

Sélection des échantillons

Pour chercher à évaluer les performances diagnostiques du Novodiag® Stool Parasite, nous avons recueillis des données de manières rétrospectives. Depuis l'année 2019, tous les échantillons de selles positifs pour au moins un parasite intestinal diagnostiqués au laboratoire ont été pris en compte dans notre recueil. Ce diagnostic a été établi soit par technique moléculaire (PCR routine simplex et/ou BioFire), soit par examen direct au microscope optique, soit par sérologie, soit des demandes associées à un contexte épidémiologique et clinique favorable. Nous avons également inclus des positifs en prospectif, dès lors qu'un nouveau cas positif était mis en évidence dans le cadre du diagnostic de routine du laboratoire. Une fois les patients sélectionnés, tout le panel disponible en PCR routine (Annexe 4) a été réalisé sur les échantillons : les patients sont classés dans le groupe « tests ».

Pour constituer le groupe témoin négatif de notre étude, dix échantillons de selles provenant de donneurs de greffe fécale ont été inclus. La transplantation de microbiote fécal est encadrée par des recommandations nationales émanant de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM)⁶⁰. Une sélection rigoureuse des donneurs est indispensable, elle s'effectue via un questionnaire et un entretien médical. Les patients ne doivent pas présenter de facteurs de risque d'être atteints de parasitoses intestinales (absence de voyage, personnes non migrantes, absence d'hyperéosinophilie sur le bilan biologique, absence de signes clinique évocateurs) (Annexe 5). De plus, un dépistage d'agents infectieux est réalisé dans le sang et dans les selles (Annexe 6).

Tous les échantillons ont été conservés dans des aliquots congelés à – 80°C ou alors directement à partir du pot stérile primaire dans un congélateur à – 20°C.

Le jour de l'analyse par le kit NovoDiag® Stool Parasite, les selles ont été décongelées pour analyse *de novo* en test PCR routine (comportant extraction d'ADN et PCR proprement dite) en parallèle au test NovoDiag® Stool Parasite.

Au final nous avons dix patients appartenant au groupe « témoins négatifs » et vingt-six patients appartenant au groupe « tests ».

⁶⁰ ANSM, « La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques », s. d.

II. Fonctionnement général du test NovoDiag® Stool Parasite

Novodiag® Stool Parasites est un test de diagnostic moléculaire *in vitro* qualitatif et automatisé permettant de détecter la présence de marqueurs d'acides nucléiques de trente pathogènes parasitaires et fongiques intestinaux: protozoaires, helminthes et microsporidies les plus courants dans les échantillons de selles. En combinant les technologies de PCR en temps réel et de puces à ADN, Novodiag® Stool Parasite permet l'analyse directe de l'échantillon d'un patient placé dans une cartouche à usage unique, pour un dépistage complet de pathogènes multiples. Vingt-six cibles sont analysées dans un même run. Les résultats sont exprimés de manière qualitative (positif ou négatif) pour chaque parasite. Il présente également l'avantage d'être relativement facile d'utilisation, et ne nécessite pas l'intervention d'un opérateur expérimenté.

III. Protocole d'analyse NOVODIAG® Stool Parasite

Il a été établi par le fournisseur.

Tout d'abord, la première étape consiste à prélever un échantillon de selle à l'aide d'un écouvillon. Cinq endroits différents ont été prélevés au sein d'un même échantillon, dans le but d'avoir une prise d'essai la plus homogène possible afin de pouvoir gagner en sensibilité (en raison du faible nombre de parasites présent dans certains cas).

Ensuite, l'écouvillon a été placé dans le milieu de transport fourni puis vortexé durant une dizaine de secondes. La totalité du contenu a ensuite été transféré dans un tube stérile contenant des billes en céramique, lui aussi fourni par Novodiag® Stool Parasite, puis placé dans un automate de type FastPrep, pour une durée de 90 secondes à 7 000 tours/min.

Enfin, 600 microlitres de solution finale ont été prélevés pour être déposés directement dans la cassette Novodiag® Stool Parasite.

A noter que le jour de décongélation de la selle pour l'analyse, un échantillon a été envoyé en parallèle pour réaliser une nouvelle extraction de matériel génétique en routine. Cela a permis de s'affranchir du « biais de congélation/décongélation », et ainsi éviter un faux négatif

IV. PCR simplex routine

Un nouvel extrait d'ADN (différent de celui utilisé lors du diagnostic positif) a été obtenu pour chacune des selles passées dans le Novodiag® Stool Parasite. Les extraits d'ADN sont obtenus après un passage dans le FastPrep suivi d'une extraction NucliSens® easyMAG™ selon les recommandations du fournisseur.

Ensuite, nous avons réalisé un ensemble de PCR simplex sur ces nouveaux extraits.

L'ensemble des PCR dont nous disposons au laboratoire sont listés dans l'Annexe 4

Les systèmes PCR ainsi que le tableau de préparation des différents mix sont listés dans les Annexes 7 et 8.

V. Caractéristiques de la population test (annexe 9)

Différentes données relatives aux vingt-six patients étudiés ont pu être recensés grâce à un recueil des données clinico-biologiques sur les logiciels NextLab et Axigate.

Vingt-six patients ont fait partie de la cohorte d'étude. La répartition homme/femme était de dix-sept hommes et neuf femmes, ce qui correspond à un sex-ratio de 1.9.

Concernant les services cliniques d'origine des malades, trois proviennent du service d'accueil des urgences, dix malades ont été pris en charge par les consultations/hospitalisation de l'IHU et trois autres étaient hospitalisés en réanimation/soins intensifs. Parmi les autres services cliniques, les patients étaient admis en chirurgie pédiatrique (n= 1), en hématologie pédiatrique (n= 1), en gériatrie (n= 1), en neurologie (n= 1), en chirurgie générale (n= 2), en unité COVID-19 (n= 2). Deux patients provenaient d'un établissement extérieur à l'Assistance publique des hôpitaux de Marseille (AP-HM).

Cliniquement, neuf personnes ont présenté un tableau de diarrhées, quatre ont présenté des symptômes de type nausées et/ou vomissements.

Aucune information clinique n'a pu être récupérée pour six personnes.

Concernant le statut immunodépression, cinq patients sont immunodéprimés: quatre transplantés (3 transplantations rénale et 1 transplantation hépatique) et un patient au stade sida. Seize patients sont sans immunodépression et cinq pour lesquels les données sont manquantes.

En ce qui concerne le reste du bilan biologique, sept présentaient une hyperéosinophilie (de $0.7-1.9 \times 10^9/\text{G/L}$), treize absence d'hyperéosinophilie, six données manquantes.

La notion de pays d'origine, de retour de voyage a systématiquement été recherchée dans le recueil de données. Seize patients n'ont pas de notion de voyage dans leur dossier.

Trois personnes ont une histoire de voyage, le patient 11 au Laos, le patient 31 au Soudan et le patient 33 en Angola.

