen modifiée [140]. Enfin, l'intérêt de ces tests semble résider dans leur facilité d'utilisation, et la rapidité d'obtention du résultat (moins d'une heure) comparé à l'examen microscopique. Le TDR a l'avantage d'être réalisable en l'absence d'électricité et sans nécessité d'un opérateur expérimenté. Quant à la technique ELISA, la lecture de la densité optique requière de l'électricité.

Tableau 4. Antigènes détectés dans les kits disponibles sur le marché.

Technique	Fabriquant	Références	Nom commercial	Antigènes recherchés		
				<i>Cryptosporidium</i> <i>sp.</i>	<i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i>	<i>Giardia</i> <i>intestinalis</i>
Immunochromatographie	Coris® BioConcept	[141], [142]	<i>Crypto</i> -Strip	•		
		[143], [138]	<i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> Duo-Strip	•		•
		[144], [141]	<i>Giardia</i> -Strip			•
	Meridian Bioscience®	[145], [146], [147], [148]	ImmunoCard STAT ! C/G	•		•
		[138]	ImmunoCard STAT ! CGE	•	•	•
	R-Biopharm Diagnostics®	[141], [138]	RIDA® QUICK Combi	•		•
		[141], [142]	RIDA® QUICK <i>Cryptosporidium</i>	•		
		[141]	RIDA® QUICK <i>Giardia</i>			•
	Remel®	[142]	Xpect® <i>Cryptosporidium</i>	•		
		[145]	Xpect® <i>Giardia/Cryptosporidium</i>	•		•
Savyon Diagnostics®	[149]	Coprostrip <i>Crypto</i>	•			
Techlab Inc.	[150], [151], [152]	<i>E.histolytica</i> Quick Check		•		
	[138], [145], [153]	<i>Giardia/Cryptosporidium</i> Quick Check	•		•	
ELISA	apDia®	[147]	<i>Giardia lamblia</i> ELISA			•
	Biomerica®	[154]	<i>Giardia</i> ELISA			•
	Cellabs®	[155]	<i>Entamoeba</i> CELISA PATH kit		•	
	Diagnostic Automation®	[147]	<i>Cryptosporidium</i> Antigen Detection ELISA	•		
	R-Biopharm Diagnostics®	[141]	RIDA® SCREEN <i>Cryptosporidium</i>	•		
		[141]	RIDA® SCREEN <i>Giardia</i>			•
	Remel®	[156]	ProspecT ELISA <i>Cryptosporidium</i>	•		
		[138]	ProspecT ELISA <i>E.histolytica</i>		•	
		[145], [157]	ProspecT ELISA <i>Giardia</i>			•
		[138], [158]	ProspecT ELISA <i>Giardia/Cryptosporidium</i>			•
Techlab Inc.	[155]	<i>E.histolytica</i> II ELISA		•		

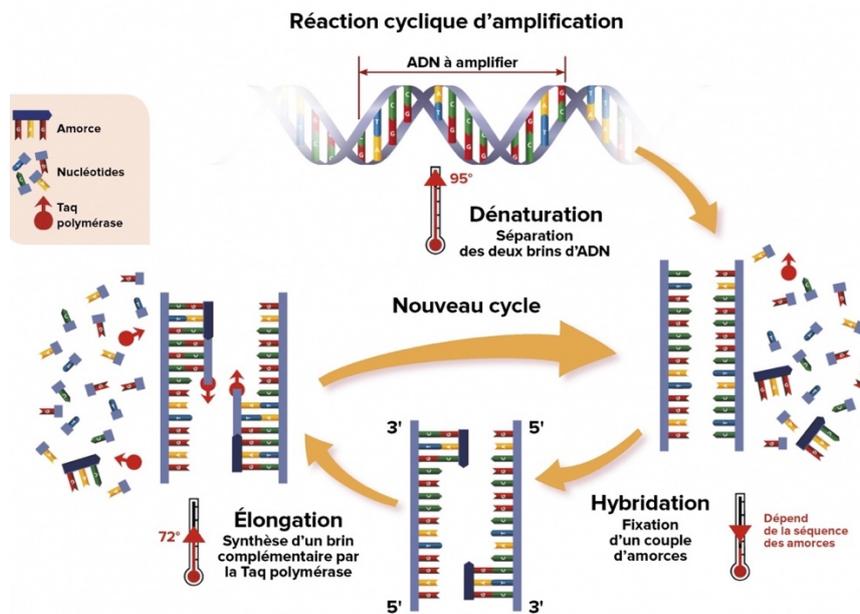
### 3. Le diagnostic moléculaire au laboratoire

#### 3.1 Principe et intérêt

La biologie moléculaire est "l'ensemble des techniques et découvertes qui ont permis l'analyse moléculaire des processus les plus intimes du vivant, de ceux qui en assurent la pérennité et la reproduction" M. Morange (Histoire de la Biologie Moléculaire, Paris, 1994). Dans le domaine de la microbiologie médicale, on utilise la biologie moléculaire afin de détecter, dans différents types de prélèvements, des séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques d'un pathogène.

Découverte dans les années 1980 par Kary Mullis, la réaction en chaîne par polymérase ou *Polymerase Chain reaction* (PCR) permet d'amplifier *in vitro* plusieurs millions de fois tout fragment d'ADN, à condition qu'on connaisse la séquence nucléotidique de ses extrémités [159]. Cet outil révolutionnaire a fait l'objet d'un prix Nobel de chimie en 1993. Cette technique d'amplification génétique *in vitro* est basée sur le mécanisme de répllication de l'ADN. Elle nécessite l'utilisation d'une enzyme, l'ADN polymérase thermostable qui assure la copie du brin complémentaire d'une molécule d'ADN simple brin lors de la répllication (tel que la Taq extraite à partir d'une bactérie *Thermus aquaticus*) et d'un couple d'oligonucléotides se fixant sur deux monocaténares. Les étapes de la PCR sont les suivantes : (i) La dénaturation de l'ADN par fusion à haute température pour convertir l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire. (ii) L'hybridation à l'ADN cible des deux oligonucléotides utilisés comme amorces (ou primers). (iii) L'extension de la chaîne d'ADN par addition de nucléotides à partir des amorces en utilisant l'ADN polymérase comme catalyseur en présence d'ions  $Mg^{2+}$ . Les cycles de PCR sont répétés en moyenne 40 fois et l'amplification se fait de manière exponentielle au cours de ces cycles. Ainsi, à l'issue de 40 cycles de PCR on produit en théorie  $2^{40}$  copies de la séquence ciblée.

Figure 6. Principe de la Polymerase Chain reaction (PCR).



La première technique de PCR inventée est la PCR dite en pont final, où la quantité d'ADN n'est mesurée qu'à la fin de la réaction. La mise en évidence du produit final peut être accompli par migration en gel d'agarose en présence de produit intercalant d'ADN fluorescents, à savoir le bromure d'éthidium ou « SYBR Green » ou par mesure de la radioactivité incorporée par autoradiographie ou imagerie au phosphore [160].

La technique de PCR a évolué au cours du temps et on a vu se développer la PCR dite « quantitative » ou « en temps réel », aujourd'hui largement utilisée. Cette technique permet de suivre l'apparition des produits d'amplification au cours du temps [161]. Ce procédé est réalisable grâce à l'ajout dans le mélange réactionnel d'un « reporter » fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. On distingue trois technologies principales pour les sondes : hydrolyse de sondes (Taqman), hybridation de deux sondes (Fluorescence Resonance Energy Transfert FRET) et balises moléculaires (Molecular Beacons). Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman

(Perkin-Elmer-Applied Biosystems) sont les plus utilisées. La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Cette sonde oligonucléotidique porte un fluorophore émetteur dit « reporteur » à son extrémité 5' (ex : FAM : 6-carboxyfluorocein) dont l'émission est inhibée par un second fluorophore supprimeur dit « quencher » situé à l'extrémité 3' (ex : TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Elle s'hybride sur sa cible après l'étape de dénaturation puis l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase va déplacer la sonde et l'hydrolyser. Il y a alors séparation du fluorophore reporteur du fluorophore quencher, permettant ainsi l'émission de fluorescence du reporteur.

Les sondes FRET utilise un couple de sondes d'hybridation très courtes portant chacune un fluorophore, en 3' pour l'une et en 5' pour l'autre. Une fois les deux sondes hybridées à leur séquence cible dans un arrangement en « tête à queue », la proximité des deux fluorophores (moins de 10 nucléotides) permet un transfert d'énergie hautement efficace entre ceux-ci ; ce phénomène est appelé « FRET » (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) et entraîne l'émission d'un signal fluorescent mesurable.

Les « Molecular Beacons » (Stratagene) sont des sondes d'hybridation ayant une structure en épingle à cheveux qui porte à son extrémité 5' un groupement fluorophore émetteur et à son extrémité 3' un groupement supprimeur quencher. La portion de la sonde qui compose la boucle est complémentaire à la séquence cible d'ADN. Le tronc de la balise moléculaire est formé de deux bras avec des séquences complémentaires. Dans le mélange réactionnel, et en absence de séquence cible, la proximité du quencher et de l'émetteur est imposée par la structure secondaire en épingle à cheveux de la sonde. En présence de la séquence cible complémentaire, la sonde s'apparie à sa cible et subit un changement de conformation au cours duquel le quencher s'éloigne de l'émetteur alors capable d'émettre une fluorescence mesurable.

Un seuil de fluorescence est fixé lors de la technique et le cycle à partir duquel la fluorescence émise dépasse ce seuil (Ct pour Cycle threshold) est considéré comme le résultat d'une réaction

positive, dont la valeur est proportionnelle à la quantité initiale d'ADN d'intérêt. Une quantification précise est possible par l'intermédiaire d'une gamme d'étalonnage. Cette technique est plus sensible que la PCR en point final, et a permis la réduction des contaminations par l'absence de manipulation du produit d'amplification. Il existe encore d'autres techniques de sondes comme les sondes scorpions, les UniPrimers ou les consors, mais ils restent plutôt marginaux dans les utilisations de PCR en temps réel actuelles.

### 3.2 La PCR en temps réel

On distingue deux types de PCR en temps réel : la PCR singleplex et la PCR multiplex. La différence réside en l'utilisation d'un set d'un ou plusieurs couple(s) d'amorces et de sondes spécifiques possédant des fluorochromes (*Reporter*) ayant des longueurs d'émission différentes pour amplifier simultanément plusieurs cibles d'ADN en une seule réaction de PCR (Multiplex), plutôt qu'un seul couple d'amorces et sonde pour amplifier une cible d'ADN unique (Singleplex). Pour les protozoaires, les gènes les plus courants ciblés lors de réaction de PCR sont ceux codant l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale (18S). Cette cible a pour avantage d'être présente en de multiples copies, par exemple jusqu'à 200 par trophozoïte d'*E. histolytica*, ce qui permet de garantir une bonne sensibilité de détection [7]. D'autres gènes cibles sont également retrouvés dans la littérature parmi lesquels les gènes ITS-1 [9], ITS-2 [162] et le gène Hsp-70 ARNm [163].

Bien que la PCR dite « singleplex » ait été utilisée dans plusieurs études à visées épidémiologiques s'intéressant à la détection dans un seul échantillon de selle d'un grand nombre de parasites gastro-intestinaux [9,10], c'est la PCR dite « multiplex » qui est actuellement la plus utilisée. Cependant, bien que les possibilités de multiplexage soient vastes, les études sont surtout axées sur les protozoaires les plus fréquents à savoir *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. et *E. histolytica* (Tableau 5). Bien que des PCR dites « maison » ait été

largement développées, des kits commerciaux sont désormais disponibles. Ces kits permettent la détection simultanée d'un large panel de pathogènes parasitaires, bactériens et viraux (Tableau 6), en un temps limité.

Tableau 5. Liste non exhaustive présentant la diversité des panels de protozoaires et microsporidies détectés par PCR multiplex dans différentes études publiées dans la littérature.

<i>Parasites</i>	<i>Études [références bibliographiques]</i>								
	Verweij et al. 2004 [164]	Ten Hove et al. 2007 [165]	Bruijnesteijn Van Coppenraet et al. 2009 [16]	Ten Hove et al. 2009 [166]	Lee et al. 2010 [167]	Stark et al. 2011 [168]	Taniuchi et al. 2011b [169]	Maas et al. 2014 [170]	
<i>Blastocystis</i> spp.									•
<i>Cryptosporidium</i> spp.	•	•	•	•	•	•			•
<i>Cyclospora</i> <i>cayetanensis</i>					•		•		
<i>Cystoisospora</i> <i>belli</i>							•		
<i>Dientamoeba</i> <i>fragilis</i>			◆				◆		◆
<i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i>	•	•	•	•		•			•
<i>Giardia</i> <i>intestinalis</i>	•	•	•	•		•			◆
Microsporidies						•	•		
<i>Strongyloides</i> <i>stercoralis</i>				◆					

• : PCR numéro 1; ◆ : PCR numéro 2

Ils semblent donc adaptés à la routine ainsi qu'à des études épidémiologiques de grande ampleur. Ces kits ont en commun la détection systématique des trois principaux parasites gastro-intestinaux pathogènes : *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* et *E. histolytica*. Certains automates combinent extraction et amplification, c'est le cas de BDmax<sup>TM</sup> Enteric Parasite Panel (Beckton Dickinson), Filmarray® Gastrointestinal Panel (BioMérieux) et xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel (luminex®). D'autres se limitent à l'amplification. De même

les technologies de détection utilisées varient en fonction des kits. Ainsi, certains kits détectent les parasites pas PCR multiplex en temps réel (ex : Allplex<sup>TM</sup> gastrointestinal panel assays (Seegene), DiagCORE<sup>®</sup> Gastrointestinal Panel v2 (Qiagen), RIDA<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel (R-Biopharm), d'autres vont utiliser la technologie microarray (ex : Filmarray<sup>®</sup> Gastrointestinal Panel (BioMérieux)) voir la combinaison de ces deux technologies (ex : Novodiag<sup>®</sup> Stool Parasites (Mobidiag)). En tous les cas, ce sont des systèmes totalement fermés, et le biologiste ne peut contrôler les conditions d'extraction et d'amplification. Enfin un des freins majeurs semble leur coût. De nombreuses études récentes ont étudié la performance de ces kits [18–20,171]. Ces nouvelles méthodes de détections fondées sur des diagnostics syndromiques tendent à remettre en cause les méthodes traditionnelles de détection telles que la microscopie, actuel gold standard.

Tableau 6. Liste des kits commerciaux multiplex disponibles sur le marché et des différents pathogènes détectés.

<b>Kits</b>	<b>Parasites ciblés</b>	<b>Bactéries cibléees</b>	<b>Virus ciblés</b>
Allplex™ gastrointestinal panel assays (Seegene)	<i>Blastocystis hominis</i> <i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	<i>Aeromonas spp.</i> <i>Campylobacter spp.</i> <i>Clostridium difficile</i> toxin B <i>E. coli</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Shigella spp.</i> <i>Vibrio spp.</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Adenovirus Astrovirus Norovirus GI/GII Rotavirus A Sapovirus
BDmax™ Enteric Parasite Panel (Beckton Dickinson)	<i>Cryptosporidium hominis</i> <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	-	-
DiagCORE® Gastrointestinal Panel v2 (Qiagen)	<i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	<i>Campylobacter spp.</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>E.coli</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Salmonella</i> <i>Vibrio spp.</i> <i>Vibrio cholerae</i>	Adénovirus F 40/41 Astrovirus Norovirus GI/GII Rotavirus A Sapovirus (I, II, IV, V)
Easyscreen™ Enteric Protozoa Assay (Genetic signatures)	<i>Blastocystis hominis</i> <i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Entamoeba complex</i> <i>Giardia intestinalis</i>	-	-
Filmarray® Gastrointestinal Panel (BioMérieux)	<i>Cryptosporidium</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	<i>Campylobacter spp.</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>E.coli</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Salmonella</i> <i>Shigelle</i> <i>Vibrio spp.</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Adénovirus F 40/41 Astrovirus Norovirus GI/GII Rotavirus A Sapovirus (I, II, IV, V)
FTD® Stool Parasites (Fast Track Diagnostics)	<i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia intestinalis</i>	-	-
NanoCHIP® Gastrointestinal Panel (Savyon Diagnostics)	<i>Blastocystis hominis</i> <i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Entamoeba dispar</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia intestinalis</i>	<i>Campylobacter sp.</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella sp.</i>	-
Novodiag® Stool Parasites (Mobidiag)	>20 parasites (Disponibles 2019)	-	-
RIDA® GENE Parasitic Stool Panel (R-Biopharm)	<i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	-	-
xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel (Luminex)	<i>Cryptosporidium spp.</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia intestinalis</i>	<i>Clostridium difficile</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella sp.</i> <i>Campylobacter sp.</i> , <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> ,	Adénovirus F 40/41 Norovirus GI/GII Rotavirus A

### 3.3 Le prétraitement

Avec l'avènement ces dix dernières années des méthodes moléculaires de détection des parasites, et particulièrement des protozoaires et microsporidies, la spécificité et la sensibilité de détection de ces parasites s'est vu largement augmenter. La qualité de détection des pathogènes entériques eucaryotes dans les selles est particulièrement dépendante de la qualité et de la pureté de l'extrait d'ADN. Ainsi, le choix d'une méthode appropriée d'extraction de l'ADN est essentielle et nécessite (i) d'être très efficace pour la récupération de l'ADN à partir de microorganismes qui sont fréquemment sous forme d'oocystes/kystes et donc possédant une paroi rigide (ii) d'être adaptée à des échantillons pauci parasitaire et (iii) d'éliminer les nombreux inhibiteurs de PCR (tels que les sels biliaires, l'urée, hémoglobine et l'héparine) présents dans les selles [172].