Quatre personnes expatriées, le patient 18 originaire de Bosnie, le patient 19 originaire des Comores, le patient 22 originaire d'Algérie et le patient 32 originaire de Thaïlande ont été inclus dans l'étude.

Deux patients sont originaires d'Outre-Mer (patient 17 et patient 30).

Le patient 13 est un migrant provenant d'Ethiopie, arrivé en France en 2017 après un passage par le Soudan, la Libye et l'Italie.

PARTIE 3 :

Résultats

PARTIE 3 : Résultats

Au final trente-six échantillons ont été analysés par PCR multiplex NovoDiag® Stool Parasite, dix témoins négatifs et vingt-six patients tests.

Les résultats par parasites recherchés par le système NovoDiag® sont détaillés individuellement ci-dessous et résumé dans le tableau 2.

I. Ascaris lumbricoides

Une selle positive à *Ascaris lumbricoides*, après examen direct microscopique a été incluse dans notre étude, correspondant au patient 18. La PCR NovoDiag® Stool Parasite a confirmé le résultat obtenu, tout comme notre PCR routine. L'histoire clinique est celle d'un enfant de 3 ans originaire de Bosnie adressé aux Urgences de la Timone, car sa maman a retiré un ver blanc rosé de la narine gauche. Les EPS ultérieures ont mis en évidence les œufs d'*A. lumbricoïdes*.

II. Blastocystis spp.

Au total, trois échantillons positifs (patients 19, 26 et 27) ont été retenus après examen parasitologique des selles. Ces trois échantillons ont été confirmés positifs par le NovoDiag® Stool Parasite.

Sur nos trente-six échantillons le NovoDiag® Stool Parasite est revenu positif à *Blastocystis spp.*, pour quatorze patients dont deux du groupe témoins négatifs. Parmi ces positifs (n=14), nous retrouvons sept cas de co-infection : *Dientamoeba fragilis* (n=5), *Giardia intestinalis* (n=1), et un à *Taenia saginata/asiatica* ET à *Schistosoma mansoni*.

Tous les patients positifs à *Blastocystis spp.* au NovoDiag® Stool Parasite (n = 14) ont été confirmés positifs par notre PCR routine.

III. Cryptosporidium spp

Nous n'avions qu'un seul patient positif à *Cryptosporidium spp* (confirmation de l'espèce : *C. parvum*) par PCR routine, qui a été retrouvé positif par le NovoDiag® Stool Parasite (patient 24). Ce cas correspond à un patient au stade sida (250 CD4/mm³) qui avait présenté des diarrhées profuses.

IV. *Entamoeba histolytica*

En ce qui concerne *E. histolytica*, les résultats sont plus contrastés.

Cinq échantillons positifs par PCR routine ont été inclus (patients 14,21, 32, 33,34). Parmi eux, quatre étaient également positifs à l'examen direct, avec présence de formes kystiques pour les trois échantillons, et présence de formes kystique et végétative pour un échantillon (patient 14). Seul l'échantillon 32 avait un examen direct négatif, le diagnostic avait été réalisé par la PCR routine.

Aucun de ces cinq échantillons n'a été confirmé par le kit NovoDiag® Stool Parasite. La PCR routine réalisée sur le nouvel extrait d'ADN contemporain au test NovoDiag® Stool Parasite est bien revenue positive pour les cinq échantillons. Nous pouvons écarter la cause d'une mauvaise conservation de l'échantillon.

Pour les patients 14, 32, 33 et 34, *Blastocystis spp* a été détecté par le kit NovoDiag® Stool Parasite et confirmé par notre PCR routine. L'examen direct était négatif.

Les patients 32 et 33 ont été rendu positifs à *Dientamoeba fragilis* par le kit NovoDiag® Stool Parasite et également confirmé par notre PCR routine. L'examen direct était négatif.

V. *Microsporidies /Enterocytozoon bienewisi*

Un échantillon positif par PCR routine a été retrouvé par le NovoDiag® Stool Parasite (patient 28). Ce cas correspond à un patient greffé rénal qui avait présenté des diarrhées liquidiennes persistantes sans autres étiologies retrouvées.

VI. *Giardia intestinalis*

Huit prélèvements ont été inclus. Quatre ont été diagnostiqués par PCR routine et quatre par PCR multiplex par le kit Gastrointestinal Panel FilmArray® du BioFire. L'EPS a pu être réalisé sur sept de ces échantillons : six étaient positifs (kystes ± formes végétatives), dont un cas de co-infection avec *blastocystis spp*. L'examen direct négatif (patient 31) : la PCR routine était positive tardivement, pouvant expliquer l'examen direct négatif.

Après analyse dans le NovoDiag® Stool Parasite, sept échantillons sur huit ont détectés la présence de *Giardia intestinalis*. Le négatif NovoDiag® Stool Parasite correspond au patient 19 avec un examen direct et un Gastrointestinal Panel FilmArray® BioFire positifs.

VII. *Schistosoma mansoni*

Un cas de *Schistosoma mansoni* a été inclus dans l'étude, après un examen direct positif et confirmé par notre PCR routine (patient 13). Ce patient migrant est originaire d'Ethiopie, arrivé en France en 2017 après un passage par le Soudan et la Libye. Il présentait des douleurs épigastriques et une légère hyperéosinophilie (0.84 Giga/L).

Cet échantillon était positif avec le NovoDiag® Stool Parasite

VIII. *Schistosoma spp*

Aucun patient inclus ne présentait d'infection à *Schistosoma* autre que *S. mansoni*. Le patient 22 est revenu positif en NovoDiag® Stool Parasite pour cette cible. Ce patient présentait un kyste hydatique hépatique pour lequel la ponction à visée thérapeutique avait ramené un liquide avec la présence de scolex typique d'*Echinococcus granulosus*, confirmé par la PCR routine. Nous l'avions inclus pour tester une éventuelle réaction croisée.

IX. *Strongyloides stercoralis*

Deux cas de *Strongyloides stercoralis* ont été inclus dans l'étude sur une PCR routine positive (patients 17 et 30). Ces deux échantillons sont sortis négatif au NovoDiag® Stool Parasite. Pour l'un des deux, uniquement *Blastocystis hominis* a été retrouvé.

Les deux prélèvements positifs au moment du diagnostic ont été retrouvés positif par PCR routine sur le nouvel extrait d'ADN.

Ces deux patients avaient également une sérologie anguillulose positive

X. *Taenia saginata*

Un cas de *Taenia saginata* a été inclus après visualisation d'œufs et d'anneaux sur l'examen direct des selles et une PCR routine positive. Cet échantillon a été confirmé par le NovoDiag® Stool Parasite *Taenia saginata/Taenia asiatica*.

XI. *Dientamoeba fragilis*

Le diagnostic a été réalisé uniquement par PCR routine. Six patients (17, 25, 26, 27, 32, 33) ont été inclus. Cinq patients sont positifs en NovoDiag® Stool Parasite, excepté le patient 17.

XII. *Hymenolepis nana*

La PCR routine n'est pas disponible pour ce parasite. Un cas positif a été trouvé en NovoDiag® Stool Parasite (patient 18). Ce patient, pour rappel, est l'enfant d'origine bosniaque adressé pour diagnostic ascaridiose. Une étude conduite en Slovaquie a évalué la prévalence d'*H. nana*, et la différence entre la population roms et non-roms. La prévalence globale est estimée à 0.94% mais avec un odds ratio en faveur d'une infection à helminthe 52 fois supérieur dans la population roms⁶¹.

L'examen direct n'a pu être repris car les prélèvements ont été congelés.

XIII. *Autres parasites du kit NovoDiag® Stool Parasite*

Pour les parasites suivants : *Ancylostoma duodenale*, *Balantidium coli*, *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis spp*, *Metorchis spp*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Diphyllobothrium latum/nihonkaiense*, *Encephalitozoon spp*, *Enterobius vermicularis*, *Fasciola spp*, *Fasciolopsis buski*, *Necator americanus*, *Taenia solium*, *Trichuris spp*. nous n'avons eu aucun échantillon positif à inclure dans notre étude et aucun n'est revenu positif *de novo* en NovoDiag® Stool Parasite.

XIV. *Cas particuliers*

Certains patients ont été inclus dans l'étude sur la base de données épidémiologique et clinique, sans avoir eu au préalable de pathogènes mis en évidence par nos analyses de routine.

Le patient 11, avait une histoire de voyage fréquent au Laos : il présentait un bilan hépatique perturbé. Des cristaux de Charcot-Leyden ont été visualisés à l'examen direct des selles. Ces cristaux correspondent à une cristallisation des produits de dégradation des polynucléaires neutrophiles et peuvent être présent au cours des infections par les helminthes. Au final le test NovoDiag® Stool Parasite n'a pas pu retrouver l'implication d'un pathogène comme nos résultats de routine (microscopie et PCR routine)

Le patient 29 est âgé de 8 mois au moment du prélèvement, il est hospitalisé en hématologie pédiatrique pour greffe de moelle osseuse. Aucun pathogène n'a été détecté par le kit NovoDiag® Stool Parasite. Adressé au laboratoire pour abcès au niveau de la marge anal avec sang dans les selles.

⁶¹ Jana Pipiková et al., « Occurrence of the Most Common Helminth Infections among Children in the Eastern Slovak Republic », *Public Health* 150 (septembre 2017): 71-76, <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2017.05.011>.

XV. Témoins négatifs (groupe contrôle)

Dix échantillons ont été retenus dans notre étude comme témoins négatifs. Sept d'entre eux ont bien été négatifs après analyse par le test NovoDiag® Stool Parasite. Pour un patient, nous n'avons pas de résultat disponible en raison d'une erreur du contrôle interne ne validant pas le test. Enfin pour deux échantillons, un *Blastocystis* spp. a été retrouvé. Concernant le groupe des témoins négatifs aucun examen direct n'a pu être réalisé puisque les échantillons sont conservés congelés et seules les PCR sont réalisées en routine.

XVI. Résultats invalides

Au total, deux échantillons sont revenus invalides (5.5%). Ce phénomène aléatoire concerne environ 5% des prélèvements d'après le fournisseur. Il pourrait être lié à la présence d'un inhibiteur de PCR au sein de l'échantillon. Ainsi, après deux passages consécutifs et deux résultats « INVALIDE », il est recommandé de réaliser une dilution de la selle pour tenter de supprimer au maximum cet effet inhibiteur. Le premier échantillon « INVALIDE » correspond au patient 21. Il n'est plus ressortie « INVALIDE » lors de la repasse, éliminant l'hypothèse de la présence d'inhibiteurs de PCR dans nos échantillons.

Le deuxième échantillon « INVALIDE » correspond à un témoin négatif. Après une réanalyse, il est de nouveau sorti « INVALIDE ».

Ces résultats invalides pourraient être liés à un souci au niveau du contrôle interne.

Parasites	Nombre de positifs sur 36 échantillons			
Parasites	Examen direct	PCR routine	PCR du Gastrointestinal Panel FilmArray® BioFire	Novodiag® Stool Parasite
<i>Ascaris lumbricoïdes</i>	1	1	ND	1
<i>Blastocystis</i> spp	3	14	ND	14
<i>Cryptosporidium</i> spp	0	1	0	1
<i>Dientamoeba fragilis</i>	0	6	ND	5
<i>Entamoeba histolytica</i>	4	5	0	0
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	0	1	ND	1
<i>Giardia intestinalis</i>	6	4	4	7
<i>Schistosoma mansoni</i>	1	1	ND	1
<i>Schistosoma</i> spp.	0	0	ND	1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	2	ND	0
<i>Taenia saginata</i>	1	1	ND	1

ND : non disponible dans le panel.

Tableau 2 : Synthèse des résultats obtenus après analyse par le kit NovoDiag® Stool Parasite

PARTIE 4 : Discussion

PARTIE 4 : Discussion

L'objectif initial de notre travail était d'évaluer la méthode diagnostique NovoDiag® Stool Parasite dans le but de l'intégrer pleinement dans notre pratique quotidienne. En effet, ce nouveau kit diagnostic permettrait de gagner du temps au niveau de la technique des examens parasitologique des selles et ainsi pouvoir rendre les résultats de manière plus rapide, environ 1 heure et demie et de façon plus exhaustive. En termes de sensibilité et spécificité diagnostique, il est nécessaire que le test NovoDiag® Stool Parasite soit au moins aussi performant que les techniques par PCR simplex dont nous disposons en routine. De plus, de la même manière que les techniques moléculaires déjà évaluée, ce kit pourrait présenter l'avantage de gagner en sensibilité par rapport à l'examen parasitologique des selles par microscopie. De nombreux événements à travers le monde conduisent à des flux de population important. Nous pouvons citer par exemple les conflits internationaux, qui font l'actualité en ce moment, mais également les changements climatiques ou même le tourisme. Toutes ces situations entraînant des mouvements de population nous obligent à orienter nos tests diagnostiques vers une recherche plus large. Une approche syndromique par kit diagnostic multiplexé nous permet donc de couvrir de nombreux pathogène en un seul test.

Dans notre étude, nous avons inclus vingt-six patients et dix patients négatifs. Notre cohorte est assez faible, et certains pathogènes présent dans le kit diagnostic n'ont pu être testés faute de patients éligibles. Plusieurs parasites, en particulier les « helminthes » venus d'Asie, ont une prévalence très faible parmi les patients suivis à l'AP-HM. Un axe de progression à envisager pourrait être de regrouper les différentes études réalisées au niveau national en étude multicentrique afin d'augmenter le nombre d'échantillons évaluer et d'augmenter la puissance d'évaluation du test NovoDiag® Stool Parasite.