Dans un souci de standardisation des méthodes d'extraction, afin d'éviter les variabilités inter-laboratoire et de gain de temps à moindre coût, les techniques automatisées ont progressivement remplacées les kits manuels disponibles sur le marché.

Cependant, que l'extraction d'ADN soit manuelle ou automatisée, un prétraitement mécanique et/ou chimique et/ou enzymatique est impératif. En effet, les kystes et les oocystes sont des formes de résistance des parasites et leur paroi sont très difficiles à casser afin de libérer l'ADN. La composition des kystes varie selon l'espèce et la souche considérée [173]. Par exemple, les kystes d'amibes matures sont principalement composés de cellulose, de protéines, de minéraux et de lipides à des concentrations différentes selon les espèces [174]. De nombreux kits d'extraction et de purification d'ADN commercialisés, utilisant une lyse chimique, enzymatique et / ou mécanique, remplacent les méthodes internes (à savoir phénol – chloroforme) [175].

La lyse mécanique va permettre un broyage des échantillons. La méthode la plus courante est l'utilisation de billes de broyage appropriées en association avec un broyeur à haute vitesse ou un vortex. Le broyeur à haute vitesse est recommandé pour les échantillons résistants. La matière des billes (verre, céramique, grenat ou métal) utilisées pour le broyage doit être

résistante, la forme des billes (rondes ou irrégulière) et la taille (petite/poudre, moyenne) doivent être adaptées au broyeur sélectionné ainsi qu'au micro-organisme que l'on cherche à détecter. Par exemple, les billes de taille moyenne en céramique ou en métal seront utilisées pour casser les échantillons les plus difficiles et ne sont recommandées qu'avec les broyeurs à haute vitesse, car elles requièrent de la puissance.

La lyse chimique permet de casser les membranes des cellules tout en gardant l'intégrité des acides nucléiques (absence de dénaturation et de dégradation des acides nucléiques). Ces tampons de lyse sont en général prêts à l'emploi.

La lyse enzymatique fait intervenir l'utilisation d'enzymes lytiques, la protéinase K le plus souvent, afin de lyser les échantillons biologiques riches en protéines. D'autres enzymes telles que l'hydrolase ou la zymolase peuvent être utilisées pour l'extraction de levures ou de champignons

La lyse par choc thermique peut également être utilisée. La chaleur permet de fragiliser les parois cellulaires. Des cycles de congélation/décongélation des échantillons permettent également provoquer la rupture des membranes cellulaires.

### 3.4 L'extraction d'ADN

Le diagnostic fondé sur la PCR des pathologies entéropathogènes eucaryotes nécessite l'utilisation d'une procédure d'extraction de l'ADN efficace, normalisée et susceptible de s'appliquer à la détection de toutes les espèces entéropathogènes eucaryotes afin de simplifier le flux de travail en laboratoire et d'éviter l'hétérogénéité des résultats inter laboratoires. Plusieurs méthodes de purification des acides nucléiques sont utilisées, parmi lesquelles extraction/précipitation, la chromatographie, la centrifugation et la séparation par affinité [176]. La méthode chromatographique par adsorption sélective des acides nucléiques sur silice est la technique la plus utilisée actuellement dans le domaine. Les techniques manuelles utilisent des micro-colonnes de silices. Des kits commerciaux sont disponibles, contenant des micro-

colonnes, tampons de lyse, de lavage et d'éluion [175,177]. Bien qu'ayant une capacité d'adsorption importante et un bon rendement, ces techniques manuelles sont chronophages et donc peu adaptées pour des grandes séries d'échantillons. De très nombreux produits sont sur le marché, notamment pour l'extraction spécifique d'ADN à partir de selles : FastDNATM Spin Kit for Feces (MP Biomedicals), ISOLATE Fecal DNA Kit (Bioline), PowerFecalTM DNA Isolation Kit (MoBio) et QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Le kit QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) est actuellement le plus retrouvé dans la littérature [175,177–179].

Des méthodes automatisées d'extraction d'ADN reposant sur cette même technologie sont également disponibles. On retrouve les automates QIAcube® (Qiagen) où l'adsorption des acides nucléiques est réalisée sur membranes de silice (microplaques tapissées de silice). D'autres utilisent de la silice magnétique, qui a l'avantage de traverser le liquide biologique pour piéger les acides nucléiques, c'est le cas de l'EZ1® (Qiagen), de QIASymphony® (Qiagen) et du NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux). Le choix d'une méthode d'extraction adaptée tiendra compte du temps d'extraction, de la quantité de prélèvement, du rendement ... Par exemple, la silice magnétique sature entre 10 000 et 100 000 cellules, et donc limite la quantité de prélèvement à extraire, ce qui n'est pas le cas des colonnes de silice dont la capacité d'adsorption est très importante (saturation qu'à partir de 5 000 000 de cellules).

Des études ont déjà été menées pour évaluer une combinaison spécifique de performances, de rentabilité et de simplicité des différents kits d'extraction d'ADN en fonction du pathogène d'intérêt [180–182].

### 3.5 Les nouvelles techniques de diagnostic

Bien que la tendance actuelle soit aux PCR multiplex, d'autre méthode de détection, toujours dans le domaine de la biologie moléculaire, sont en développement. Parmi ces techniques, on retrouve la *Loop mediated isothermal amplification* (LAMP), une technique d'amplification

isothermique de l'acide nucléique. Contrairement à la PCR dans laquelle la réaction est effectuée avec une série de cycles de température alternatifs, l'amplification isothermale est réalisée à une température constante (60°C-65°C) et ne nécessite donc pas de thermocycleur.

La LAMP utilise en général 4 amorces différentes pour identifier 6 régions distinctes sur le gène cible, ce qui confère une grande spécificité. A cela s'ajoute une paire d'amorces « de boucle » afin d'accélérer la réaction [183]. La détection du produit d'amplification peut être déterminée par photométrie en raison de la turbidité provoquée par une quantité croissante de sous-produit d'amplification : le précipité de pyrophosphate de magnésium en solution. Cette technique est déjà largement utilisée en première ligne pour le diagnostic du paludisme [184,185] et commence à être développée en médecine vétérinaire, pour la détection de parasites (protozoaires et helminthes) gastro-intestinaux [186,187].

Dans le domaine de la protéomique, l'application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) aux parasites intestinaux humains a été étudiée en laboratoires de recherche, mais se limite à l'études de biomarqueurs [21]. Ainsi des chercheurs ont montrés que la spectrométrie de masse MALDI-TOF pouvait permettre de différencier *E. histolytica* et *E. dispar*. Le principal avantage rapporté (limite de détection de  $10^6$  trophozoïtes  $g^{-1}$  de matières fécales) par rapport à la PCR en temps réel (limite de détection de 10 trophozoïtes  $g^{-1}$  de matières fécales) est le moindre coût de la technique et sa facilité de réalisation pour le diagnostic de *E. histolytica* après cultures xéniques *in vitro* [188]. Enfin, bien que ces techniques ne soient pas encore applicables au diagnostic de routine ou aux études épidémiologiques elles représentent une perspective d'avenir.

## PARTIE II – Article

## 1. Introduction et résumé de l'article

Il existe peu de données épidémiologiques récentes sur les infections parasitaires intestinales chez l'Homme en France. Nous avons mené une étude prospective visant à estimer la prévalence de 10 protozoaires entériques au CHU de La Timone à Marseille, France, à l'aide d'un diagnostic basé sur la détection de l'ADN de ces parasites par la PCR en temps réel. Nous avons recherché : *Balantidium coli*, *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, et deux microsporidies, *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*. Un total de 643 prélèvements de selles, provenant de 488 patients, adressées au laboratoire de parasitologie-mycologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Marseille sur une période de 6 mois a été inclus. Le service de parasitologie-mycologie centralisant les examens parasitologiques des selles provenant de tous les services de l'AP-HM, une grande hétérogénéité concernant la patientèle, les services prescripteurs ainsi que les motifs de réalisation des examens est à noter. La moyenne d'âge des patients était de 44 ans (intervalle : 0 - 97 ans). En amont de cette étude nous avons comparé le kit manuel le plus représenté dans la littérature QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) avec une technique semi automatisée alliant prétraitement mécanique, chimique, enzymatique et extraction automatisée par EZ1® (Qiagen). Des valeurs significativement plus basses de Ct ( $p < 0,002$ ) ont été retrouvées lors d'extraction avec la méthode EZ1® (Qiagen) pour *Blastocystis* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Giardia intestinalis*, *Cystoisospora belli* et *Enterocytozoon bieneusi*. A l'issue de cette étude préliminaire, nous avons choisi d'extraire l'ADN en utilisant la méthode semi-automatisée EZ1® (Qiagen). Les parasites d'intérêt ont été détectés à l'aide de PCR singleplex quantitatives (qPCR). Le choix des amorces pour chaque protozoaire a été réalisé à partir d'une recherche bibliographique dans pubmed. Pour les échantillons positifs, le sous-type *Blastocystis* a été déterminé par analyse de séquence. Au cours de l'étude, la prévalence globale des protozoaires

entériques était de 17%. *Blastocystis* spp. a été l'espèce la plus fréquente (10,5%), suivie par *Dientamoeba fragilis* (2,3%) et *Giardia intestinalis* (2,3%). La prévalence des autres protozoaires était inférieure à 1% chacun. Pour *Blastocystis* spp., les sous types (ST) retrouvés ont été les suivants : le sous-type 3 (ST3) prédominant (43,6%) et les autres sous-types ST1, ST2, ST4 et ST6. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un diagnostic basé sur la qPCR est utilisé pour étudier la prévalence de 10 protozoaires entériques dans un hôpital universitaire français.

## 2. Articles

Les résultats de ces études sont présentés sous la forme de deux articles indexés dans MEDLINE :

Le premier, concerne notre étude préliminaire de comparaison de kits d'extraction d'ADN, publié dans le journal *BMC research notes* (Menu, E., Mary, C., Toga, I., Raoult, D., Ranque, S. and Bittar, F. Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC research notes*, 2018, vol. 11, no 1, p. 206.) ;

Le second, concerne notre étude épidémiologique principale publié dans le journal *Epidemiology and Infection* (Menu, E., Mary, C., Toga, I., Raoult, D., Ranque, S. and Bittar, F. A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiology & Infection*, 2019, vol. 147).

## 2.1. Article 1 : Étude préliminaire

Menu, E., Mary, C., Toga, I., Raoult, D., Ranque, S. and Bittar, F.

Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples.

*BMC research notes*, 2018, vol. 11, no 1, p. 206.

RESEARCH NOTE

Open Access



# Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples

Estelle Menu<sup>1</sup>, Charles Mary<sup>2</sup>, Isabelle Toga<sup>2</sup>, Didier Raoult<sup>1</sup>, Stéphane Ranque<sup>2</sup> and Fadi Bittar<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Objective:** Efficient and easy-to-use DNA extraction and purification methods are critical in implementing PCR-based diagnosis of pathogens. In order to optimize the routine clinical laboratory diagnosis of eukaryotic enteric pathogens, we compare, via quantitative PCR cycle threshold (Ct) values, the efficiency of two DNA extraction kits: the semi-automated EZ1<sup>®</sup> (Qiagen) and the manual QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen), on six protozoa: *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Giardia intestinalis* and *Cystoisospora belli* and one microsporidia: *Enterocytozoon bieneusi*.

**Results:** Whereas EZ1<sup>®</sup> (Qiagen) and QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen) yielded similar performances for the detection of *Cryptosporidium* spp. and *D. fragilis*, significant lower Ct values ( $p < 0.002$ ) pointed out a better performance of EZ1<sup>®</sup> on the five remaining pathogens. DNA extraction using the semi-automated EZ1<sup>®</sup> procedure was faster and as efficient as the manual procedure in the seven eukaryotic enteric pathogens tested. This procedure is suitable for DNA extraction from stools in both clinical laboratory diagnosis and epidemiological study settings.

**Keywords:** Enteric parasites, Protozoa, Microsporidia, qPCR, DNA extraction

## Introduction

Human diseases caused by eukaryotic enteric pathogens are a major public health concern [1]. Of these, protozoa are the most prevalent [2]. In order to increase the specificity and sensitivity of detection of these parasites, molecular tools have been developed over the last 10 years. PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens is particularly dependent upon the quality and purity of the initial DNA material. Thus, choosing an appropriate DNA extraction method is critical: it needs to (i) be highly efficient for DNA recovery from microorganisms that are frequently in oocyst form and in low abundance compared to bacterial communities and (ii) remove the many PCR inhibitors (such as bile salts, urea, hemoglobin and heparin) that are present in stools. The relatively recent introduction and rapidly increasing use

of PCR-based diagnosis for eukaryotic enteric pathogen diseases requires the use of a DNA extraction procedure that should be efficient and standardized and which could be applied to the detection of all eukaryotic enteric pathogens species in order to simplify laboratory work-flow and avoid the heterogeneity of inter-laboratory results [3]. Many commercialized DNA extraction and purification kits, using chemical, enzymatic and/or mechanical lysis, are replacing in-house methods (i.e. phenol–chloroform) [4]. Studies have already been conducted to evaluate a specific combination of performance, cost-effectiveness, and simplicity of various DNA extraction kits according to the pathogen of interest [5–7], but none of these studies have directly compared these methods. In this study, we compared the performance of two commercial kits: a semi-automated EZ1<sup>®</sup> procedure (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and a manual technique, the QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen), for the DNA extraction and purification of the most significant eukaryotic enteric pathogens [2] from stool samples.

\*Correspondence: fadi.bittar@univ-amu.fr

<sup>1</sup> Aix Marseille Univ, IRD, APHM, MEPHI, IHU-Méditerranée Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France

Full list of author information is available at the end of the article

## Main text

### Materials and methods

The comparison was carried out by direct elution of DNA from the same parasite-positive fecal samples and then by comparing the detectability of the eluted DNA by quantitative PCR (qPCR).

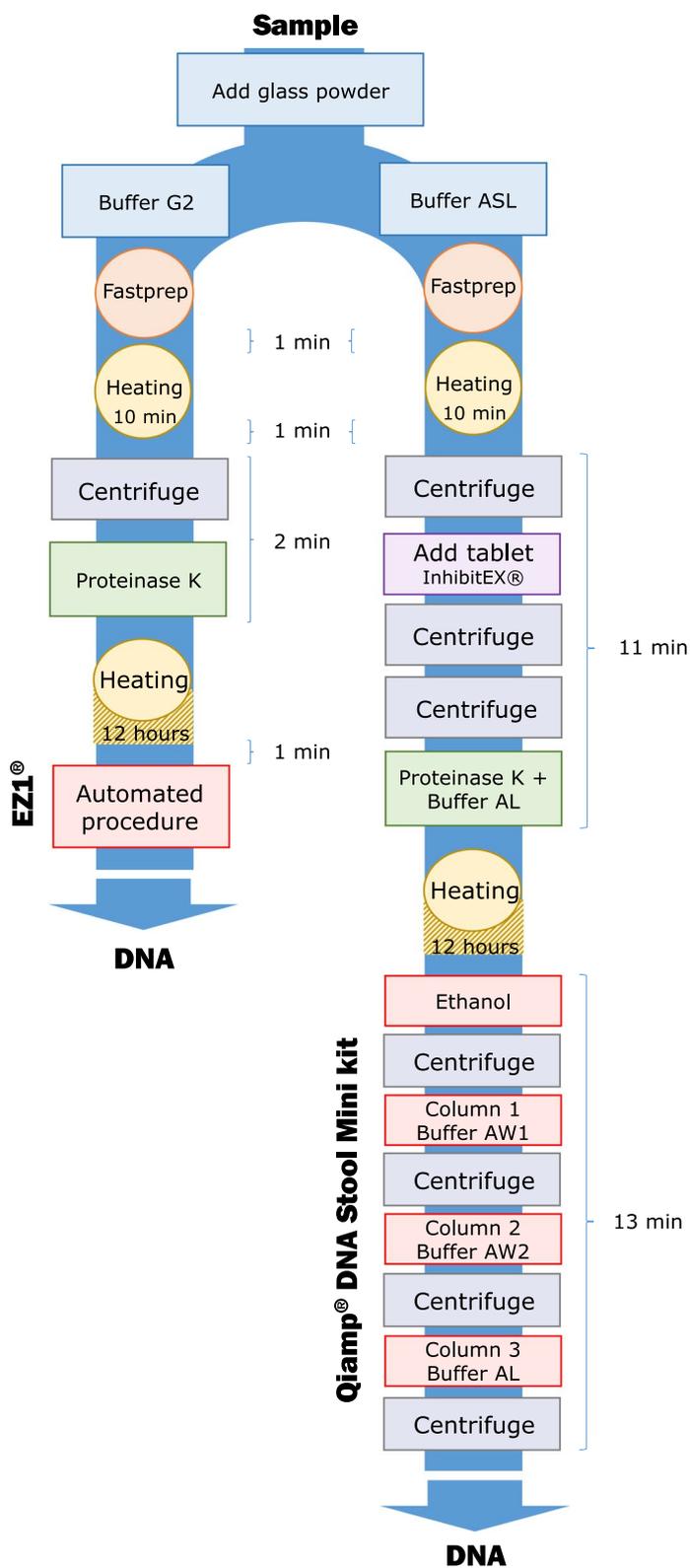
This study included 24 positive fecal samples collected between January and July 2017 as part of routine laboratory diagnosis at the Parasitology–Mycology Laboratory at Marseille’s University Hospital (France). The presence of targeted eukaryotic enteric pathogens was confirmed by microscopic examination and/or routine PCR methods in our laboratory. The fecal samples were fixed in absolute ethanol and stored at 4 °C. To assess the differences in sensitivity between both extraction procedures, positive stools were serially diluted with PCR-negative stool samples. No written consent was needed for this work in accordance with the French law on bioethics (LOI No 2004-800 relative à la bioéthique) published in the “Journal Officiel de la République Française” on August 6, 2004, since no additional samples were taken for the study. According to this law, patients were informed that anonymized stool specimens could be used for further studies. A semi-automated procedure (EZ1<sup>®</sup>, Cat. No. 953034, Qiagen) and a manual procedure (QIAamp<sup>®</sup> Stool Mini Kit, Cat. No. 51504, Qiagen) were used in parallel. For each procedure, the manufacturer’s recommendations were modified by adding mechanical, chemical and enzymatic pretreatment steps (Fig. 1). The semi-automated extraction procedure was adapted for stool processing as follows: 200 mg of stool sample was added to 350 µL of G2 lysis buffer (Qiagen) in a tube with glass powder (acid washed glass beads 425–600 µm, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and then disrupted in a FastPrep BIO 101 apparatus (Qbiogene, Strasbourg, France) at maximum power for 40 s. After 10 min of incubation at 100 °C to allow for complete lysis, tubes were centrifuged at 10,000g for 1 min. Subsequently, 200 µL of supernatant was enzymatically digested using 20 µL of proteinase K (20 mg/mL, Qiagen), and incubated overnight at 56 °C. The automated procedure using the EZ1 Advanced XL extractor with the V 1.066069118 Qiagen DNA bacteria card and the EZ1<sup>®</sup> DNA Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) was then performed for between 15 and 30 min without the intervention of an operator, as described by the manufacturer. The manual procedure, based on the use of the QIAamp<sup>®</sup> Stool Mini Kit (Qiagen), which is considered as a reference method in the literature [8], was used (Fig. 1). Briefly, 200 mg of stool sample was added to 1.3 mL of ASL lysis buffer (Qiagen) in a tube with glass powder and then disrupted in a FastPrep BIO 101 apparatus at maximum power for 40 s and heated for 10 min at 95 °C.