L'un des premiers points faibles du kit NovoDiag® Stool Parasite est d'exprimer ses résultats uniquement de manière qualitative (positif ou négatif) et de ne pas pouvoir avoir accès à des valeurs quantitatives. Ce problème est rencontré pour tous les kits multiplexe proposés au diagnostic en microbiologie. Il n'est donc pas possible d'avoir une idée de la charge parasitaire dans le prélèvement. Avec les PCR simplex en temps réel, il est possible d'évaluer la qualité de l'amplification par visualisation des courbes de fluorescence: les résultats douteux peuvent donc être recontrôler à partir de l'ADN extrait. Cette visualisation n'est pas possible avec le kit NovoDiag® Stool Parasite. Il n'est pas non plus possible de conserver l'ADN extrait. Cela peut constituer un problème si l'on souhaite effectuer d'autres analyses moléculaires

comprenant le séquençage ou le typage par exemple. Cette situation peut notamment se produire si l'on souhaite typer un *Cryptosporidium* spp ou alors si l'on désire réaliser d'autres PCR simplex, non présentes dans le kit.

Les résultats très décevants pour *Entamoeba histolytica* posent un vrai problème diagnostic, de par la fréquence relative de l'amibiase et sa potentielle gravité. En effet, *E. histolytica* est le protozoaire le plus fréquent à travers le monde, avec 500 millions de cas. Il est également responsable de 100 000 décès chaque année. Le diagnostic d'une amibiase colique est primordial chez les patients présentant des symptômes dysentériques mais aussi chez les porteurs asymptomatiques. Cette phase colique peut malheureusement évoluer vers la forme compliquée tissulaire.

Nous avons essayé de comprendre les mécanismes pouvant expliquer ces mauvais résultats, d'autant plus que la société MobiDiag nous rapporte de bonnes données concernant la sensibilité d'*Entamoeba histolytica*. Tout d'abord, l'hypothèse d'une mauvaise extraction a été avancée. NovoDiag® Stool Parasite est une technique entièrement fermée, depuis l'extraction jusqu'à l'obtention des résultats. Il n'est donc pas possible pour nous de contrôler l'étape d'extraction. Si l'on s'intéresse aux autres protozoaires inclus dans notre étude, notamment *Giardia intestinalis*, les résultats étaient plutôt convaincants. Cependant il est connu que certains protozoaires sous leurs formes kystiques n'ont pas la même facilité à être détruit au cours de l'étape d'extraction du matériel génétique. Pourtant dans notre activité de routine, c'est avec le parasite *G. intestinalis* que nous avons le plus souvent des problèmes d'extraction. De plus le patient 14 présentait des formes végétatives, et le NovoDiag® Stool Parasite était négatif. Ce cas peut exclure un problème d'extraction lié à la paroi des kystes. Nous avons également analysé une deuxième fois par le NovoDiag® Stool Parasite le patient 14 et le patient 34, qui sont une nouvelle fois revenus négatifs.

Une autre explication pourrait donc se trouver au moment de l'étape d'hybridation. En effet, il est possible que les sondes designées par la société Mobidiag ne soient pas capables de s'hybrider correctement à *Entamoeba histolytica*. Il est nécessaire pour le fournisseur de corriger leurs amorces afin de remédier à cette situation inacceptable pour un laboratoire d'infectiologie.

Gastrointestinal Panel FilmArray® est un autre kit diagnostic comprenant entre autre *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*. Lorsque l'on regarde les publications concernant la sensibilité et la spécificité d'*Entamoeba histolytica*, peu de données sont disponibles. En effet, cinq études étudiant la sensibilité globale du Gastrointestinal Panel FilmArray® n'ont pas

eu d'échantillons positif à *E. histolytica* à inclure^{62, 63, 64, 65, 66}, ou alors un seul positif dans leur cohorte de 462 selles⁶⁷.

Ce problème s'est également présenté lors d'un travail réalisé au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Toulouse dans le cadre d'une soutenance de thèse⁶⁸. Quatre selles étaient positives à *Entamoeba histolytica* avec un système PCR commercialisé, l'Amplidiag® Stool Parasites. Parmi elles, 2 selles correspondant aux charges parasitaires les plus fortes (et dont une présentait des kystes d'*Entamoeba histolytica/dispar* à l'examen direct), ont été correctement détectées en Novodiag® Stool Parasites. Les 2 autres selles avec une charge parasitaire moins élevées n'ont pas été détectées sur Novodiag® Stool Parasites. Elles étaient, par ailleurs, aussi négatives en microscopie : soit une sensibilité de 50%. A la différence de cette étude, soulignons que dans notre étude, le Novodiag® Stool Parasites a été négatif pour 4 selles bien que l'examen direct soit positif. Les PCR routine *Entamoeba histolytica* pour les 5 échantillons positifs avaient un CT compris entre 27 et 35, le 35ct correspondant à l'examen direct négatif.

Nous avons regardé les données de sensibilité et de spécificité d'autres kits commerciaux disponibles. La comparaison entre le kit NovoDiag® Stool Parasite et les autres kits n'est pas possible pour les helminthes (absence de kits disponibles). En revanche, nous avons pu trouver les données pour des kits détectant des protozoaires.

⁶² Sarah N. Buss et al., « Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis », éd. par C.-A. D. Burnham, *Journal of Clinical Microbiology* 53, n° 3 (mars 2015): 915-925, <https://doi.org/10.1128/JCM.02674-14>.

⁶³ Julian D. Machiels et al., « Impact of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel on Patient Care and Infection Control », éd. par Adriana Calderaro, *PLOS ONE* 15, n° 2 (6 février 2020): e0228596, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228596>.

⁶⁴ Zhifei Zhan et al., « Comparison of BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel versus Luminex XTAG Gastrointestinal Pathogen Panel (XTAG GPP) for Diarrheal Pathogen Detection in China », *International Journal of Infectious Diseases* 99 (octobre 2020): 414-420, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.020>.

⁶⁵ Stacy G. Beal et al., « A Gastrointestinal PCR Panel Improves Clinical Management and Lowers Health Care Costs », éd. par Michael J. Loeffelholz, *Journal of Clinical Microbiology* 56, n° 1 (janvier 2018), <https://doi.org/10.1128/JCM.01457-17>.

⁶⁶ Melissa O'Neal et al., « Evaluating Appropriateness and Diagnostic Stewardship Opportunities of Multiplex Polymerase Chain Reaction Gastrointestinal Testing within a Hospital System », *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 7 (janvier 2020): 204993612095956, <https://doi.org/10.1177/2049936120959561>.

⁶⁷ Jingyun Zhang et al., « Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel and Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of Major Diarrheagenic Pathogens by a Multicenter Diarrheal Disease Surveillance Program in China », *Foodborne Pathogens and Disease* 16, n° 11 (1 novembre 2019): 788-798, <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2642>.

⁶⁸ Florie Barba, « Evaluation des performances du kit Novodiag(r) Stool Parasites dans la détection des protozoaires intestinaux au sein du service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse », 2020.

Une première étude espagnole publiée en 2019 par Paulos et al.⁶⁹ vise à comparer les performances diagnostiques de quatre kits commerciaux pour la détection de protozoaires par des PCR multiplexé. Ils ont analysé de manière rétrospective 126 échantillons caractérisé par PCR : *Cryptosporidium hominis* (n = 29), *Cryptosporidium parvum* (n = 3), *Giardia duodenalis* (n = 47), *Entamoeba histolytica* (n = 3), autres parasites (n = 20) et non malades (n = 24). Gastroenteritis/Parasite Panel I (Diagenode) est un kit commercial comprenant *G. intestinalis*, *E. histolytica* et *Cryptosporidium spp.* La sensibilité est de 75% pour *Cryptosporidium spp.*, de 68.1% pour *Giardia intestinalis* et pas de positifs pour *E. histolytica* sur trois échantillons analysés. Le deuxième kit évalué est : RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel (R-Biopharm). Il comprend *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *Cryptosporidium spp* et *D. fragilis*. La sensibilité est de 87.5% pour *Cryptosporidium spp.*, de 78.7% pour *Giardia intestinalis* et 66.7% pour *E. histolytica*. Le troisième kit évalué est : Allplex Gastrointestinal Parasite Panel 4 (Seegene). Il comprend *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica* et *Giardia intestinalis*. La sensibilité est de 78.1% pour *Cryptosporidium spp.*, de 91.5% pour *Giardia intestinalis*.et 100% pour *E. histolytica*. Le dernier kit évalué est : FTD Stool Parasites (Fast Track). Il comprend *G. intestinalis*, *E. histolytica* et *Cryptosporidium spp*. La sensibilité est de 53.1% pour *Cryptosporidium spp*, de 100% pour *Giardia intestinalis*.et 66.7% pour *E. histolytica*.

Une deuxième étude rennaise publiée en 2018 par Autier et al⁷⁰. a évalué la sensibilité de trois kit commerciaux pour le diagnostic de protozoaires intestinaux. 90 échantillons de selles positifs par microscopies ont été inclus. Le premier kit évalué est : BD MAX[™] Enteric Parasite Panel. Il comprend *G. intestinalis*, *E. histolytica* et *Cryptosporidium spp*. Pour *G. intestinalis*, la sensibilité est de 89% (39/44). Pour *Cryptosporidium spp*. la sensibilité est de 55% (6/11). Le deuxième kit évalué est : RIDA[®]GENE Parasitic Stool Panel (R-Biopharm). Pour *G. intestinalis*, la sensibilité est de 41% (18/44). Pour *Cryptosporidium spp*. la sensibilité est de 100% (11/11). Pour *D. fragilis*, la sensibilité est de 71% (20/28). Gastroenteritis/Parasite Panel I (Diagenode) est le troisième kit évalué. Pour *G. intestinalis*, la sensibilité est de 64% (28/44). Pour *Cryptosporidium spp*. la sensibilité est de 73% (8/11) La sensibilité pour *E. histolytica*

⁶⁹ Silvia Paulos et al., « Comparative Performance Evaluation of Four Commercial Multiplex Real-Time PCR Assays for the Detection of the Diarrhoea-Causing Protozoa *Cryptosporidium Hominis/Parvum*, *Giardia Duodenalis* and *Entamoeba Histolytica* », éd. par Rodney D. Adam, *PLOS ONE* 14, n° 4 (8 avril 2019): e0215068, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215068>.

⁷⁰ Brice Autier et al., « Comparison of three commercial multiplex PCR assays for the diagnosis of intestinal protozoa », *Parasite* 25 (2018): 48, <https://doi.org/10.1051/parasite/2018049>.

n'ont pu être déterminé pour aucun des trois kit BD MAX™ Enteric Parasite Panel, RIDA® GENE Parasitic Stool et Gastroenteritis/Parasite Panel I (Diagenode) car les auteurs ont comparé uniquement avec des positifs en microscopie, sans avoir la certitude de l'espèce d'*Entamoeba dispar* / *histolytica*.

Une troisième étude publiée en 2019 par Jaeun et al⁷¹. a identifié 275 selles positives sur 858 et a étudié la sensibilité de trois kits commerciaux (Allplex Gastrointestinal Parasite Panel 4, Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel et BD MAX™ Enteric Parasite Panel). Malheureusement, un seul parasite (*Cryptosporidium*) a été retrouvé sur l'ensemble des échantillons.

Au final, la synthèse de ces études montre une sensibilité des kits PCR commercialisés pour *E. histolytica* multiplexé à d'autres protozoaires variant de 0% à 66.7%.

Strongyloides stercoralis est l'autre parasite avec des résultats peu probants. Le fournisseur rapporte déjà une sensibilité médiocre d'environ 70% lors de leur phase de test. De notre côté, aucun des deux patients testés positifs en routine n'ont pu être confirmés par NovoDiag® Stool Parasite. Pour rappel, les deux patients inclus dans notre étude (patient 17 et patient 30) avaient également une sérologie anguillule positive. Ils étaient tous les deux originaire d'Outre-Mer et n'étaient pas immunodéprimé. Si une infection à *Strongyloides stercoralis* n'est pas correctement dépistée, cela peut avoir de graves conséquences cliniques. En effet, lorsqu'un patient est immunodéprimé (cancer, VIH) ou est à risque de le devenir (administration de corticoïdes), il est absolument crucial de dépister cette infection afin de pouvoir initier un traitement par Ivermectine pour éviter une dissémination de l'infection avec un pronostic sombre (mortalité de 60 à 85%)⁷². Même chez l'immunocompétent il est important de pouvoir diagnostiquer cette infection car elles entraînent des troubles digestifs chroniques et des hyperéosinophilies fluctuantes avec les risques d'effets secondaires associés, ainsi que des troubles cutanés récidivants.

Pour le patient 22 de notre étude, des scolex ont été visualisés à l'examen parasitologie par microscopie du liquide de ponction et la PCR unitaire retrouve un *Echinococcus granulosus*.

⁷¹ Jaeun Yoo 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 », *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 143, n° 8 (1 août 2019): 999-1005, <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0002-OA>.

⁷² Claire Vilain, « Évolution des anguilluloses malignes après traitement triphasé par rapport au traitement antiparasitaire classique », 2015.

Lors de l'analyse de cet échantillon par le NovoDiag® Stool Parasite, un *Schistosoma spp.* a été mis en évidence. Nous avons inclus ce patient dans notre étude, même si *Echinococcus granulosus* ne fait pas partie des parasites intestinaux, afin de tester la présence d'éventuelles réactions croisées entre différentes espèces. Ce résultat peut néanmoins être surprenant, étant donné que *Echinococcus granulosus* est un nématode alors que *Schistosoma spp.* est un trématode. L'hypothèse selon laquelle une rupture de kyste d'*Echinococcus spp.* pourrait entraîner des résultats faussement positifs dans les selles mérite d'être étudiée de manière plus approfondie.