Impurities and PCR inhibitors were removed by adding inhibitEX Tablets (Qiagen) to each sample. The obtained supernatants were then enzymatically digested using 20 µL of proteinase K (20 mg/mL, Qiagen) in Buffer AL (200 µL) and incubated overnight at 56 °C. The released DNA was absorbed onto silica membranes in QIAamp mini spin columns (Qiagen). After extensive washing with AW1/AW2 Buffers, the retained DNA was eluted in AE Buffer. Nucleic acids concentration was estimated, by measuring the absorbance at 260 nm (A260), using a NanoDrop<sup>™</sup> 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Then, DNA purity was assessed by determining the ratio of spectrophotometric absorbance of each extracted sample at 260 nm to that of 280 nm (A260/A280 ratio; an indicator of protein or phenol contamination). Indeed, pure DNA extraction should have an A260/A280 ratio  $\geq 1.8$  [5].

Total extracted DNA was used as a template for the singleplex qPCR targeting either *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Dientamoeba fragilis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Giardia intestinalis* or *E. bieneusi* using specific primers and probes (Table 1), as described by Sow et al. [9]. The qPCR reactions were performed in a 20 µL total volume with 10 µL Master mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 0.5 µL of each primer, 0.5 µL of probe, 3 µL of distilled water, 0.5 µL of Uracil-DNA glycosylase (UDG) and 5 µL of DNA. Analyses were performed using a CFX96<sup>™</sup> Real-Time PCR detection system (BIO-RAD Life Science, Marnes-la-Coquette, France). Amplification reactions were performed as follows: 2 min at 50 °C, 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. qPCR results were considered negative when the cycle threshold (Ct) value exceeded 37 or no amplification curve was obtained, as described in previous studies [10]. To control for extraction quality and the absence of PCR inhibitors, universal eubacterial primers and probes [11] were used to amplify 16S rRNA bacterial genes, with qPCR named “all bacteria”, performed on all specimens. The statistical comparison of Ct values obtained with both extraction procedures was performed with GraphPad Prism, version 6.0 (La Jolla, CA). Normal distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. The Student t test was used to compare the DNA extraction procedures.

### Results and discussion

In both extraction methods tested, we adapted the manufacturer’s recommendations to improve DNA extraction yield by enhancing the lysis of protozoa cysts. Combining mechanical lysis using glass powder with both enzymatic and chemical lysis has been shown to significantly enhance the DNA extraction yield of eukaryotic enteric



**Fig. 1** A schematic flow diagram showing the two extraction procedures: EZ1® and QiAamp® DNA Stool Mini Kit and time required for each step. min minute

**Table 1 List of primers and probes used in this study**

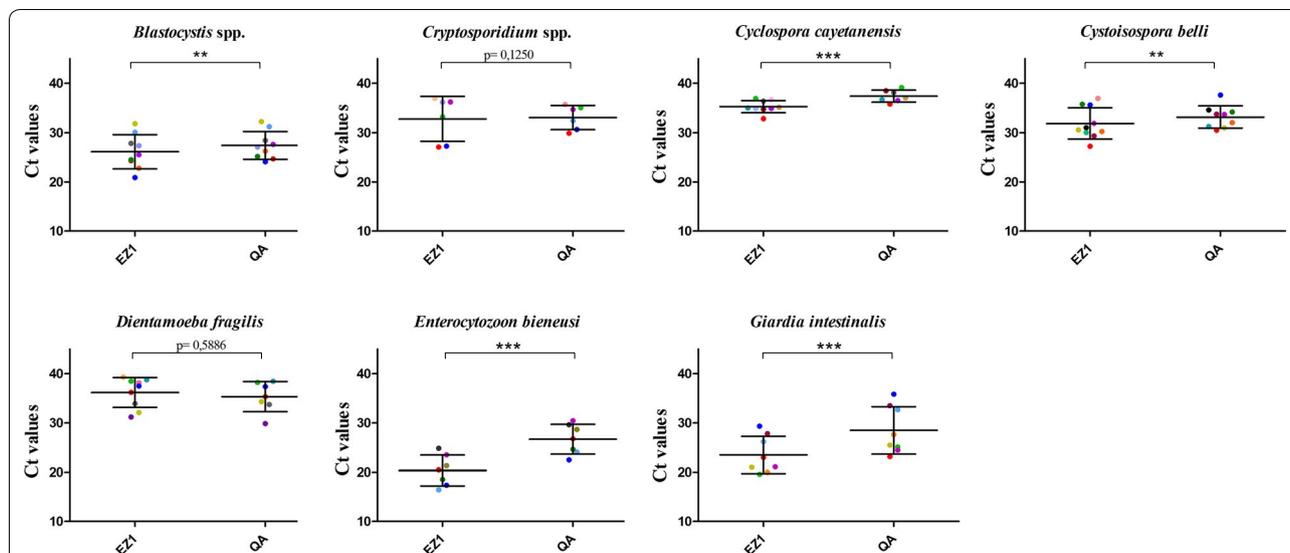
Organism	Name	Primers/probes	Target region
<i>Blastocystis</i> sp.	Blasto FWD F5	5'-GGTCCGGTGAACACTTTGGATTT-3'	18S
	Blasto R F2	5'-CCTACGGAACCTTGTTACGACTTCA-3'	
	Blasto probe	5'-FAM-TCGTGTAAATCTTACCATTAGAGGA-MGBNFQ-3'	
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	1PS_F	5'-AACTTTAGCTCCAGTTGAGAAAGTACTC-3'	Hsp70 gene
	1PS_R	5'-CATGGCTCTTACCCTTAAAGAATTCC-3'	
	Crypt_P	5'-FAM-AATACGTGTAGAACCACCAACCAATACAACATC-TAMRA-3'	
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Cyclo250F	5'-TAGTAACCGAACGGATCGCATT-3'	18S
	Cyclo350R	5'-AATGCCACGTAGCCAATA-3'	
	Cyclo281T	5'-FAM-CCGGCGATAGATCATTCAAGTTTCTGACC-TAMRA-3'	
<i>Cystoisospora belli</i>	Ib-40F	5'-ATATCCCTGCAGCATGTCTGTTT-3'	ITS2
	Ib-129R	5'-CCACACGCGTATCCAGAGA-3'	
	Ib-81Taq	5'-FAM-CAAGTTCTGTCCACGCGCTTCTGG-TAMRA-3'	
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Df-124F	5'-CAACGGATGTCTTGGCTCTTTA-3'	18S
	Df-221R	5'-TGCATTCAAAGATCGAAGTTATCAC-3'	
	Df-172revT	5'-VIC CAATTCTAGCCGCTTAT-BHQ1-3'	
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	FEB1	5'-CGCTGTAGTTCTCTGCAGTAAACTATGCC-3'	18S
	REB1	5'-CTTGCGAGCGTACTATCCCCAGAG-3'	
	PEB1	5'-FAM-ACGTGGGCGGGAGAAATCTTAGTTCGGG-TAMRA-3'	
<i>Giardia intestinalis</i>	Giardia-80F	5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3'	18S
	Giardia-127R	5'-TTGCCAGCGGTGCCG-3'	
	Giardia-105T	5'-FAM-CCC GCGGGTCCCTGCTAG-BHQ1-3'	
TTB (all bacteria)	TTB_16S_F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	16S
	TTB_16S_R	5'-TTACCGCGCKGCTGGCAC-3'	
	TTB338K_FAM	5'-FAM- CCAKACTCTACGGGAGGCAGCAG-3'	

pathogens [4]. Thus, we increased the proteinase K incubation time by 12 h and added a mechanical lysis step. We objectively quantified and compared the hands-on time required to process an individual sample with each commercial kit by totaling the respective incubation times and the duration of each centrifugation step. The EZ1<sup>®</sup> (Qiagen) procedure required 752 min per sample (12 h 32 min), on the other hand the QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen) procedure required 756 min (12 h 36 min). Furthermore, if we are only interested in the steps that require the operator's intervention, the EZ1 procedure takes 15 min but this is not the case for manual technique which takes 36 min, Fig. 1. The higher the number of samples, the more complex and long the manual procedure is. We considered the EZ1<sup>®</sup> (Qiagen) procedure to be superior because of its higher throughput, shorter hands-on time, and lower contamination risk, associated with fewer manual preparation steps, than with the QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen).

Then, nucleic acids yield and purity were assessed in both procedures; EZ1<sup>®</sup> extraction method provided a higher concentration of nucleic acids (mean value  $\pm$  standard deviation = 29.61  $\pm$  18.46 ng/ $\mu$ L)

and lower levels of contaminating compounds (A260/A280 = 2.34  $\pm$  0.41) compared to QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (15.31  $\pm$  18.78 ng/ $\mu$ L, A260/A280 = 1.98  $\pm$  0.17). Moreover, all extracted samples gave positive results using the universal bacterial qPCR (the average Ct for all samples was 19.92  $\pm$  3.97) indicating the absence of PCR inhibitors.

The qPCR Ct values generated for each DNA template obtained with each extraction method is a function of the initial amount of parasite DNA in the amplification reactions. We use the Ct values as a surrogate marker of DNA purification efficiency. Each positive sample was extracted at the same time with these two methods, and qPCR detection was performed in the same CFX96<sup>™</sup> run. No negative controls were amplified in any experiments. Figure 2 shows the Ct value distribution in PCR-positive samples obtained with both commercial methods. For *C. cayetanensis*, *G. intestinalis* and *E. bieneusi*, the Cts were significantly lower ( $p < 0.0001$ ) with the EZ1<sup>®</sup> compared to the QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit. Similarly, the Cts were significantly lower ( $p < 0.002$ ) using the EZ1<sup>®</sup> kit for *Blastocystis* spp. and *C. belli*. In contrast, there was no statistically significant difference between either method



**Fig. 2** Ct values dot plots of PCR-positive samples for the seven eukaryotic enteric pathogens: *Blastocystis* spp. (n = 9), *Cryptosporidium parvum/hominis* (n = 8), *Cyclospora cayetanensis* (n = 10), *Dientamoeba fragilis* (n = 9), *Giardia intestinalis* (n = 8), *Cystoisospora belli* (n = 10) and *Enterocytozoon bieneisi* (n = 7) obtained with the two extraction procedures evaluated in the present study: EZ1® (EZ1) and QIAamp® DNA Stool Mini Kit® (QA). Mean values and standard deviation ranges for each pathogen are represented by large and short horizontal bars, respectively. Statistical significance is represented as \*\* (p < 0.002) and \*\*\* (p < 0.0001). Different colours indicate different samples. Same samples are represented by the same colour

for the detection of *Cryptosporidium* spp. and *D. fragilis* DNA.

**Conclusion**

A universal, reproducible, simple, efficient and robust extraction method is particularly valuable for PCR-based diagnosis which is increasingly used in both clinical laboratories and epidemiological studies [9, 12, 13]. To date, the EZ1® procedure has been validated for the DNA extraction of viruses and bacteria [14] but also for fastidious microorganisms such as archaea [15]. Therefore, and in line with our findings, we recommend using the EZ1® kit-based procedure, as described herein, for the PCR-based detection of eukaryotic intestinal pathogens in stool samples.

**Limitations**

The main limitation of this study is the sample size that may have been too small due to the low number of positive stools in France. In fact, this work was carried out as a part of an epidemiological survey in order to select the most suitable extraction kit; the positive samples were harvested prospectively, which is why they are in limited numbers. Moreover, in this study, we focused on the eukaryotic enteric pathogens most found in France. In further investigations, it would be useful to test a larger number of eukaryotic enteric pathogens.

**Abbreviations**

qPCR: quantitative PCR; Ct: cycle threshold; A260: the spectrophotometric absorbance at 260 nm; A260/A280: the ratio of spectrophotometric absorbance of each extracted sample at 260 nm to that of 280 nm; UDG: uracil-DNA glycosylase.

**Authors' contributions**

All cited authors qualify for authorship according to the ICMJE guidelines. EM, CM and FB carried out the molecular studies. IT carried out the sample recruitment. DR, SR and FB carried out supervision, writing, review editing. All authors read and approved the final manuscript.

**Author details**

<sup>1</sup> Aix Marseille Univ, IRD, APHM, MEPHI, IHU-Méditerranée Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. <sup>2</sup> Aix Marseille Univ, IRD, APHM, VITROME, IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France.

**Acknowledgements**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Availability of data and materials**

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

**Funding**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, private, or not-for-profit sectors.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 5 February 2018 Accepted: 20 March 2018

Published online: 27 March 2018

## References

- World Health Organization. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation: executive summary. Geneva: World Health Organization; 2012.
- Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(3):420–49.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012;113(5):1014–26.
- Babaei Z, Oormazdi H, Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp Parasitol.* 2011;128(2):159–62.
- Paulos S, Mateo M, de Lucio A, Hernández-de Mingo M, Bailo B, Saugar JM, et al. Evaluation of five commercial methods for the extraction and purification of DNA from human faecal samples for downstream molecular detection of the enteric protozoan parasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba* spp. *J Microbiol Methods.* 2016;127:68–73.
- Mary C, Chapey E, Dutoit E, Guyot K, Housseine L, Jeddi F, et al. Multi-centric 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):2556–63.
- Yoshikawa H, Dogruman-AI F, Dogruman-Ai F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, et al. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol Res.* 2011;109(4):1045–50.
- Hamad I, Abou Abdallah R, Ravaux I, Mokhtari S, Tissot-Dupont H, Michelle C, et al. Metabarcoding analysis of eukaryotic microbiota in the gut of HIV-infected patients. *PLoS ONE.* 2018;13(1):e0191913.
- Sow D, Parola P, Sylla K, Ndiaye M, Delaunay P, Halfon P, et al. Performance of real-time polymerase chain reaction assays for the detection of 20 gastrointestinal parasites in clinical samples from Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(1):173–82.
- Mejia R, Vicuña Y, Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, et al. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(6):1041–7.
- Dridi B, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS ONE.* 2009;4(9):e7063.
- Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1220–3.
- Shin J-H, Lee S-E, Kim TS, Ma D-W, Chai J-Y, Shin E-H. Multiplex-Touch-down PCR to Simultaneously Detect *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Cyclospora cayetanensis*, the Major Causes of Traveler's Diarrhea. *Korean J Parasitol.* 2016;54(5):631–6.
- Persson S, de Boer RF, Kooistra-Smid AMD, Olsen KEP. Five commercial DNA extraction systems tested and compared on a stool sample collection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;69(3):240–4.
- Khelaifia S, Ramonet P-Y, Bedotto Buffet M, Drancourt M. A semi-automated protocol for Archaea DNA extraction from stools. *BMC Res Notes.* 2013;7(6):186.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 2.2. Article 2 : Étude principale

Menu, E., Mary, C., Toga, I., Raoult, D., Ranque, S. and Bittar, F.

A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening,  
Marseille, France.