Le patient 17 présente une sérologie anguillule positive associée à la présence de *Strongyloides stercoralis* et *Dientamoeba fragilis* dans les selles mis en évidence par notre PCR routine. Cependant, le kit NovoDiag® Stool Parasite n'a détecté aucun de ces deux pathogènes. *Dientamoeba fragilis* a été positif au NovoDiag® Stool Parasite pour le reste des échantillons (n = 5). Cette donnée nous permet d'écarter un problème au niveau de l'amorce de *Dientamoeba fragilis*. Ce faux négatif est donc probablement dû à la présence d'inhibiteurs de PCR au sein de cet échantillon.

Concernant *Blastocystis spp.*, un nombre important (n= 14) a été retrouvé dans notre étude, et correspond à une prévalence de 39%. Celle-ci est en accord avec la prévalence retrouvée dans les pays à ressources limitées. Son rôle pathogène est encore mal compris. Fait-il uniquement partie de la flore commensale intestinale ? Est-il un marqueur de dysbiose ? Ou bien est-il réellement responsable de symptômes cliniques ? Certaines études suggèrent que *Blastocystis spp.* est pathogène^{73, 74}, voire même lié au syndrome de l'intestin irritable^{75, 76, 77}. Des études *in vitro* ont également mis en évidence des souches et des facteurs de virulence (notamment des

⁷³ Anita Bálint et al., « Do Not Forget the Stool Examination!—Cutaneous and Gastrointestinal Manifestations of Blastocystis Sp. Infection », *Parasitology Research* 113, n° 4 (avril 2014): 1585-1590, <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3805-0>.

⁷⁴ Hala K. El Deeb et Seham Khodeer, « Blastocystis Spp.: Frequency and Subtype Distribution in Iron Deficiency Anemic Versus Non-Anemic Subjects from Egypt », *Journal of Parasitology* 99, n° 4 (août 2013): 599-602, <https://doi.org/10.1645/12-80.1>.

⁷⁵ Susana Cifre et al., « Blastocystis Subtypes and Their Association with Irritable Bowel Syndrome », *Medical Hypotheses* 116 (juillet 2018): 4-9, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.04.006>.

⁷⁶ Vinoth Kumarasamy et al., « Blastocystis Sp., Parasite Associated with Gastrointestinal Disorders: An Overview of Its Pathogenesis, Immune Modulation and Therapeutic Strategies », *Current Pharmaceutical Design* 24, n° 27 (3 décembre 2018): 3172-3175, <https://doi.org/10.2174/1381612824666180807101536>.

⁷⁷ Doina S. Matiut et Lucian Hritcu, « The pathogenic role of Blastocystis isolated from patients with irritable bowel syndrome and colitis from Iasi, Romania », *Acta Parasitologica* 60, n° 1 (1 janvier 2014), <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0015>.

protéases), ce qui pourrait suggérer un rôle dans la pathologie⁷⁸. D'autres auteurs ne concluent pas à une corrélation entre la symptomatologie et la présence de *Blastocystis spp.* dans les prélèvements⁷⁹ ; ⁸⁰. De plus, ce protozoaire est présent dans des cas où le patient est totalement asymptomatique. *Blastocystis spp.* est lié au péril fécal et pourrait témoigner d'un non accès à de bonnes conditions sanitaires. Cette hypothèse est confortée par le fait que *Blastocystis spp.* soit présent avec d'autres parasites dont la pathogénicité est reconnue. Dans notre étude, il y a sept cas de co-infection (cinq à *D. fragilis*, un à *G. intestinalis* et un à *T. saginata* et *S. mansoni*). Il semblerait que *Blastocystis spp.* puisse coloniser un grand nombre d'individu et que certaines conditions soient remplies comme par exemple la virulence de la souche, l'état immunitaire du patient, pour qu'il possède un potentiel infectant. ⁸¹

En l'état actuel de ce travail, il n'est pas envisageable d'utiliser le kit NovoDiag® Stool Parasite en routine. Notre volonté est de pouvoir offrir un diagnostic fiable et le plus exhaustif possible concernant les parasitoses intestinales grâce à une approche syndromique. Cette promesse n'est pas tenue pour *Entamoeba histolytica* et *Strongyloides stercoralis*, tout en sachant que nos techniques de dépistage utilisées en routine (PCR unitaire pour *Entamoeba histolytica* et sérologie et PCR unitaire pour *Strongyloides stercoralis*) se révèlent efficaces.

⁷⁸ El Deeb et Khodeer, « *Blastocystis Spp.* »

⁷⁹ Leder et al., « No Correlation between Clinical Symptoms and Blastocystis Hominis in Immunocompetent Individuals ».

⁸⁰ Tungtrongchitr et al., « Blastocystis Hominis Infection in Irritable Bowel Syndrome Patients ».

⁸¹ Özgür Kurt, Funda Doğruman Al, et Mehmet Tanyüksel, « Eradication of Blastocystis in Humans: Really Necessary for All? », *Parasitology International* 65, n° 6 (décembre 2016): 797-801, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.010>.

Conclusion

L'objectif de notre travail a été d'évaluer une nouvelle méthode diagnostique récemment commercialisée : le kit NovoDiag® Stool Parasite. Il s'agit d'une PCR multiplex regroupant vingt-six cibles moléculaires correspondant à trente parasites intestinaux.

Trente-six échantillons de selles ont été inclus, correspondant à vingt-six patients et dix témoins négatifs.

Le kit NovoDiag® Stool parasite a montré une excellente sensibilité (100%) pour les pathogènes suivants : *Ascaris lumbricoides*, *Blastocystis spp*, *Cryptosporidium spp*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Schistosoma mansoni* et *Taenia saginata* et une bonne sensibilité pour *Giardia intestinalis* (87.5%).

Concernant les *Entamoeba histolytica*, les résultats sont très décevants. Aucuns des échantillons positifs pour cette amibe n'a pu être confirmé par le kit NovoDiag® Stool Parasite.

Strongyloides stercoralis est l'autre parasite avec des résultats peu probants, puisqu'aucun des deux échantillons positifs analysés n'ont été confirmés par le kit NovoDiag® Stool Parasite.

Echelle de Bristol

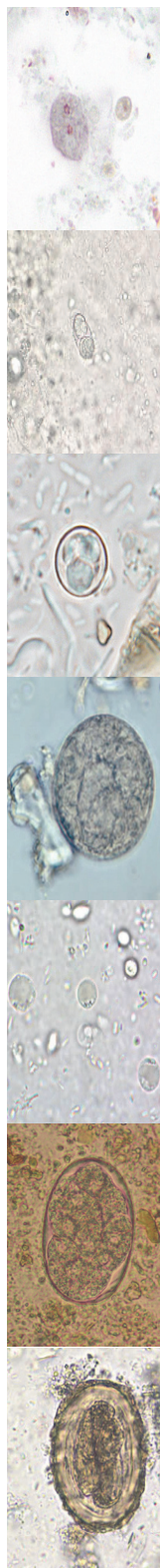
Type 1		Selles dures et morcelées (en billes) d'évacuation difficile
Type 2		Selles dures, moulées en saucisse et bosselées
Type 3		Selles dures, moulées en saucisse, à surface craquelée
Type 4		Selles molles mais moulées, en saucisse (ou serpentín)
Type 5		Selles molles morcelées, à bords nets et d'évacuation facile
Type 6		Selles molles morcelées, à bords déchiquetés
Type 7		Selles totalement liquides

Heaton KW, Radvan J, Cripps H et al. Defecation frequency and timing, and stool form in the general population: a prospective study. *Gut*. 1992 Jun;33(6):818-24.

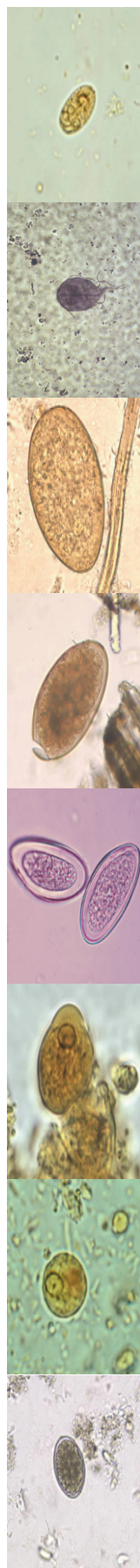
Annexe 1 Echelle de Bristol



*Annexe 2 Signe Larva currens (Source : Dermatology Atlas,
<http://www.atlasdermatologico.com.br/>)*



De gauche à droite : Œufs d'*A. lumbricoides* (source : CDC), d'*A. duodenale* (source : Researchgate), *Blastocystis spp*, Kystes de *B. coli*, *C. cayetanensis*, *C. belli*, *D. fragilis* (forme trophozoïte coloré au MGG), (source : CDC)



De gauche à droite : Œufs de *D. latum* Kystes d'*E. histolytica*, *E. histolytica*, forme végétative, Œufs d'*E. vermicularis*, Œufs de *F. hepatica*, Œufs de *F. bukkii*, *G. intestinalis*, forme trophozoïte, *G. intestinalis*, forme kystique (source : CDC)



De gauche à droite : Œuf embryonné d'*E. vermicularis*, Ver *E. vermicularis* Œufs d'*H.nana* Œufs de *S.mansoni* Larves strongyloïde de *S.stercoralis* Larves rhabditoïde de *S. stercoralis* Œufs de taenia spp Œufs de *T. trichura* (source : CDC)

Annexe 3 : Exemples de parasites sur l'examen parasitologique des selles

PCR du panel routine	PCR du Gastrointestinal Panel FilmArray® BioFire	PCR du kit NovoDiag® Stool Parasite
<i>Ancylostoma duodenale</i> <i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Cryptosporidium spp</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Encephalitozoon</i> <i>intestinalis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Enterobius</i> <i>vermicularis</i> <i>Enterocytozoon</i> <i>bieneusi</i> <i>Giardia intestinalis</i> <i>Isospora belli</i> <i>Necator</i> <i>americanus</i> <i>Schistosoma</i> <i>mansoni</i> <i>Strongyloides stercoralis</i> <i>Taenia saginata</i> <i>Taenia solium</i> <i>Trichuris trichura</i>	<i>Cryptosporidium spp</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia intestinalis</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i> <i>Ascaris lumbricoides/suum</i> <i>Balantidium coli</i> <i>Blastocystis spp</i> <i>Clonorchis sinensis</i> / <i>Opisthorchis sp.</i> / <i>Metorchis spp.</i> <i>Cryptosporidium spp</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Cytoisopora belli</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Diphyllobothrium latum/nihonkaiense</i> <i>Encephalitozoon spp.</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Enterocytozoon bieneusi</i> <i>Enterobius vermicularis</i> <i>Fasciola spp.</i> <i>Fasciolopsis buski</i> <i>Giardia intestinalis</i> <i>Hymenolepis diminuta</i> <i>Hymenolepis nana</i> <i>Necator americanus</i> <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Schistosoma spp.</i> <i>Strongyloides stercoralis</i> <i>Taenia saginata/asiatica</i> <i>Taenia solium</i> <i>Trichuris spp.</i>

Annexe 4 : Ensemble des PCR simplex disponible au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IHU Méditerranée Infection

INFORMATIONS	CRITERES DE NON INCLUSION ABSOLUE	CRITERES DE NON INCLUSION « RELATIVE » (à justifier)
Co-morbidités	■ Donneur avec une pathologie chronique connue ■ Antécédent de fièvre typhoïde ■ Troubles digestifs (diarrhée aiguë ou chronique) dans les 3 mois précédant le don	Donneurs avec antécédents familiaux : - MICI (lien de parenté) - maladies auto-immunes (lien de parenté) - cancer colique (lien de parenté et âge d'apparition)
Traitement médicamenteux	Donneur suivant un traitement curatif au long cours	Donneur traité par anti-infectieux au cours des 3 mois précédant le don ³
Voyages	■ Séjour en zone intertropicale au cours des 3 mois précédant le don ■ Résidence de plusieurs années en zone intertropicale ■ Hospitalisations à l'étranger de plus de 24h dans les 12 derniers mois (y compris membres de l'entourage du donneur)¹	/
Âge	Donneur mineur ²	Donneur âgé (>65 ans) ⁴
Statut pondéral	/	Donneur avec IMC>30 ⁵

CRITERES DE NON INCLUSION	INCLUSION SUR LA BASE D'UNE APPRECIATION INDIVIDUELLE
■ Episode de diarrhée (>3 selles molles à liquide (i) chez le donneur ou les membres de son entourage ■ Situations à risque de contamination : - Voyage à l'étranger - Contact avec du sang humain (piercing, tatouage, piqûre, plaie, projection, soins dentaires...) - Comportement sexuel à risque - Présence de lésions anales (afin de limiter le risque de transmission du virus du papillome humain et des virus de l'herpès)	Recherche des événements suivants : ■ Consultation médicale (motif) ■ Maladie contractée (laquelle, date et durée) ■ Prise de médicaments (lesquels, date de la dernière prise)

*Annexe 5 : Questionnaire de présélection et de sélection pour le don de selles
(source : Transplantation fécale : techniques, indications et réglementation, DESC Pathologie Infectieuse et Tropicale)*

Pathogènes recherchés dans le bilan de greffe fécale

Ancylostoma duodenale

Ascaris lumbricoides

Cryptosporidium spp.