*Epidemiology & Infection*, 2019, vol. 147

## Original Paper

**Cite this article:** Menu E, Mary C, Toga I, Raoult D, Ranque S, Bittar F (2019). A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiology and Infection* **147**, e100, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000165>

Received: 24 July 2018

Revised: 15 January 2019

Accepted: 19 January 2019

**Key words:**

Enteric parasites; France; microsporidia; protozoa; qPCR

**Author for correspondence:**

F. Bittar, E-mail: [fadi.bittar@univ-amu.fr](mailto:fadi.bittar@univ-amu.fr)

# A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France

E. Menu<sup>1</sup>, C. Mary<sup>2</sup>, I. Toga<sup>2</sup>, D. Raoult<sup>1</sup>, S. Ranque<sup>2</sup> and F. Bittar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aix Marseille University, IRD, APHM, MEPHI, IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France and <sup>2</sup>Aix Marseille University, IRD, APHM, VITROME, IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France

**Abstract**

There is a scarcity of recent epidemiological data on intestinal parasitic infections in France. We conducted a prospective study aimed at estimating the prevalence of 10 enteric parasites in Marseille, France, using real-time polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis. A total of 643 faeces from 488 patients referred to the Parasitology-Myology Laboratory of the University Hospital of Marseille over a 6 months period were included. DNA was extracted using a semi-automated method. Parasites of interest were detected using singleplex quantitative PCRs (qPCRs). For positive samples, the *Blastocystis* subtype was determined by sequence analysis. During the study, the overall prevalence of enteric parasites was 17%. *Blastocystis* sp. was the most frequent species (10.5%), followed by *Dientamoeba fragilis* (2.3%) and *Giardia intestinalis* (2.3%). The prevalence of other parasites was <1% each. The ST3 *Blastocystis* subtype was predominant (43.6%) and the other subtypes identified were ST1, ST2, ST4 and ST6. This is the first time that a qPCR-based diagnosis has been used to survey the prevalence of 10 enteric parasites in a French University Hospital. This study confirms that fast, specific, sensitive and simultaneous detection in a single stool sample by qPCR clearly outperforms conventional microscopy-based diagnosis. Furthermore, qPCR is particularly well suited to surveying gastroenteritis agents.

**Introduction**

Intestinal parasitic disease remains one of the greatest health problems in developing countries. The World Health Organization estimates that around 3.5 billion people worldwide are affected and that 450 million show symptoms of an illness [1]. Much attention has been paid to enteric parasites in developing countries. In contrast, the current situation of enteric parasitic diseases in Europe is poorly understood. First, due to the lack of an operational surveillance system and under-reporting, confirmed cases of intestinal parasitic infections are often not reported. Thus, available data are fragmented and the prevalence of such diseases might be underestimated. Second, the frequency of intestinal parasitic diseases might also be subjected to changes in industrialised countries as a consequence of climate change, globalisation, increasing frequency of travels and worldwide international exchanges, including immigration and the adoption of children from endemic regions [2]. Therefore, it appears crucial to conduct epidemiological studies in industrialised countries. Regarding protozoa parasites, *Cryptosporidium parvum/hominis*, *Blastocystis* sp., *Entamoeba* spp. as well as *Giardia intestinalis* and *Dientamoeba fragilis* are the most common species associated with human diarrhoea worldwide [3], although the pathogenic potential of *Blastocystis* sp. and *D. fragilis* remains controversial. In fact, recent publications have reported *D. fragilis* as a commensal in children [4,5]. These species, along with others such as *Cyclospora cayetanensis*, *Balantidium coli* and *Cystoisospora belli* and two microsporidia, *Enterocytozoon bienewisi* and *Encephalitozoon intestinalis*, should therefore be considered in such surveillance studies.

While microscopic examination of stool samples remains the gold standard for the diagnosis of parasitic infections, it is time-consuming, laborious and requires substantial technical expertise. In contrast, rapid diagnostic methods such as polymerase chain reaction (PCR)-based assays have been developed to improve sensitivity and specificity of the detection of enteric parasites, including helminths, protozoa and microsporidia [6, 7]. While most of the published studies focus on a limited number of intestinal protozoa [8, 9], new PCR-based diagnostic tools can detect a large range of intestinal parasites in a single human stool sample and are particularly suitable for epidemiological surveys [10, 11]. Their high sensitivity allows the detection of low parasite levels and the use of quantitative assays, enabling the parasitic load to be quantified, which might be useful for the post-treatment monitoring of the patients [12–14]. Furthermore, detecting multiple intestinal parasites using a standardised protocol enhances the reproducibility of results.

© The Author(s) 2019. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This work is the first prospective, monocentric, French epidemiological study aiming at estimating the occurrence of eight protozoans: *Blastocystis sp.*, *C. parvum/hominis*, *C. cayetanensis*, *D. fragilis*, *G. intestinalis*, *B. coli*, *Entamoeba histolytica* and *C. belli* and two microsporidia: *E. bienewisi* and *E. intestinalis*, using singleplex real-time quantitative PCR (qPCR) analysis. Microscopy and qPCR results were also compared.

## Materials and methods

### Samples collection, ethical norms and routine microscopic examination

Faecal samples were collected at the Parasitology-Myology Laboratory at La Timone University Hospital in Marseille during routine parasitological examinations of stool samples from patients between January 2017 and July 2017. Intestinal parasites in stool specimens were assessed during routine medical visits. Patients received written laboratory work-up reports. qPCRs were performed on surplus stool samples. Patient's characteristics were obtained from a retrospective, non-interventional review of medical charts and laboratory results. According to French law, the patients were informed that their samples and clinical data may be used for research purposes and retained the right to oppose to the use of their anonymous medical data for such purposes. Therefore, neither dedicated ethical approval nor individual patient consent was required for this type of study (Loi no 2012-300 du 5 mars 2012 and Décret no 2016-1537 du 16 novembre 2016 published in the 'Journal Officiel de la République Française'). For each patient, the reason for the consultation and sampling were retrieved from the hospital management system database and were classified into five groups: gastro-intestinal symptoms including abdominal pain, diarrhoea, rectal bleeding, abdominal meteorism (bloating) and constipation (some of these symptoms were found concurrently); recent travel to endemic areas; hyper-eosinophilia; immunosuppression (HIV, transplant recipient, chemotherapy); and undetermined reason. Of note that some patients might belong to several groups. Upon arrival, microscopic examination of each stool sample was routinely performed by an experienced operator, using direct saline solution, iodine mounts and formol-ethyl acetate concentration techniques. *Cryptosporidium* spp. and Microsporidia have exclusively been sought at the request of the prescriber. In these cases, a modified Ziehl-Neelsen stain and in-house PCR were performed, respectively.

### DNA extraction from stool samples

DNA extraction was performed daily using the EZ1 (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) automated protocol with mechanical, chemical and enzymatic pre-treatment [15]. The extraction protocol was adapted for stool processing as follows: 200 mg of stool sample was added to 350 µl of G2 lysis buffer (Qiagen GmbH) in a tube containing glass powder (acid-washed glass beads 425–600 µm, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and then disrupted in a FastPrep-24 grinder (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) at maximum power for 40 s. After 10 min of incubation at 100 °C to allow complete lysis, tubes were centrifuged at 10 000 g for 1 min. A 200 µl of supernatant was then added to a tube containing 20 µl of Proteinase K, and incubated overnight at 56 °C. Finally, the automated protocol using the EZ1 Advanced XL extractor was performed

as described by the manufacturer. Extracted DNA was eluted in 200 µl.

To control for both DNA extraction quality and the absence of PCR inhibitors, a eubacterial 16S rRNA qPCR was performed on each DNA, as previously described [16]. Extraction was repeated in the event of a negative result which indicates the presence of PCR inhibitors in the sample.

### Singleplex qPCR amplification and detection

Ten different specific primer pairs and Taqman™ (Eurogentec®, Seraing, Belgium) hydrolysis probes targeting the following species: *Blastocystis sp.*, *C. parvum/hominis*, *C. cayetanensis*, *C. belli*, *D. fragilis*, *E. bienewisi*, *E. intestinalis*, *B. coli*, *E. histolytica* and *G. intestinalis* were used in singleplex assays (Table 1). All primer sequences and PCR conditions have been previously described [17–26]. Briefly, each qPCR reaction was conducted in a 20 µl total volume containing 10 µl of Master mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 0.5 µl of each primer, 0.5 µl of probe, 3 µl of distilled water, 0.5 µl of UDG and 5 µl of DNA. Analyses were performed using a CFX96™ Real-Time PCR detection system (BIO-RAD, Life Science, Marnes-la-Coquette, France). Amplification reaction was performed directly after DNA extraction as follows: 2 min of incubation at 50 °C, 5 min of incubation at 95 °C, followed by 40 cycles of 5 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. The qPCR results were considered negative when the Ct value exceeded 37 or when no amplification was obtained, as described in previous studies [11, 17].

### Standard curves using plasmid templates for quantification

Serial dilutions of plasmids designed with target nucleotide sequences were used to establish standard curves using a dilution range of 10<sup>2</sup> to 10<sup>7</sup> copies of plasmid DNA in the qPCR assay. Plasmid DNA were synthesised by Eurogentec®; the targeted gene was cloned in pUC57 by EcoRV. Lyophilised plasmids were rehydrated to one target-sequence copy per plasmid. A set of plasmid dilutions was included in each qPCR assay to estimate the number of target copies and to monitor analytical sensitivity. Two dilutions (10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> copies) of each plasmid were included in each assay as positive controls.

### Amplification of the SSU rDNA gene and *Blastocystis sp.* molecular subtyping

DNA sequencing was used for *Blastocystis sp.* subtyping. Each *Blastocystis sp.*-positive DNA sample was subjected to a standard PCR assay using the *Blastocystis sp.*-specific primers BL18SPPF1 (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCTCAA-3') and BL18SR2PP (5'-TCTTCGTTACCCGTTACTGC-3'), designed by Poirier *et al.* [27]. These primers target a 320–342 bp DNA fragment in the *Blastocystis sp.* SSU rRNA gene, the nucleotide sequence of which varies depending on the subtype (ST). Amplification was performed in a 50 µl total volume with the AmpliTaq Gold® 360 protocol (Thermo Fisher Scientific, France). Following denaturation at 95 °C for 15 min, 40 cycles of amplification were performed with a 2720 Thermal Cycler™ (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) as follows: 30 s at 95 °C, 30 s at 59 °C and 30 s at 72 °C. The amplification products were assessed by electrophoresis using 1.5% agarose gel and SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™, Carlsbad, USA). PCR products were purified using MultiScreen® PCR (Meck Millipore,

**Table 1.** List of primers and probes used in this study

Organism	Name	Primers/probes	Target region	References
<i>Balantidium coli</i>	BcoliF	5'-TGCAATGTGAATTGCAGAACC-3'	ITS-1	[17]
	BcoliR	5'-TGGTTACGCACACTGAAACAA-3'		
	BcoliP	5'-FAM-CTGGTTTAGCCAGTGCCAGTTGC-TAMRA-3'		
<i>Blastocystis</i> sp.	Blasto FWD F5	5'-GGTCCGGTGAACACTTTGGATT-3'	18S	[18]
	Blasto R F2	5'-CCTACGGAACCTTGTACGACTTCA-3'		
	Blasto probe	5'-FAM-TCGTGTAATCTTACCATTAGAGGA-MGBNFQ-3'		
<i>Cryptosporidium parvum/hominis</i>	1PS_F	5'-AACTTTAGCTCCAGTTGAGAAAGTACTC-3'	Hsp70 gene	[19]
	1PS_R	5'-CATGGCTTTTACCGTTAAAGAATTCC-3'		
	Crypt_P	5'-FAM-AATACGTGTAGAACCACCAACCAATACAATC-TAMRA-3'		
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Cyclo250F	5'-TAGTAACCGAACGGATCGCATT-3'	18S	[20]
	Cyclo350R	5'-AATGCCACGTAGGCCAATA-3'		
	Cyclo281T	5'-FAM-CCGGCGATAGATCATTCAAGTTTCTGACC-TAMRA-3'		
<i>Cystoisospora belli</i>	Ib-40F	5'-ATATTCCTGCAGCATGTCTGTTT-3'	ITS2	[21]
	Ib-129R	5'-CCACACGCGTATTCCAGAGA-3'		
	Ib-81Taq	5'-FAM-CAAGTTCTGCTCACGCGCTTCTGG-TAMRA-3'		
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Df-124F	5'-CAACGGATGTCTTGGCTCTTTA-3'	18S	[22]
	Df-221R	5'-TGCATTCAAAGATCGAACTTATCAC-3'		
	Df-172revT	5'-FAM-CAATTCTAGCCGCTTAT-BHQ1-3'		
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	FEI1	5'-GCAAGGGAGGAATGGAACAGAACAG-3'	18s	[23]
	REI1	5'-CACGTTTCAAGCCATTACACAGC-3'		
	PEI1	5'-FAM-CGGGCGGCACGCGCACTACGATA-TAMRA-3'		
<i>Entamoeba histolytica</i>	Ehf	5'-AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAGTAAAA-3'	18s	[24]
	Ehr	5'-CTTAGAATGTCATTCTCAATTCAT-3'		
	Ehp	5'-FAM-ATTAGTACAAAATGGCCAATTCATCA-TAMRA-3'		
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	FEB1	5'-CGCTGTAGTTCTCGAGTAACTATGCC-3'	18S	[25]
	REB1	5'-CTTGCAGCGTACTATCCCAGAG-3'		
	PEB1	5'-FAM-ACGTGGGCGGAGAAATCTTTAGTGTTCGGG-TAMRA-3'		
<i>Giardia intestinalis</i>	Giardia-80F	5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3'	18S	[26]
	Giardia-127R	5'-TTGCCAGCGGTGTCCG-3'		
	Giardia-105T	5'-FAM-CCCAGCGGGTCCCTGCTAG-BHQ1-3'		

Darmstadt, Germany) and the sequencing reaction was carried out using a DNA sequencing kit (BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1 Ready Reactions; AB Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Sequencing products were purified, and electrophoresis was performed with a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The nucleotide sequences were assembled and corrected using the CodonCode Aligner (Centerville, MA, USA) software and compared with those available in the GenBank database, using the BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) software.

#### Data analysis

For qualitative variables, the  $\chi^2$  (when applicable) or the Fisher's exact test was used. For quantitative variables, normal distribution was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test and the Student's *t* test or the Mann–Whitney test were used when applicable.

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism, version 6.0 (La Jolla, CA) software.

#### Nucleotide sequence accession numbers

All sequences obtained in this work were deposited in GenBank database under accession numbers MG865904 to MG865961.

## Results

#### Prevalence and diseases

This study includes a total of 643 stool samples (from 488 patients; 111 patients of them provided more than one sample) that were submitted to the Parasitology Department of La Timone Hospital (3400 beds; >1 000 000 consultations/year) in Marseille for routine microscopic examination between January

2017 and July 2017. Patients' ages ranged from 1 to 97 years and the sex ratio was 1.09. No PCR inhibitors were detected by eubacterial 16S rRNA qPCR; the average Ct for all samples was  $18.33 \pm 4.06$ . Among these patients, 83 (17%, 95% confidence interval (95% CI) 13.8–20.7) were found to be positive for at least one of the 10 enteric parasites tested (Table 2). *Blastocystis* sp. was the most common, with a 10.5% prevalence (51 patients) (95% CI 7.9–13.6), followed by *G. intestinalis* and *D. fragilis* with 2.3% prevalence (11 patients) (95% CI 1.2–4) each. The prevalence of the remaining investigated parasites was as follows: three patients (0.6%, 95% CI 0.1–1.9) for *C. cayetanensis*, two patients (0.4%, 95% CI 0–1.6) for each *C. belli*, *E. bieneusi* and *C. parvum/hominis* and one patient (0.2%, 95% CI 0–1) for *E. intestinalis*. Neither *E. histolytica* nor *B. coli* were detected in the tested samples. Of the 488 patients, 283 (58%, 95% CI 53.5–62.4) had gastro-intestinal symptoms, 80 (16.4%, 95% CI 13–20) had travelled to tropical or developing countries during the last 6 months, 26 (5.3%, 95% CI 3.6–7.8) consulted because of hyper-eosinophilia and 169 (34.6%, 95% CI 30.4–39) were immunosuppressed, and in 40 of cases (8.20%, 95% CI 6–11) the reasons for performing the examination were not provided. For the remaining 69 patients, the reasons for stool examination did not fit any of the aforementioned groups and include unexplained itching and allergies. Among positive qPCR patients, six of them had HIV (one patient with *Cryptosporidium* spp., two patients with *C. cayetanensis*, two patients with *Cytoisospora belli* and one patient with *E. bieneusi*) and two of them had renal transplant (one patient with *Cryptosporidium* spp. and one patient with *E. bieneusi*). Among the 11 positively diagnosed patients with *G. intestinalis*, nine of them were associated with diarrhoea. Finally, no significant association was found linking the detected enteric parasites with the age range of patients, neither with the time of sample collection nor the reason for consultation and sampling.

#### Comparison between qPCR and microscopy

Overall, qPCR and microscopic examination were positive in 99 (15.4%, 95% CI 12.7–18.5) and seven (1.1%, 95% CI 0.5–2) of the 643 samples, respectively ( $P < 0.0001$ ). While the detection of *G. intestinalis* was positive in five samples using both methods, eight additional samples were detected positive for *G. intestinalis* via qPCR (Table 2). *Cyclospora cayetanensis*, *C. belli*, *C. parvum/hominis* and *D. fragilis* were only detected by qPCR. Of note that low levels of *Blastocystis* sp. have not been notified in routine microscopic examination because they stand within the normal, 'non-pathogenic' range (i.e.  $\leq 5$  cysts per high-power field). Moreover, *Cryptosporidium* spp. and *Microsporidia* spp. were exclusively searched at the request of the prescriber/doctor. Thus, the overall detection rates, calculated excluding *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium* spp. and *Microsporidia*, were 4.5% ( $n = 29$ ) (95% CI 3–6.5) and 0.8% ( $n = 5$ ) (95% CI 0.3–1.9) for qPCR and microscopy ( $P < 0.0001$ ), respectively.

#### Poly-parasitism

In 15 samples, two or three distinct species were concomitantly detected. *Blastocystis* sp. and *D. fragilis* were found in eight patients; *Blastocystis* sp. and *G. intestinalis* in three patients; and *Blastocystis* sp. and *C. parvum/hominis*, *Blastocystis* sp. and *E. intestinalis*, and *C. cayetanensis* and *C. belli* in one patient each. In one patient, we detected *Blastocystis* sp., *C. cayetanensis* and *C. belli*.

#### qPCR quantification

Standard curves were analysed to determine the efficiency of qPCR reactions. The standards had a linear quantification range from  $1 \times 10^2$  to  $1 \times 10^7$  gene copies per 5  $\mu$ l of plasmid DNA, and the limit of detection was 10 copies per reaction (data not shown). The efficiency, slope of the standards, correlation coefficient ( $r^2$ ) and intercept ranged from 80.5% to 94.7%,  $-3.898$  to  $-3.455$ , 0.970 to 0.999 and 41.915 to 46.239, respectively. The calculated gene copy number in positive samples is plotted for each intestinal pathogen in Figure 1.

#### Blastocystis subtyping

Following the sequence analyses of the 62 *Blastocystis*-positive samples (51 patients), five STs were detected (Fig. 2). ST3 was the most frequent ( $n = 27$ , 43.6%, 95% CI 31–56.7), followed by ST1 ( $n = 11$ , 17.7%, 95% CI 9.6–29.9), ST2 ( $n = 8$ , 12.9%, 95% CI 6–24.4), ST4 ( $n = 8$ , 12.9%, 95% CI 6–24.4) and ST6 ( $n = 8$ , 12.9%, 95% CI 6–24.4). In cases where a given patient provided several samples, the same subtype was found in all related samples except for one patient (patient 8), in whom we found ST3 and ST6 in samples 29 and 30, respectively. A phylogenetic tree was constructed to illustrate the relationship between the different subtypes found in our samples (Fig. 2). There was no significant correlation between patient demographics, disease categories or co-detection with another parasite and the *Blastocystis* subtype.

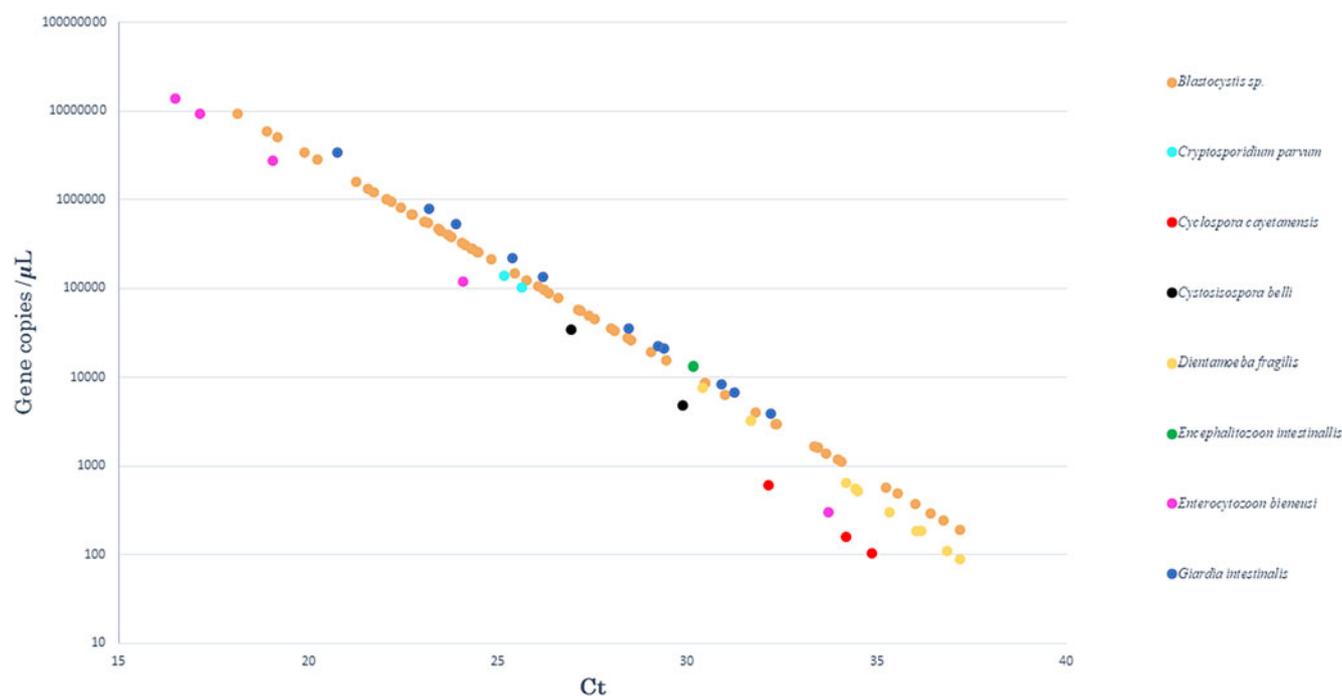
#### Discussion

This work is the first prospective epidemiological survey of 10 enteric parasites based on qPCR conducted in France. It highlights the enhanced specificity and sensitivity of qPCR compared with microscopy for the diagnosis of these enteric parasites. Despite relatively high costs, a growing number of clinical laboratories are equipped with automated extraction systems and qPCR thermal cyclers. Increased diagnostic performance is particularly important for enhancing patients' care but also for detecting outbreaks. When investigating an outbreak, enhanced diagnosis and case detection makes it easier to trace the source and improve the control of the outbreak [28]. We will successively discuss our findings for each pathogen.

*Blastocystis* sp. was found in 10.5% (51/488) of the patients, making it the most common enteric parasites in our study. This is not surprising, since *Blastocystis* sp. are among the most frequently observed intestinal parasites in humans with a prevalence ranging between 0.5% and 60% across the world [29]. The prevalence found in our survey throughout winter and spring is closely similar to the prevalence (13.7%) that was reported in the winter in a recent multi-centre study in France [30]. However, it remains lower than the prevalence (35.2%) found in a recent Spanish study [31]. The pathogenicity of *Blastocystis* sp. is still controversial [32]. While, in our study, we did not find any significant correlation between *Blastocystis* sp. detection and the reason for the consultation, abdominal pain was significantly more frequently reported in *Blastocystis* sp. carriers. The prevalence of *Blastocystis* in the population has been confirmed by both qPCR and standard PCR. The low sensitivity of microscopy can be explained by the fact that the *Blastocystis* is notified only when high levels (i.e.  $>5$  cysts per high-power field) are present in stool samples. The subtype distribution in the study population showed five different subtypes: ST1, ST2, ST3, ST4 and ST6. Subtypes 1–4 have been

**Table 2.** Intestinal parasites in stool samples from the department of parasitology at La Timone hospital, Marseille ( $n = 643$ ) as detected with microscopy and qPCR

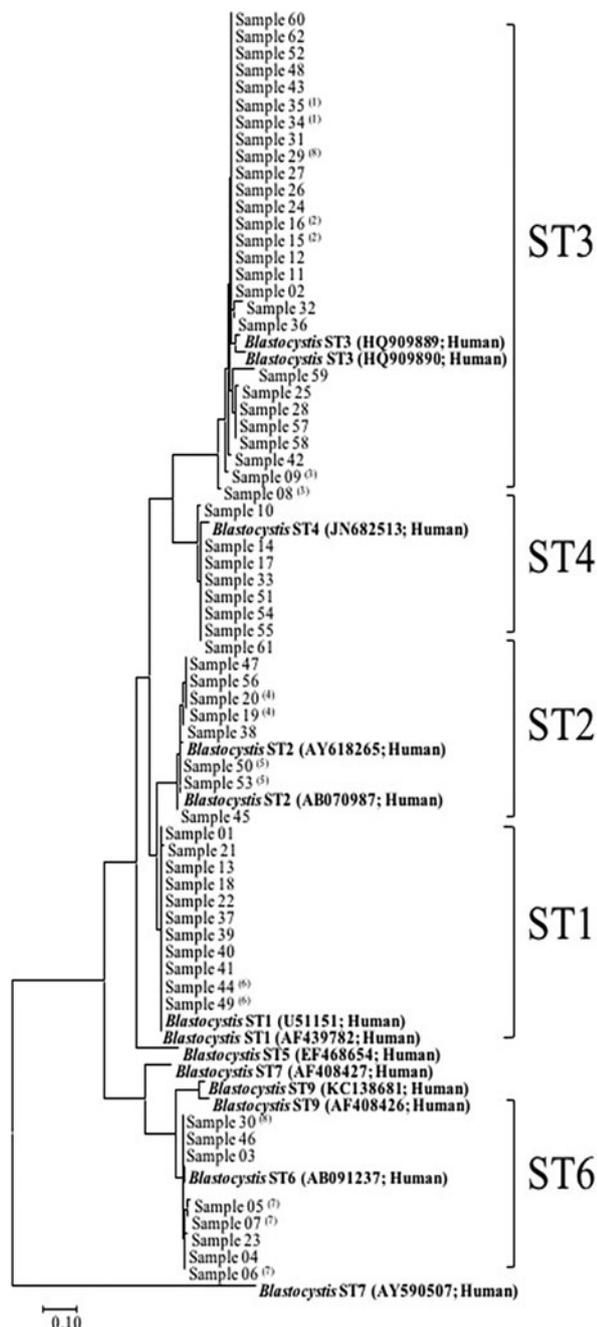
	Positive samples by qPCR (%) ( $n = 643$ stool samples)	Positive patients by qPCR (%) ( $n = 488$ patients)	Positive samples by microscopy
<i>Balantidium coli</i>	0 (0)	0 (0)	0
<i>Blastocystis spp.</i>	62 (9.6)	51 (10.5)	2
<i>Cryptosporidium spp.</i>	2 (0.3)	2 (0.4)	0
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	3 (0.5)	3 (0.6)	0
<i>Cystoisospora belli</i>	2 (0.3)	2 (0.4)	0
<i>Dientamoeba fragilis</i>	11 (1.7)	11 (2.3)	0
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	1 (0.2)	1 (0.2)	0
<i>Entamoeba histolytica</i>	0 (0)	0 (0)	0
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	5 (0.8)	2 (0.4)	0
<i>Giardia intestinalis</i>	13 (2)	11 (2.3)	5
Total	99	83	7

**Fig. 1.** Results obtained after quantification by qPCR. The curve representing the number of gene copies, as a function of qPCR Ct values, in positive samples for each of the eight enteric parasites tested.

pointed out as the most common subtypes in humans [30, 33]. In line with our findings, a previous study identified ST3 as the predominant subtype [33]. Nevertheless, another recent work performed in northern Spain detected ST2 more frequently than the other subtypes together [31]. ST1 was relatively frequent in our study group (17.7%) compared with other European studies (Swedish patients [34] and Spanish individuals [31]), but is consistent with one previous French study [35]. In addition, similar results for the remaining subtypes have also been reported in Sweden [34]. The relative occurrence of subtypes 1–4 and 6 suggests that heterogeneity in transmission efficiency to humans may exist between them. The ST4 is mainly found in Europe [34] and

has been associated with infectious diarrhoea [31], but not in our work. The relatively high prevalence of ST6 observed in this study, which has mainly been described in birds so far, may suggest a zoonotic transmission [30, 36].

Concerning *G. intestinalis*, which is a protozoan often responsible for diarrhoea, it was detected using qPCR with a prevalence of 2.3%, and is the second most prevalent in our study. This is in agreement with previous studies that estimated that the prevalence of *G. intestinalis* ranges between 2% and 7% in industrialised countries [3]. We also noticed that giardiasis remains underdetected by microscopy. Indeed, the quality of the microscopic investigation remains technician-dependent and time-



**Fig. 2.** Phylogenetic relationship between the SSD rDNA sequence of *Blastocystis*. The molecular phylogenetic analysis was carried out using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model. ST, subtype; (n): patient number in case of multiple samples.

consuming. In developed countries, where a limited number of positive samples have been examined and where the parasite levels are typically low in positive samples, technicians' performance is likely to be suboptimal. In our work, the samples missed by microscopy revealed significantly higher Ct values ( $P = 0.0034$ ), indicative of a lower number of parasites, which has also been reported elsewhere [37]. Except for *G. intestinalis*, for which 81.8% (9/11) of the infected patients presented with diarrhoea, the other detected parasites were not associated neither with a symptom nor with a group of patients.

*Dientamoeba fragilis* is a flagellate protozoan parasite of the human gastro-intestinal tract, the biological cycle of which remains partly undetermined [38]. The prevalence of dientamoebiasis equals that found for giardiasis in this study, with a prevalence of 2.3%. Previous surveys showed that the prevalence varies from 0.4% (in patients with gastrointestinal discomfort) to 82.9% (in children infected with other gastrointestinal protozoa) [38]. Although recent studies have reported *D. fragilis* as a commensal in children [4, 5], the detection of this parasite was neither statistically associated with diarrhoea nor showed a bias towards children. A study conducted in the Netherland [39] revealed a rate of co-infection with *Blastocystis* sp. in a half of the cases of dientamoebiasis in paediatric patients. Similarly, we documented, in our survey, a high rate of combination with *Blastocystis* sp. (72.7%, 8 patients/11). It is notable that there was no significant correlation between *D. fragilis* infection and *Blastocystis* subtypes.

On explanation for the low number of positive stool samples for *Cryptosporidium* spp. (0.4%, two patients) might be that our study was carried out from January to July 2017, while in developed countries, a peak in the prevalence of cryptosporidiosis is observed during summer months [40]. In addition, both patients were receiving immunosuppressive therapy; one was a renal transplant recipient and the other was a patient co-infected by HIV and HCV who presented with diarrhoea after returning from India, a highly endemic area [41].

Microsporidiosis, an opportunistic infection caused by obligate intracellular microsporidia fungi species, has been particularly well documented in immunocompromised patients [42]. In this study, we found four *E. bienensei*-positive samples in an HIV-infected patient with a low ( $<100/\text{mm}^3$ ) CD4 count at the time of collection. Another patient was a renal transplant recipient. *Encephalitozoon intestinalis* was also found in a patient suffering from diarrhoea without a fever, who had lived in Cambodia and died before being tested for HIV.

The two *C. cayetanensis*-positive patients were immigrants from Albania and HIV-positive. Both were co-infected with *C. belli*. Due to the lack of microscopic detection of these two parasites in both patients, we cannot exclude a cross-reactivity between *C. cayetanensis* and *C. belli* PCRs. One of these two patients was also infected with *Blastocystis* sp. Cases of cyclosporiasis have been described previously in Germany [43].

Finally, we did not detect any patients with *E. histolytica* or *B. coli* during our study. In fact, in developed countries, *E. histolytica* infections are rare and often related to travel to endemic regions [44] although sporadic and epidemic cases of *B. coli* have been described in Europe [45].

## Conclusion

In this prospective hospital-based epidemiological survey, we report the occurrence of 10 enteric parasites, including eight protozoans and two microsporidia species, in Marseille, France. It highlights a relatively high prevalence of *G. intestinalis* and *D. fragilis*, second only to *Blastocystis* sp. The detection of these parasites, mainly by qPCRs, provides further evidence of qPCR superiority and questions the current use of microscopy as the diagnostic gold standard. Moreover, our results emphasise the value of qPCR-based assays in stools for surveying multiple infectious gastroenteritis agents. Similar studies have been previously performed in other European countries. However, this work is the first study to use qPCR to detect gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening in France, which can help to

understand the current situation of enteric parasitic diseases in Europe. Further epidemiological surveys should aim at identifying risk factors associated with these parasites, including seasonality or eco-geographical factors.

**Author ORCIDs.**  F. Bittar, 0000-0003-4052-344X

**Acknowledgments.** We are grateful to the technicians and clinicians involved for their collaboration. This work was supported by the French Government under the 'Investissements d'avenir' (Investments for the Future) programme managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, fr: National Agency for Research), (reference: Méditerranée Infection 10-IAHU-03).

**Author contributions.** Conception or design of the work: DR, SR and FB; data collection: EM, CM and IT; data analysis and interpretation: all authors; drafting the article: EM, SR and FB; critical revision of the article: all authors. All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. **World Health Organization** (2012) Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: A roadmap for implementation: Executive summary. Available at <http://apps.who.int/iris/handle/10665/70809?locale=en>.
2. **Calderaro A et al.** (2014) Intestinal parasitoses in a tertiary-care hospital located in a non-endemic setting during 2006–2010. *BMC Infectious Diseases* **14**, 264.
3. **Fletcher SM et al.** (2012) Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 420–449.
4. **Holtman GA et al.** (2017) *Dientamoeba fragilis* colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. *Family Practice* **34**, 25–29.
5. **Jokelainen P et al.** (2017) *Dientamoeba fragilis*, a commensal in children in Danish day care centers. *Journal of Clinical Microbiology* **55**, 1707–1713.
6. **Verweij JJ** (2014) Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. *Parasitology* **141**, 1863–1872.
7. **Verweij JJ and Stensvold CR** (2014) Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews* **27**, 371–418.
8. **Ten Hove RJ et al.** (2009) Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **28**, 1045–1053.
9. **Bruijnesteijn van Coppentraet LES et al.** (2009) Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **15**, 869–874.
10. **Basuni M et al.** (2011) A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **84**, 338–343.
11. **Mejia R et al.** (2013) A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **88**, 1041–1047.
12. **Momčilović S et al.** (2018) Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clinical Microbiology and Infection*, 1–20. pii: S1198-743X 30395-1.
13. **Ryan U et al.** (2017) New technologies for detection of enteric parasites. *Trends Parasitology* **33**, 532–546.
14. **García LS et al.** (2018) Laboratory diagnosis of parasites from the gastrointestinal tract. *Clinical Microbiology Reviews* **31**, e00025–17.
15. **Menu E et al.** (2018) Evaluation of two DNA extraction methods for the PCR-based detection of eukaryotic enteric pathogens in fecal samples. *BMC Research Notes* **11**, 206.
16. **Dridi B et al.** (2009) High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanospaera stadmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS ONE* **4**, e7063.
17. **Sow D et al.** (2017) Performance of real-time polymerase chain reaction assays for the detection of 20 gastrointestinal parasites in clinical samples from Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **97**, 173–182.
18. **Stensvold CR et al.** (2012) Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 1847–1851.
19. **Garcés-Sánchez G et al.** (2009) Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. *Water Research* **43**, 2669–2678.
20. **Verweij JJ et al.** (2003) Detection of *Cyclospora cayentanensis* in travellers returning from the tropics and subtropics using microscopy and real-time PCR. *International Journal of Medical Microbiology* **293**, 199–202.
21. **Ten Hove R-J et al.** (2008) Real-time polymerase chain reaction for detection of *Isospora belli* in stool samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **61**, 280–283.
22. **Verweij JJ et al.** (2007) Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Molecular and Cellular Probes* **21**, 400–404.
23. **Menotti J et al.** (2003) Development of a real-time PCR assay for quantitative detection of *Encephalitozoon intestinalis* DNA. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1410–1413.
24. **Roy S et al.** (2005) Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 2168–2172.
25. **Menotti J et al.** (2003) Development of a real-time polymerase-chain-reaction assay for quantitative detection of *Enterocytozoon bieneusi* DNA in stool specimens from immunocompromised patients with intestinal microsporidiosis. *The Journal of Infectious Diseases* **187**, 1469–1474.
26. **Verweij JJ et al.** (2004) Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1220–1223.
27. **Poirier P et al.** (2011) 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. *Journal of Clinical Microbiology* **49**, 975–983.
28. **Hennessy TW et al.** (2004) Survey of physician diagnostic practices for patients with acute diarrhea: clinical and public health implications. *Clinical Infectious Diseases* **38**(suppl. 3), S203–S211.
29. **Clark CG et al.** (2013) Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in Parasitology* **82**, 1–32.
30. **El Safadi D et al.** (2016) Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infectious Diseases* **16**, 451.
31. **Paulos S et al.** (2018) Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses and Public Health* **65**, 993–1002.
32. **Andersen LO and Stensvold CR** (2016) *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective? *Journal of Clinical Microbiology* **54**, 524–528.
33. **Bart A et al.** (2013) Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infectious Diseases* **13**, 389.
34. **Forsell J et al.** (2012) Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **31**, 1689–1696.
35. **Souppart L et al.** (2009) Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitology Research* **105**, 413–421.
36. **Noël C et al.** (2005) Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 348–355.

37. **Ten Hove R *et al.*** (2007) Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection* **13**, 1001–1007.
38. **Garcia LS** (2016) *Dientamoeba fragilis*, one of the neglected intestinal Protozoa. *Journal of Clinical Microbiology* **54**, 2243–2250.
39. **Maas L *et al.*** (2014) Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infectious diseases* **20**, 545–550.
40. **Fournet N *et al.*** (2013) Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. *Euro Surveillance* **18**, 1–5. pii: 20348.
41. **Gupta S *et al.*** (2008) Chronic diarrhoea in HIV patients: prevalence of coccidian parasites. *Indian Journal of Medical Microbiology* **26**, 172–175.
42. **Bednarska M *et al.*** (2014) Occurrence of intestinal microsporidia in immunodeficient patients in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **21**, 244–248.
43. **Döller PC *et al.*** (2002) Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerging Infectious Diseases* **8**, 992–994.
44. **Vreden SG *et al.*** (2000) Outbreak of amebiasis in a family in The Netherlands. *Clinical Infectious Diseases* **31**, 1101–1104.
45. **Schuster FL and Ramirez-Avila L** (2008) Current world status of *Balantidium coli*. *Clinical Microbiology Reviews* **21**, 626–638.

## PARTIE III – Discussion

Dans ce travail, nous avons réalisé à notre connaissance la première étude épidémiologique, prospective, portant sur la détection par qPCR de dix protozoaires gastro-intestinaux, en France et plus précisément dans les Bouches-du-Rhône chez des patients pris en charge à l'AP-HM. Nous avons recherché : *Balantidium coli*, *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, et deux microsporidies, *Encephalitozoon intetsinalis* et *Enterocytozoon bienewisi*. Dans notre étude, qPCR et examen microscopique des selles étaient positifs dans 99 (15,4%) et sept (1,1%) échantillons sur les 643 échantillons inclus, respectivement ( $p < 0,0001$ ). Tous les prélèvements retrouvés positifs en microscopie, étaient également positifs par qPCR pour les mêmes protozoaires. Ce qui souligne la sensibilité accrue de la qPCR par rapport à l'examen microscopique, et sa bonne spécificité dans le diagnostic des protozooses digestives. Aujourd'hui, malgré des coûts relativement élevés, un nombre croissant de laboratoires de biologie médicale s'équipent de systèmes d'extraction automatisés et d'automates à qPCR. L'augmentation des performances diagnostiques est un point sensible pour améliorer les soins apportés aux patients, et permet également de détecter plus facilement les épidémies. Lors d'enquêtes sur une épidémie, l'amélioration du diagnostic et de la détection, la plus exhaustive possible, des cas facilite l'identification de la source et permet ainsi de mieux contrôler l'épidémie [6]. Notre étude ayant été réalisée en France, nous avons décidé de comparer nos chiffres aux résultats obtenus dans les pays industrialisés, et particulièrement en Europe. Nous n'avons pas comparé nos résultats aux prévalences dans les pays à ressources limitées. Cependant, les échantillons de selles inclus dans cette étude étaient analysés dans le service de parasitologie-mycologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Marseille qui centralise les examens parasitologiques des selles provenant de tous les services de l'AP-HM. Il existe donc une grande hétérogénéité chez les patients de notre étude. Certains échantillons de selles provenaient de patients au retour de voyage dans des pays à ressources limitées ou de migrants,

ce qui créer un biais dans le facies épidémiologique des protozooses française. Dans cette partie, nous discuterons successivement de nos découvertes pour chaque agent pathogène.

*Blastocystis* spp. a été retrouvé chez 10.5% (51/488) des patients par qPCR, et seulement chez 0,4% (2/488) des patients par microscopie. Ce sont les protozoaires entériques les plus courants dans notre étude. Ces chiffres ne sont pas surprenants, puisque *Blatsocystis* spp. fait partie des parasites intestinaux les plus fréquemment rencontrés chez l'Homme avec une prévalence allant de 0.5% à 60% à travers le monde (dans les pays industrialisés et les pays à ressources limitées) [189]. Concernant les variations saisonnières, la prévalence de *Blastocystis* spp. constatée dans notre enquête est de 9,1% (18/197) en hiver contre 11,3% (33/291) au printemps. La prévalence hivernale est donc comparable à celle rapportée dans une étude multicentrique réalisée en France (13,7%) [31]. La prévalence de *Blastocystis* spp. retrouvée dans notre étude est inférieure à celle constatée dans une étude espagnole (35,2%) [37], ce qui peut s'expliquer par la période d'étude, 6 mois et 1 an respectivement. La pathogénicité de *Blastocystis* spp. est très controversée [33]. Alors que dans notre étude, nous n'avons trouvé aucune corrélation significative entre la détection de *Blastocystis* sp. et le motif de consultation, la présence de douleurs abdominales était significativement plus fréquente chez les porteurs de *Blastocystis* spp.. La prévalence de *Blastocystis* dans la population a été confirmée à la fois par qPCR et par PCR standard utilisée pour déterminer le sous-type. La faible sensibilité de l'examen microscopique peut s'expliquer par le fait que les *Blastocystis* ne soient notifiés que si ils se trouvent en grande quantité dans les échantillons de selles (i.e.>5 kystes par champ), comme il est recommandé dans les bonnes pratiques de laboratoires. La distribution des ST de *Blastocystis* chez l'Homme est relativement homogène à travers le monde. Chez l'homme, on retrouve les ST1 à ST9, et c'est le ST3 qui est le plus fréquent suivi par les ST1, ST2 et ST4 [31,190]. La distribution des sous-types dans la population étudiée montre cinq sous-types différents : ST3 (43,6%), ST1 (17,7%), ST2 (12,9%), ST4 (12,9%) et ST6 (12,9%). Conformément à nos résultats, une précédente étude réalisée en 2008 avait identifié le ST3

comme le sous-type prédominant [190]. Néanmoins, un autre travail récent réalisé dans le nord de l'Espagne a détecté le ST2 plus fréquemment que les autres sous-types [37]. La prévalence du ST1 (17,7%) dans notre étude concorde avec celle retrouvée chez les suédois et les espagnols, 15,9% [36] et 13,2% [37], respectivement, mais reste légèrement inférieure à la prévalence retrouvée dans une autre étude française, 25,6% [191]. Des résultats concordant pour les ST1 et ST2 ont également été rapportés en Suède :15,9% et 14,4% [36], respectivement. A noter la variabilité concernant la prévalence du ST4 selon les études européennes: 20,6 % en Suède [36] contre 7,5% en Espagne [37] et 12,9% dans ce travail. On observe dans notre étude une prévalence relativement élevée du ST6 (12,9%), comparé à une autre étude française, 2,1% [31]. Ce sous-type n'était pas retrouvé dans les études espagnols et suédoise [36,37]. Il existe donc une disparité géographique de distribution de *Blastocystis* spp. au sein de la population des pays industrialisés. Ceci suggère des réservoirs et des modes de transmissions différents selon les régions, l'environnement et le climat [32]. Le ST4 se trouve principalement en Europe [36] et a été associé à une diarrhée infectieuse [37]. Dans notre étude, ce sous-type n'a pas été retrouvé chez des patients diarrhéiques. Dans les cas où un patient donné a fourni plusieurs échantillons de selles, le même sous-type a été trouvé dans tous les échantillons associés, excepté pour un patient. Chez ce patient qui nous avons trouvé le ST3 et le ST6 dans deux échantillons de selles différents réalisés à quelques jours d'intervalle, suggérant une coinfection.

Concernant *Giardia intestinalis*, qui est un protozoaire souvent responsable de diarrhées, il a été détecté par qPCR avec une prévalence de 2,3%. Ce résultat est en accord avec les études précédentes estimant, dans les pays industrialisés, la prévalence de *G. intestinalis* entre 2% et 7% [5]. Nous avons également constaté que la giardiose reste sous-détectée en microscopie : seulement 38,5% (5/13) des prélèvements retrouvés positifs en qPCR ont été retrouvés positifs en microscopie. L'investigation microscopique est un examen chronophage et fastidieux. Dans les pays industrialisés, la complexité de cet examen réside dans la faible quantité de parasites

présents dans les échantillons positifs. Dans notre travail, les échantillons positifs rattrapés par la qPCR ont révélé des valeurs de Ct significativement plus élevées que les échantillons positifs en microscopie ( $p = 0,0034$ ). Au-delà de 30 Ct, les prélèvements retrouvés positifs en qPCR étaient négatifs en microscopie : ces échantillons correspondent donc à des selles moins riches en parasites. De plus la qPCR peut détecter la présence d'ADN alors que le parasite n'est plus présent en tant que microorganisme intègre dans le prélèvement de selles. Cette discordance entre microscopie et qPCR a également été rapporté dans d'autres études [165]. Parmi les patients positifs pour *Giardia intestinalis* en qPCR et en microscopie, 81.8% (9/11) et 100% (5/5) respectivement, présentaient une diarrhée. Quatre patients malades diarrhéiques ont donc été diagnostiqués uniquement par qPCR : Cet outil joue un rôle important dans l'amélioration diagnostique.

*Dientamoeba fragilis* est un protozoaire flagellé du tractus gastro-intestinal humain, dont le cycle biologique reste en partie indéterminé [192]. La prévalence de la dientamibiase est égale à celle trouvée pour la giardiase dans cette étude, soit 2,3%. Des enquêtes précédemment réalisées avaient montré une prévalence variant de 0,4% (chez les patients présentant une symptomatologie gastro-intestinale) à 82,9% (chez les enfants co-infectés par d'autres protozoaires gastro-intestinaux) [192]. Des études récentes ont rapporté que *D. fragilis* est un commensal chez l'enfant [101,102]: la détection de ce parasite dans notre étude n'a pas été statistiquement associée à la présence de diarrhée, et n'a pas été retrouvé plus fréquemment chez les enfants. Pour rappel dans notre étude sur 11 patients ayant des prélèvements positifs à *D. fragilis* quatre patients étaient des enfants âgés de moins de 18 ans. Une étude menée aux Pays-Bas [170] a révélé, chez près de la moitié des patients en pédiatrie (< 18ans) positifs à *D. fragilis*, une co-infection par *Blastocystis* spp.. De même, dans notre étude, sur les quatre patients âgés de moins de 18 ans, deux avaient une co-infection *Blastocystis* spp. / *D. fragilis*. Au total, en tenant compte des adultes, nous avons documenté dans notre étude un taux élevé de co-infection par *Blastocystis* spp. chez les patients infectés par *D. fragilis* (72,7%, 8 patients

/11). Peut-être en relation avec un réservoir commun. Notons qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre l'infection à *D. fragilis* et les sous-types de *Blastocystis*.

Le faible nombre d'échantillons de selles positifs pour *Cryptosporidium* spp. (0,4%, deux patients) pourrait être expliqué par la période durant laquelle notre étude a été réalisée, de janvier à juillet 2017. En effet, dans les pays industrialisés, un pic de prévalence de la cryptosporidiose est observé pendant les mois d'été [193]. De plus, les deux patients positifs recevaient un traitement immunosuppresseur; l'une était transplantée rénale et l'autre était une patiente co-infectée par le VIH et le VHC qui avait présenté une diarrhée après son retour d'Inde, une région fortement endémique [194]. En France métropolitaine, les cas de cryptosporidiose sont majoritairement sporadiques, la dernière épidémie de cryptosporidiose remontant à 2006 [195].

La microsporidiose est une infection opportuniste causée par des champignons intracellulaires obligatoires, qui est particulièrement bien documentée chez les patients immunodéprimés [196]. Dans cette étude, nous avons retrouvé cinq échantillons positifs pour *Enterocytozoon bieneusi* appartenant à deux patients différents. L'un des échantillons appartenait à un patient transplanté rénal. Les quatre autres échantillons appartenaient à un même patient infecté par le VIH ayant un nombre de CD4 faible (<100 / mm<sup>3</sup>) au moment du diagnostic. *Encephalitozoon intestinalis* a été trouvé chez une patiente d'origine Cambodgienne, souffrant de diarrhée non fébrile et décédée avant que ne puisse être recherchées des causes d'immunodépression (incluant le VIH). Dans les pays industrialisés, les infections à *E. bieneusi* sont plus fréquentes que les infections à *E. intestinalis* chez les patients immunodéprimés, ce qui concorde avec nos résultats [196].

Les deux patients positifs pour *Cyclospora cayetanensis* étaient des immigrants albanais séropositifs pour le VIH. Ces derniers étaient co-infectés par *Cystoisospora belli*. Malgré l'absence de détection microscopique de ces parasites chez les deux patients, une réactivité croisée entre les PCR de *C. cayetanensis* et de *C. belli* est peu probable. Nous avons vérifié les

séquences de nos amorces et sondes sur NCBI et elles ne croisent pas entre elles. Malheureusement, il nous manque des échantillons positifs confirmés par microscopie afin de nous assurer de la spécificité de nos amorces et sondes. De plus, ces deux parasites ont la même distribution géographique. L'un des deux patients était également infecté par *Blastocystis* spp. Des cas de cyclospore ont déjà été décrits en Allemagne [197].

Enfin, nous n'avons détecté aucun patient atteint d'*Entamoeba histolytica* ou de *Balantidium coli* au cours de notre étude. Cela n'est pas surprenant car dans les pays industrialisés, les infections à *E. histolytica* sont rares et souvent liées aux voyages dans des régions endémiques [198]. Notons cependant la présence de voyageurs en pays à ressources limitées et de migrants dans notre cohorte. Des cas sporadiques et épidémiques de *B. coli* ont été décrits en Europe [25].

L'une des limites de cette étude épidémiologique est temporelle, étant réalisée au cours de 2 saisons rapprochées : l'hiver et le printemps. Elle ne reflète donc que très partiellement la saisonnalité des protozoaires étudiées. Il serait intéressant de la réaliser sur deux années consécutives afin d'avoir un réel aperçu de la saisonnalité de ces protozooses gastro-intestinales. Une autre limite de cette étude est spatiale : restreinte à Marseille, ville située au carrefour de la méditerranée, et dépendante d'un recrutement uniquement hospitalier, une étude multicentrique permettrait d'avoir une vision plus représentative de l'ensemble de la France métropolitaine. Enfin réalisée en 2017, elle repose sur la détection en parallèle de dix protozoaires gastro-intestinaux par qPCR singleplex. Avec l'avènement ces dix dernières années des PCR multiplex, et avec l'apparition de kits commerciaux détectant simultanément un vaste nombre de pathogènes digestifs [18–20,171], ce travail ne demande qu'à aboutir à des PCR multiplexes portées sur le diagnostic syndromique de pathologies gastro-intestinales. En effet, les kits actuels commerciaux qui ont en commun la détection de seulement trois parasites pathogènes *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. et *E. histolytica*, n'incluent pas la recherche

d'une partie des parasites détectés dans notre étude, notamment *Blastocystis* spp., *E. intestinalis* et *E. bienewisi*.

Enfin, avec les changements climatiques, les réservoirs des protozooses tendent à s'agrandir. Des modèles récents étudiant l'impact du réchauffement climatique sur l'environnement prédisent une augmentation de la fréquence et de l'intensité des précipitations en Europe [199,200]. L'impact de la modification des conditions environnementales, et particulièrement l'augmentation des précipitations a déjà démontré son implication dans l'augmentation de la transmission des maladies d'origine hydrique [201]. Il est donc nécessaire de collecter des données épidémiologiques récentes et fiables dans les pays industrialisés, et ce grâce aux outils moléculaires.

## CONCLUSION

Cette étude est la première étude épidémiologique prospective française, monocentrique, portant sur la détection moléculaire de parasites gastro-intestinaux, par qPCR. Elle apporte donc des informations primordiales sur la répartition des parasitoses digestives en France métropolitaine. Dans le cadre d'une étude préliminaire, la technique d'extraction semi automatisée, EZ1® (Qiagen), modifiée au sein de notre laboratoire, s'est révélée plus sensible que le kit manuel QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen), le plus retrouvé dans la littérature. Elle représente ainsi une méthode universelle d'extraction, simple d'utilisation, rapide et son extension au laboratoire de routine est à envisager.

Dans notre étude, le parasite majoritairement retrouvé est *Blastocystis* spp., suivi par *Dientamoeba fragilis* et *Giardia intestinalis*. Cela souligne l'intérêt, pour les cliniciens, de cibler ces protozoaires lors de diagnostic de diarrhées. Le développement de PCR multiplex regroupant ces trois parasites est à considérer. La recherche systématique de ces protozoaires par qPCR en association avec la microscopie lors d'examen parasitologique des selles permettrait d'éviter un sous-diagnostic. La réalisation d'une étude épidémiologique au niveau national, s'étendant sur au minimum une année, est à envisager afin d'avoir un aperçu de la prévalence parasitaire par région ainsi que de la saisonnalité de ces infections.

Enfin, la supériorité de la qPCR par rapport à la microscopie est à nouveau démontrée, en termes de spécificité, de sensibilité et de simplicité d'utilisation, nous conduisant à remettre en question ce gold standard actuel.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. World Health Organization. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases : A roadmap for implementation : Executive summary. (2012).
2. Becker, S. L. *et al.* Persistent digestive disorders in the tropics: causative infectious pathogens and reference diagnostic tests. *BMC Infect. Dis.* **13**, 37 (2013).
3. Lozano, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, (2012).
4. Newell, D. G. *et al.* Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* **139 Suppl 1**, S3-15 (2010).
5. Fletcher, S. M., Stark, D., Harkness, J. & Ellis, J. Enteric Protozoa in the Developed World: a Public Health Perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 420–449 (2012).
6. Hennessy, T. W. *et al.* Survey of physician diagnostic practices for patients with acute diarrhea: clinical and public health implications. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **38 Suppl 3**, S203-211 (2004).
7. Verweij, J. J. & Stensvold, C. R. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 371–418 (2014).
8. Wong, S. S. Y. *et al.* Molecular diagnosis in clinical parasitology: when and why? *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **239**, 1443–1460 (2014).
9. Sow, D. *et al.* Performance of Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of 20 Gastrointestinal Parasites in Clinical Samples from Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 173–182 (2017).
10. Mejia, R. *et al.* A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **88**, 1041–1047 (2013).

11. Nazeer, J. T. *et al.* Use of multiplex real-time PCR for detection of common diarrhea causing protozoan parasites in Egypt. *Parasitol. Res.* **112**, 595–601 (2013).
12. Klein, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol. Med.* **8**, 257–260 (2002).
13. Wilson, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3741–3751 (1997).
14. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. & Johne, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 1014–1026 (2012).
15. Incani, R. N. *et al.* Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. *Acta Trop.* **167**, 64–70 (2016).
16. Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S., Wallinga, J. A., Ruijs, G. J. H. M., Bruins, M. J. & Verweij, J. J. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 869–874 (2009).
17. Basuni, M. *et al.* A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **84**, 338–343 (2011).
18. Calderaro, A. *et al.* Contribution of the FilmArray® Gastrointestinal Panel in the laboratory diagnosis of gastroenteritis in a cohort of children: a two-year prospective study. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **308**, 514–521 (2018).
19. Stockmann, C. *et al.* Detection of 23 Gastrointestinal Pathogens Among Children Who Present With Diarrhea. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* **6**, 231–238 (2017).
20. Dirani, G. *et al.* Easyscreen™ Enteric Protozoa Assay For the Detection of Intestinal Parasites: A Retrospective Bi-Center Study. *J. Parasitol.* **105**, 58–63 (2019).
21. Singhal, N., Kumar, M. & Viridi, J. S. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. *Parasitology* **143**, 1491–1500 (2016).

22. Adl, S. M. *et al.* Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **66**, 4–119 (2019).
23. Swartzwelder, J. C. Balantidiasis. *Am. J. Dig. Dis.* **17**, 173–179 (1950).
24. McLeod, C., Smith, P., McGuinness, S. L., Francis, J. R. & Baird, R. W. Human case of *Balantidium* infection in Australia. *Pathology (Phila.)* **47**, 603–604 (2015).
25. Schuster, F. L. & Ramirez-Avila, L. Current world status of *Balantidium coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 626–638 (2008).
26. Karanis, P., Kourenti, C. & Smith, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J. Water Health* **5**, 1–38 (2007).
27. Yazar, S., Altuntas, F., Sahin, I. & Atambay, M. Dysentery caused by *Balantidium coli* in a patient with non-Hodgkin's lymphoma from Turkey. *World J. Gastroenterol.* **10**, 458–459 (2004).
28. Kaur, S. & Gupta, A. Urinary balantidiasis: A rare incidental finding in a patient with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Cytol.* **33**, 169–171 (2016).
29. Anargyrou, K. *et al.* Pulmonary *Balantidium coli* infection in a leukemic patient. *Am. J. Hematol.* **73**, 180–183 (2003).
30. Cakir, F., Cicek, M. & Yildirim, I. H. Determination the Subtypes of *Blastocystis* sp. and Evaluate the Effect of These Subtypes on Pathogenicity. *Acta Parasitol.* (2019). doi:10.2478/s11686-018-00002-y
31. El Safadi, D. *et al.* Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect. Dis.* **16**, 451 (2016).
32. Noël, C. *et al.* Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 348–355 (2005).
33. Andersen, L. O. & Stensvold, C. R. *Blastocystis* in Health and Disease: Are We Moving

- from a Clinical to a Public Health Perspective? *J. Clin. Microbiol.* **54**, 524–528 (2016).
34. Ajjampur, S. S. R. & Tan, K. S. W. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitol. Int.* **65**, 772–779 (2016).
  35. Tan, K. S. W. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 639–665 (2008).
  36. Forsell, J. *et al.* Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **31**, 1689–1696 (2012).
  37. Paulos, S. *et al.* Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses Public Health* **65**, 993–1002 (2018).
  38. Šlapeta, J. *Cryptosporidium*: Identification and Genetic Typing. *Curr. Protoc. Microbiol.* **44**, 20B.1.1-20B.1.17 (2017).
  39. Pedraza-Díaz, S., Amar, C., Iversen, A. M., Stanley, P. J. & McLauchlin, J. Unusual cryptosporidium species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* ‘dog type’ from patients in England. *J. Med. Microbiol.* **50**, 293–296 (2001).
  40. Leoni, F., Amar, C., Nichols, G., Pedraza-Díaz, S. & McLauchlin, J. Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *J. Med. Microbiol.* **55**, 703–707 (2006).
  41. Hunter, P. R. & Thompson, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1181–1190 (2005).
  42. Xiao, L. & Feng, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 309–323 (2008).
  43. Casemore, D. P., Sands, R. L. & Curry, A. *Cryptosporidium* species a ‘new’ human pathogen. *J. Clin. Pathol.* **38**, 1321–1336 (1985).
  44. Glaberman, S. *et al.* Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks,

Northern Ireland. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 631–633 (2002).

45. Guerrant, R. L. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 51–57 (1997).

46. Bouzid, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M. & Tyler, K. M. Cryptosporidium Pathogenicity and Virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 115–134 (2013).

47. Kramer, M. H. *et al.* First reported outbreak in the United States of cryptosporidiosis associated with a recreational lake. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **26**, 27–33 (1998).

48. MacKenzie, W. R. *et al.* Massive outbreak of waterborne cryptosporidium infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **21**, 57–62 (1995).

49. Egger, M., Mäusezahl, D., Odermatt, P., Marti, H. P. & Tanner, M. Symptoms and transmission of intestinal cryptosporidiosis. *Arch. Dis. Child.* **65**, 445–447 (1990).

50. Monis, P. T. & Thompson, R. C. A. Cryptosporidium and Giardia-zoonoses: fact or fiction? *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **3**, 233–244 (2003).

51. Xiao, L. & Fayer, R. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1239–1255 (2008).

52. Cacciò, S. M. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. *Parassitologia* **47**, 185–192 (2005).

53. Current, W. L. & Garcia, L. S. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 325–358 (1991).

54. Current, W. L. *et al.* Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N. Engl. J. Med.* **308**, 1252–1257 (1983).

55. Mmbaga, B. T. & Houpt, E. R. Cryptosporidium and Giardia Infections in Children: A

Review. *Pediatr. Clin. North Am.* **64**, 837–850 (2017).

56. Checkley, W. *et al.* Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in Peruvian children. *Am. J. Epidemiol.* **145**, 156–163 (1997).
57. Chalmers, R. M. & Davies, A. P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* **124**, 138–146 (2010).
58. Ortega, Y. R. & Sanchez, R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 218–234 (2010).
59. Aksoy, U. *et al.* First reported waterborne outbreak of cryptosporidiosis with *Cyclospora* co-infection in Turkey. *Wkly. Releases 1997–2007* **12**, 3142 (2007).
60. Rabold, J. G. *et al.* *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water. *Lancet Lond. Engl.* **344**, 1360–1361 (1994).
61. Mead, P. S. *et al.* Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 607–625 (1999).
62. Fleming, C. A., Caron, D., Gunn, J. E. & Barry, M. A. A foodborne outbreak of *Cyclospora cayetanensis* at a wedding: clinical features and risk factors for illness. *Arch. Intern. Med.* **158**, 1121–1125 (1998).
63. Herwaldt, B. L. & Ackers, M. L. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. The *Cyclospora* Working Group. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1548–1556 (1997).
64. Paschke, C. *et al.* Controlled study on enteropathogens in travellers returning from the tropics with and without diarrhoea. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**, 1194–1200 (2011).
65. García-López, H. L., Rodríguez-Tovar, L. E. & Medina-De la Garza, C. E. Identification of *Cyclospora* in poultry. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 356–357 (1996).
66. Zerpa, R., Uchima, N. & Huicho, L. *Cyclospora cayetanensis* associated with watery diarrhoea in Peruvian patients. *J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 325–329 (1995).

67. Yai, L. E., Bauab, A. R., Hirschfeld, M. P., de Oliveira, M. L. & Damaceno, J. T. The first two cases of Cyclospora in dogs, São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **39**, 177–179 (1997).
68. Ortega, Y. R. *et al.* Pathologic and clinical findings in patients with cyclosporiasis and a description of intracellular parasite life-cycle stages. *J. Infect. Dis.* **176**, 1584–1589 (1997).
69. Shlim, D. R. *et al.* An alga-like organism associated with an outbreak of prolonged diarrhea among foreigners in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 383–389 (1991).
70. Sifuentes-Osornio, J. *et al.* Cyclospora cayetanensis infection in patients with and without AIDS: biliary disease as another clinical manifestation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **21**, 1092–1097 (1995).
71. de Górgolas, M., Fortés, J. & Fernández Guerrero, M. L. Cyclospora cayetanensis Cholecystitis in a patient with AIDS. *Ann. Intern. Med.* **134**, 166 (2001).
72. Richardson, R. F., Remler, B. F., Katirji, B. & Murad, M. H. Guillain-Barré syndrome after Cyclospora infection. *Muscle Nerve* **21**, 669–671 (1998).
73. Connor, B. A., Johnson, E. J. & Soave, R. Reiter syndrome following protracted symptoms of Cyclospora infection. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 453–454 (2001).
74. Lindsay, D. S., Dubey, J. P. & Blagburn, B. L. Biology of Isospora spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 19–34 (1997).
75. Pozio, E. Foodborne and waterborne parasites. *Acta Microbiol. Pol.* **52 Suppl**, 83–96 (2003).
76. Legua, P. & Seas, C. Cystoisospora and cyclospora. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **26**, 479–483 (2013).
77. Ghoshal, U. *et al.* Identification of opportunistic enteric parasites among immunocompetent patients with diarrhoea from Northern India and genetic characterisation of Cryptosporidium and Microsporidia. *Indian J. Med. Microbiol.* **34**, 60–66 (2016).
78. Noor, M. *et al.* Unexpectedly High Prevalence of Cystoisospora belli Infection in

Acalculous Gallbladders of Immunocompetent Patients. *Am. J. Clin. Pathol.* **151**, 100–107 (2019).

79. Takahashi, H., Falk, G. A., Cruise, M. & Morris-Stiff, G. Chronic cholecystitis with *Cystoisospora belli* in an immunocompetent patient. *BMJ Case Rep.* **2015**, (2015).

80. Marathe, A. & Parikh, K. Severe diarrhoea due to *Cystoisospora belli* in renal transplant patient on immunosuppressive drugs. *Indian J. Med. Microbiol.* **31**, 185–187 (2013).

81. Post, L. *et al.* Uncommon and fatal case of cystoisosporiasis in a non HIV-immunosuppressed patient from a non-endemic country. *Parasitol. Int.* **67**, 1–3 (2018).

82. Walther, Z. & Topazian, M. D. Isospora cholangiopathy: case study with histologic characterization and molecular confirmation. *Hum. Pathol.* **40**, 1342–1346 (2009).

83. Farman, J. *et al.* AIDS-related cholangiopancreatographic changes. *Abdom. Imaging* **19**, 417–422 (1994).

84. Ud Din, N. *et al.* Severe Isospora (*Cystoisospora*) *belli* Diarrhea Preceding the Diagnosis of Human T-Cell-Leukemia-Virus-1-Associated T-Cell Lymphoma. *Case Rep. Infect. Dis.* **2012**, 640104 (2012).

85. SHAFIEI, R., NAJJARI, M., KARGAR KHEIRABAD, A. & HATAM, G. Severe Diarrhea Due To *Cystoisospora belli* Infection in an HTLV-1 Woman. *Iran. J. Parasitol.* **11**, 121–125 (2016).

86. Jepps, M. W. & Dobell, C. *Dientamoeba fragilis* n. g., n. sp., a new Intestinal Amoeba from Man. *Parasitology* **10**, 352–367 (1918).

87. Stark, D., Barratt, J., Chan, D. & Ellis, J. T. *Dientamoeba fragilis*, the Neglected Trichomonad of the Human Bowel. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 553–580 (2016).

88. Barratt, J. L. N., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T. & Stark, D. The ambiguous life of *Dientamoeba fragilis*: the need to investigate current hypotheses on transmission. *Parasitology* **138**, 557–572 (2011).

89. Stark, D. J., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. T. & Harkness, J. *Dientamoebiasis*: clinical

importance and recent advances. *Trends Parasitol.* **22**, 92–96 (2006).

90. Munasinghe, V. S., Vella, N. G. F., Ellis, J. T., Windsor, P. A. & 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.* **43**, 879–883 (2013).
91. Stark, D. *et al.* Description of *Dientamoeba fragilis* Cyst and Precystic Forms from Human Samples. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2680–2683 (2014).
92. Cacciò, S. M. Molecular epidemiology of *Dientamoeba fragilis*. *Acta Trop.* **184**, 73–77 (2018).
93. Cacciò, S. M. *et al.* Pigs as Natural Hosts of *Dientamoeba fragilis* Genotypes Found in Humans. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 838–841 (2012).
94. Chan, D. *et al.* Detection of *Dientamoeba fragilis* in animal faeces using species specific real time PCR assay. *Vet. Parasitol.* **227**, 42–47 (2016).
95. Stark, D. *et al.* Gorillas are a host for *Dientamoeba fragilis*: an update on the life cycle and host distribution. *Vet. Parasitol.* **151**, 21–26 (2008).
96. Fletcher, S. *et al.* Epidemiology and geographical distribution of enteric protozoan infections in sydney, australia. *J. Public Health Res.* **3**, 298 (2014).
97. Ögren, J. *et al.* *Dientamoeba fragilis* prevalence coincides with gastrointestinal symptoms in children less than 11 years old in Sweden. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **34**, 1995–1998 (2015).
98. Barratt, J. L., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T. & Stark, D. 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).
99. Stark, D. *et al.* A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 614–619 (2010).
100. Jong, M. J. de *et al.* *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: a case–control study. *Arch. Dis. Child.* **99**, 1109–1113 (2014).

101. Holtman, G. A. *et al.* Dientamoeba fragilis colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. *Fam. Pract.* **34**, 25–29 (2017).
102. Jokelainen, P. *et al.* Dientamoeba fragilis, a Commensal in Children in Danish Day Care Centers. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1707–1713 (2017).
103. Röser, D. *et al.* Metronidazole therapy for treating dientamoebiasis in children is not associated with better clinical outcomes: a randomized, double-blinded and placebo-controlled clinical trial. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **58**, 1692–1699 (2014).
104. Espinosa-Cantellano, M. & Martínez-Palomo, A. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 318–331 (2000).
105. Saidin, S., Othman, N. & Noordin, R. Update on laboratory diagnosis of amoebiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **38**, 15–38 (2019).
106. Rivero, L. R., Fernández, F. A. N. & Robertson, L. J. Cuban parasitology in review: a revolutionary triumph. *Trends Parasitol.* **24**, 440–448 (2008).
107. Hung, C.-C. *et al.* Increased risk for Entamoeba histolytica infection and invasive amebiasis in HIV seropositive men who have sex with men in Taiwan. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**, e175 (2008).
108. Ralston, K. S. & Petri, W. A. Tissue destruction and invasion by Entamoeba histolytica. *Trends Parasitol.* **27**, 254–263 (2011).
109. Eichinger, D. Encystation of entamoeba parasites. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **19**, 633–639 (1997).
110. Walsh, J. A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 228–238 (1986).
111. Fotedar, R. *et al.* Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. *Clin Microbiol Rev* **20**, (2007).
112. Petri, W. A. & Singh, U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **29**, 1117–1125 (1999).

113. Haque, R., Huston, C. D., Hughes, M., Houpt, E. & Petri, W. A. Amebiasis. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1565–1573 (2003).
114. Cheepsattayakorn, A. & Cheepsattayakorn, R. Parasitic pneumonia and lung involvement. *BioMed Res. Int.* **2014**, 874021 (2014).
115. Kotler, D. P. & Orenstein, J. M. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Adv. Parasitol.* **40**, 321–349 (1998).
116. Han, B. & Weiss, L. M. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017).
117. Sapir, A. *et al.* Microsporidia-nematode associations in methane seeps reveal basal fungal parasitism in the deep sea. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
118. Favet, J. *et al.* Microbial hitchhikers on intercontinental dust: catching a lift in Chad. *ISME J.* **7**, 850–867 (2013).
119. Franzen, C. Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends Parasitol.* **20**, 275–279 (2004).
120. Mathis, A., Weber, R. & Deplazes, P. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 423–445 (2005).
121. Sak, B. *et al.* Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1064–1070 (2011).
122. Nagpal, A. *et al.* Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient: case report and review of the literature. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* **15**, 526–532 (2013).
123. Cernikova, L., Faso, C. & Hehl, A. B. Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* **14**, (2018).
124. Ryan, U. & Cacciò, S. M. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* **43**, 943–956 (2013).
125. Efstratiou, A., Ongerth, J. E. & Karanis, P. Waterborne transmission of protozoan

- parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Res.* **114**, 14–22 (2017).
126. Adam, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 447–475 (2001).
127. Painter, J. E., Gargano, J. W., Collier, S. A., Yoder, J. S. & Centers for Disease Control and Prevention. Giardiasis surveillance -- United States, 2011-2012. *MMWR Suppl.* **64**, 15–25 (2015).
128. Tejman-Yarden, N. & Eckmann, L. New approaches to the treatment of giardiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 451–456 (2011).
129. Einarsson, E., Ma'ayeh, S. & Svärd, S. G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 47–52 (2016).
130. Bartelt, L. A. & Sartor, R. B. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Rep.* **7**, (2015).
131. McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu-Cohen, R., Couturier, M. R. & Humphries, R. M. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 712–720 (2014).
132. Hiatt, R. A., Markell, E. K. & Ng, E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**, 36–39 (1995).
133. Bogoch, I. I., Raso, G., N'Goran, E. K., Marti, H. P. & Utzinger, J. Differences in microscopic diagnosis of helminths and intestinal protozoa among diagnostic centres. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **25**, 344–347 (2006).
134. Lewis, S. J. & Heaton, K. W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**, 920–924 (1997).
135. WHO | Basic laboratory methods in medical parasitology (archived). *WHO* Available at: [https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241544104\\_part1/en/](https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241544104_part1/en/). (Accessed: 24th March 2019)
136. Baxby, D., Blundell, N. & Hart, C. A. The development and performance of a simple,

sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J. Hyg. (Lond.)* **93**, 317–323 (1984).

137. Patil, K., De, A. & Mathur, M. Comparison of Weber Green and Ryan Blue modified trichrome staining for the diagnosis of microsporidial spores from stool samples of HIV-positive patients with diarrhoea. *Indian J. Med. Microbiol.* **26**, 407 (2008).

138. Van den Bossche, D., Cnops, L., Verschueren, J. & Van Esbroeck, M. Comparison of four rapid diagnostic tests, ELISA, microscopy and PCR for the detection of *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. and *Entamoeba histolytica* in feces. *J. Microbiol. Methods* **110**, 78–84 (2015).

139. Ryan, U., Paparini, A. & Oskam, C. New Technologies for Detection of Enteric Parasites. *Trends Parasitol.* **33**, 532–546 (2017).

140. Zagloul, D. A. M., Mohamed, A., Khodari, Y. A. W. & Farooq, M. U. Crypto-Giardia antigen rapid test versus conventional modified Ziehl-Neelsen acid fast staining method for diagnosis of cryptosporidiosis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **6**, 212–215 (2013).

141. Weitzel, T., Dittrich, S., Möhl, I., Adusu, E. & Jelinek, T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**, 656–659 (2006).

142. Agnamey, P. *et al.* Evaluation of Four Commercial Rapid Immunochromatographic Assays for Detection of *Cryptosporidium* Antigens in Stool Samples: a Blind Multicenter Trial. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1605–1607 (2011).

143. Becker, S. L. *et al.* PCR-based verification of positive rapid diagnostic tests for intestinal protozoa infections with variable test band intensity. *Acta Trop.* **174**, 49–55 (2017).

144. Oster, N. *et al.* Evaluation of the immunochromatographic CORIS *Giardia*-Strip test for rapid diagnosis of *Giardia lamblia*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **25**, 112–115 (2006).

145. Minak, J. *et al.* Evaluation of Rapid Antigen Point-of-Care Tests for Detection of

Giardia and Cryptosporidium Species in Human Fecal Specimens. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 154–156 (2012).

146. Johnston, S. P., Ballard, M. M., Beach, M. J., Causer, L. & Wilkins, P. P. Evaluation of three commercial assays for detection of Giardia and Cryptosporidium organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 623–626 (2003).

147. Sadaka, H. A., Gaafar, M. R., Mady, R. F. & Hezema, N. N. Evaluation of ImmunoCard STAT test and ELISA versus light microscopy in diagnosis of giardiasis and cryptosporidiosis. *Parasitol. Res.* **114**, 2853–2863 (2015).

148. Bouyou-Akotet, M. K. *et al.* Low sensitivity of the ImmunocardSTAT® Crypto/Giardia Rapid Assay test for the detection of Giardia and Cryptosporidium in fecal samples from children living in Libreville, Central Africa. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* **40**, 1179–1183 (2016).

149. Shimelis, T. & Tadesse, E. Performance evaluation of point-of-care test for detection of Cryptosporidium stool antigen in children and HIV infected adults. *Parasit. Vectors* **7**, 227 (2014).

150. Korpe, P. S. *et al.* Evaluation of a Rapid Point-of-Care Fecal Antigen Detection Test for Entamoeba histolytica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 980–981 (2012).

151. Verkerke, H. P. *et al.* Multisite Clinical Evaluation of a Rapid Test for Entamoeba histolytica in Stool. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 493–497 (2015).

152. Calderaro, A. *et al.* Diagnostic performances of antigen detection compared to conventional and nucleic acid detection of Entamoeba histolytica in a non-endemic setting. *New Microbiol.* **39**, 153–155 (2016).

153. Alexander, C. L., Niebel, M. & Jones, B. The rapid detection of Cryptosporidium and Giardia species in clinical stools using the Quik Chek immunoassay. *Parasitol. Int.* **62**, 552–553 (2013).

154. Nooshadokht, M. *et al.* Stool antigen immunodetection for diagnosis of Giardia

duodenalis infection in human subjects with HIV and cancer. *J. Microbiol. Methods* **141**, 35–41 (2017).

155. Stark, D. *et al.* Comparison of Stool Antigen Detection Kits to PCR for Diagnosis of Amebiasis. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1678–1681 (2008).

156. El-Moamly, A. A.-R. & El-Sweify, M. A. ImmunoCard STAT! cartridge antigen detection assay compared to microplate enzyme immunoassay and modified Kinyoun's acid-fast staining technique for detection of *Cryptosporidium* in fecal specimens. *Parasitol. Res.* **110**, 1037–1041 (2012).

157. Vidal, A. M. B. & Catapani, W. R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. *Sao Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* **123**, 282–285 (2005).

158. Garcia, L. S. & Shimizu, R. Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1526–1529 (1997).

159. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–273 (1986).

160. Freeman, W. M., Walker, S. J. & Vrana, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* **26**, 112–122, 124–125 (1999).

161. Gibson, U. E., Heid, C. A. & Williams, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**, 995–1001 (1996).

162. ten Hove, R.-J., van Lieshout, L., Brienens, E. A. T., Perez, M. A. & Verweij, J. J. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Isospora belli* in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **61**, 280–283 (2008).

163. Garcés-Sánchez, G., Wilderer, P. A., Munch, J. C., Horn, H. & Leubhn, M. Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples.

*Water Res.* **43**, 2669–2678 (2009).

164. Verweij, J. J. *et al.* Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* **42**, (2004).

165. ten Hove, R. *et al.* Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 1001–1007 (2007).

166. ten Hove, R. J. *et al.* Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**, (2009).

167. Lee, S.-H. *et al.* Multiplex PCR Detection of Waterborne Intestinal Protozoa: Microsporidia, Cyclospora, and *Cryptosporidium*. *Korean J. Parasitol.* **48**, 297–301 (2010).

168. Stark, D. *et al.* Evaluation of multiplex tandem real-time PCR for detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in clinical stool samples. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 257–262 (2011).

169. Taniuchi, M. *et al.* Multiplex PCR method to detect Cyclospora, Cystoisospora, and Microsporidia in stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **71**, 386–390 (2011).

170. Maas, L. *et al.* Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 545–550 (2014).

171. Yoo, J. *et al.* Comparative Evaluation of Seegene Allplex Gastrointestinal, Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel, and BD MAX Enteric Assays for Detection of Gastrointestinal Pathogens in Clinical Stool Specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* (2019). doi:10.5858/arpa.2018-0002-OA

172. Oikarinen, S. *et al.* PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **44**, 211–214 (2009).

173. Barrett, R. A. & Alexander, M. Resistance of Cysts of Amoebae to Microbial

Decomposition. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 670–674 (1977).

174. Bowers, B. & Korn, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain).

II. Encystment. *J. Cell Biol.* **41**, 786–805 (1969).

175. Babaei, Z., Oormazdi, H., Rezaie, S., Rezaeian, M. & Razmjou, E. Giardia intestinalis: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp. Parasitol.* **128**, 159–162 (2011).

176. Zimmermann, A., Lüthy, J. & Pauli, U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Z. Für Leb. -Forsch. A* **207**, 81–90 (1998).

177. Elwin, K., Fairclough, H. V., Hadfield, S. J. & Chalmers, R. M. Giardia duodenalis typing from stools: a comparison of three approaches to extracting DNA, and validation of a probe-based real-time PCR typing assay. *J. Med. Microbiol.* **63**, 38–44 (2014).

178. Efunshile, M. A. *et al.* Molecular Detection of the Carriage Rate of Four Intestinal Protozoa with Real-Time Polymerase Chain Reaction: Possible Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* in Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 257–262 (2015).

179. Kuk, S., Yazar, S. & Cetinkaya, U. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **107**, 965–968 (2012).

180. Paulos, S. *et al.* Evaluation of five commercial methods for the extraction and purification of DNA from human faecal samples for downstream molecular detection of the enteric protozoan parasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba* spp. *J. Microbiol. Methods* **127**, 68–73 (2016).

181. Mary, C. *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.* **51**, 2556–2563 (2013).

182. Yoshikawa, H. *et al.* Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol. Res.* **109**, 1045–1050 (2011).

183. Nagamine, K., Hase, T. & Notomi, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal

amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* **16**, 223–229 (2002).

184. Hartmeyer, G. N., Hoegh, S. V., Skov, M. N. & Kemp, M. Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Resource-Saving Strategy for Primary Malaria Screening in a Non-Endemic Setting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **100**, 566–571 (2019).

185. Tambo, M., Mwinga, M. & Mumbengegwi, D. R. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and Polymerase Chain Reaction (PCR) as quality assurance tools for Rapid Diagnostic Test (RDT) malaria diagnosis in Northern Namibia. *PloS One* **13**, e0206848 (2018).

186. Huang, C. *et al.* Exploration of fluorescence-based real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Isospora suis* oocysts. *Exp. Parasitol.* **165**, 1–6 (2016).

187. Arimatsu, Y., Kaewkes, S., Laha, T., Hong, S.-J. & Sripa, B. Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* copro-DNA using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitol. Int.* **61**, 178–182 (2012).

188. Calderaro, A. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry for the detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *PloS One* **10**, e0122448 (2015).

189. Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A. & Stensvold, C. R. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv. Parasitol.* **82**, 1–32 (2013).

190. Bart, A. *et al.* Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect. Dis.* **13**, 389 (2013).

191. Souppart, L. *et al.* Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitol. Res.* **105**, 413–421 (2009).

192. Garcia, L. S. *Dientamoeba fragilis*, One of the Neglected Intestinal Protozoa. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2243–2250 (2016).

193. Fournet, N. *et al.* Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. *Euro Surveill.*

*Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **18**, (2013).

194. Gupta, S., Narang, S., Nunavath, V. & Singh, S. Chronic diarrhoea in HIV patients: prevalence of coccidian parasites. *Indian J. Med. Microbiol.* **26**, 172–175 (2008).

195. Beaudreau, P. *et al.* Lessons learned from ten investigations of waterborne gastroenteritis outbreaks, France, 1998-2006. *J. Water Health* **6**, 491–503 (2008).

196. Bednarska, M. *et al.* Occurrence of intestinal microsporidia in immunodeficient patients in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM* **21**, 244–248 (2014).

197. Döllner, P. C. *et al.* Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 992–994 (2002).

198. Vreden, S. G. *et al.* Outbreak of amebiasis in a family in The Netherlands. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **31**, 1101–1104 (2000).

199. Christensen, J. H. & Christensen, O. B. Climate modelling: Severe summertime flooding in Europe. *Nature* **421**, 805–806 (2003).

200. Heavy precipitation. *European Environment Agency* Available at: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/precipitation-extremes-in-europe-3/assessment>. (Accessed: 12th May 2019)

201. Harper, S. L., Edge, V. L., Schuster-Wallace, C. J., Berke, O. & McEwen, S. A. Weather, water quality and infectious gastrointestinal illness in two Inuit communities in Nunatsiavut, Canada: potential implications for climate change. *EcoHealth* **8**, 93–108 (2011).

## *SERMENT DE GALIEN*

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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



## Résumé de l'article

Il existe peu de données épidémiologiques récentes sur les infections parasitaires intestinales chez l'Homme en France. Nous avons mené une étude prospective visant à estimer la prévalence de dix protozoaires entériques au CHU de La Timone à Marseille, France, à l'aide d'un diagnostic basé sur la détection de l'ADN de ces parasites par la PCR en temps réel. Un total de 643 prélèvements de selles, provenant de 488 patients, adressées au laboratoire de parasitologie-mycologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Marseille sur une période de 6 mois a été inclus. La moyenne d'âge des patients était de 44 ans (intervalle : 0 – 97 ans).

En amont de cette étude nous avons comparé le kit manuel le plus représenté dans la littérature QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) avec une technique semi automatisée alliant prétraitement mécanique, chimique, enzymatique et extraction automatisée par EZ1® (Qiagen). A l'issue de cette étude préliminaire, nous avons choisi d'extraire L'ADN en utilisant la méthode semi-automatisée EZ1® (Qiagen). Les parasites d'intérêt ont été détectés à l'aide de PCR « singleplex » quantitatives (qPCR). Le choix des amorces pour chaque protozoaire a été réalisé à partir d'une recherche bibliographique dans pubmed. Pour les échantillons positifs, le sous-type *Blastocystis* a été déterminé par analyse de séquence.

Au cours de l'étude, la prévalence globale des protozoaires entériques était de 17%. *Blastocystis* spp. a été l'espèce la plus fréquente (10,5%), suivie par *Dientamoeba fragilis* (2,3%) et *Giardia intestinalis* (2,3%). La prévalence des autres protozoaires était inférieure à 1% chacun. Pour *Blastocystis* spp. les sous types (ST) retrouvés ont été les suivants : le sous-type 3 (ST3) prédominant (43,6%) et les autres sous-types ST1, ST2, ST4 et ST6.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'un diagnostic basé sur la qPCR est utilisé pour étudier la prévalence de dix protozoaires entériques dans un hôpital universitaire français.