Cyclospora cayetanensis

Encephalitozoon intestinalis

Entamoeba histolytica

Enterobius vermicularis

Giardia intestinalis

Cycloisospora belli

Enterocytozoon bienewisi

Necator americanus

Schistosoma mansoni

Strongyloides stercoralis

Taenia saginata

Taenia solium

Trichuris trichura

Annexe 6 : Pathogènes recherchés dans le bilan de greffe fécale

ORGANISMES CIBLES	GENES CIBLES	NOM	SEQUENCES (5'-3')
<i>Ancylostoma duodenale</i>	ITS-2	Anduo_F	GAATGACAGCAAACTCGTTGTTG
		Anduo_R	ATACTAGCCACTGCCGAAACGT
		Anduo_P	6FAM- ATCGTTTACCGACTTTAG-MGB
<i>Ascaris lumbricoides</i>	ITS-1	Alum_F	GTAATAGCAGTCGGCGGTTTCTT
		Alum_R	GCCCAACATGCCACCTATTC
		Alum_T	6FAM- TTGGCGGACAATTGCATGCCGAT
Blastocystis spp.	SSU rRNA gene	Blasto_F	GGTCCGGTGAACACTTTGGATT
		Blasto_R	CCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCA
		Blasto_P	6FAM- TCGTGTAATCTTACCATTAGAGGA-MGB
<i>Cryptosporidium</i> sp.	18S RNA ribosomique	Cryptospo_F	CATGGATAACCGTGCTAACT
		Cryptospo_R	TACCTACCGTCTAAAAGCTG
		Cryptospo_P	6FAM- CTAGAGCTAATACATGCGAAAAAA-MGB
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	18S RNA ribosomique	Cyclo_F	TAGTAACCGAAGGATCGCAT
		Cyclo_R	AATGCCACGGTAGGCCAATA
		Cyclo_P	6FAM- CCGCGGATAGATCATTCAAAGTTTCTGACC
<i>Entamoeba histolytica</i>	Hemolysine	Ehist_F	AAAGAACTTTGGAAAAAGAGTG
		Ehist_R	AAATGAAATAATTCTCTTGCTCTT
		Ehist_P	6FAM- AGCTTGAAAGAGTAATATGTGAACGGA
<i>Enterobius vermicularis</i>	5S RNA ribosomique region	Ever_F	TTTCCAAGCCACAGACTCAC
		Ever_R	ATTGCTCGTTTGCCGATTAT
		Ever_P	6FAM- TCATGTCTGAGCCGGAACGAGA
<i>Giardia intestinalis</i>	Giardin	Giardia_F	CGTGAAGATGATCAAGGAC
		Giardia_R	CTGGTTCTGGAGATTGTCT
		Giardia_P	6FAM- AGGAGATCGACACCATGGCTGC
<i>Isospora belli</i>	ITS2	Isob_F	ATATCCCCTGCAGCATGTCTGTTT
		Isob_R	CCACACGCGTATTCCAGAGA
		Isob_P	6FAM- CAAGTTCTGCTCAGCGCTTCTGG
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	18S RNA ribosomique	Ecun_F	TCCTAGTAATAGCGGCTGACGAA
		Ecun_R	ACTCAGGACTCAGACCTTCCGA
		Ecun_P	6FAM- CCCGTCTCTTTGTACACACCGCCC

<i>Encephalitozoon hellem</i>	18S RNA ribosomique	Ehel_F Ehel_R Ehel_P	GAATGATTGAACAAGTTATTTTGAATGTG AACACGAAAAGACTCAGACCTCTCA 6FAM- CCTGTCTCCTTTGTACACACCGCCC
<i>Enterocytozoon bienersi</i>	18S RNA ribosomique	Microspo_F Microspo_R Microspo_P	GGTGTGGTATCGGAATGTAT ACTATTCCACATGGAACAC 6FAM- GTGCGGTGGTGTGTAGGC
<i>Enterocytozoon intestinalis</i>	18S RNA ribosomique	Eint_F Eint_R Eint_P	GCAAGGGAGGAATGGAACAGAACAG CACGTTACAGAAAGCCCATTAACACAGC 6FAM- CGGGCGGCACGCGCACTACGATA
<i>Necator americanus</i>	ITS-2	Neca_F Neca_R Neca_P	CTGTTTGTTCGAACGGTACTTGC ATAACAGCGTGCACATGTTC 6FAM- CTGTACTACGCATTGTATAC-MGB
<i>Schistosoma mansoni</i>	tandem repeat units M61098	Smans_F Smans_R Smans_P	CAACCGTTCTATGAAAATCGTTGT CCACGCTCTCGCAAAATAATCT 6FAM- TCCGAAACCACTGGACGGATTTTATGAT
<i>Strongyloides stercoralis</i>	18S RNA ribosomique	Angui_F Angui_R Angui_P	GAAATCCAAAGTAAACGTAAGTCATTAGC TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC 6FAM- ACACACCGGCGCTCGCTGC
<i>Taenia solium</i>	oncosphere protein gene	Tsol_F Tsol_R Tsol_P	GCTCTGCAGGCCACCTATTTC CTAGGGACTTGGCGAGAGTG 6FAM- GGAATGTGATCGGCTTGTCACACA
<i>Taenia saginata</i>	ITS	Tsag_ITS_F Tsag_ITS_R Tsag_ITS_P	GCGTCGTCCTTTGCGTTACAC TGACACAACCGCGCTCTG 6FAM- TTGCTGCTGCTCGCTGCTGTGTGG
<i>Trichuris trichiura</i>	18S RNA ribosomique	Trich_F Trich_R Trich_P	TTGAAACGACTTGCTCATCAACTT CTGATTCTCCGTTAACCGTTGTC 6FAM- CGATGGTACGCTACGCTGCTTACCATGG

ITS : internal transcribed spacer ; SSU : Small sub units ; FAM 6 carboxyfluorescein, MGB : minor groove binder

Annexe 4 : Systèmes PCR disponibles au laboratoire de Parasitologie

		Master Mix Roche LC 480 (2X)	H2O RNase free	Amorce F (20µM)	Amorce R (20µM)	Sonde_TaqMAn (5µM)	Sonde_MGB (5µM)
<i>G.intestinalis</i>	V*1 réaction	10	1.8	1.1	1.1	1	-
	Concentration finale	1X	-	1100 nM	1100 nM	250 nM	-
<i>Microsporidies</i>	V*1 réaction	10	1.6	0.7	0.7	2	-
	Concentration finale	1X	-	700 nM	700 nM	500 nM	-
<i>Schistosoma mansoni</i>	V*1 réaction	10	3.5	0.5	0.5	0.5	-
	Concentration finale	1X	-	500 nM	500 nM	125 nM	-
<i>Cryptosporidium spp</i>	V*1 réaction	10	1.8	1.1	1.1	-	1
	Concentration finale	1X	-	1100 nM	1100 nM	-	250 nM
<i>Taenia solium</i>	V*1 réaction	10	1.8	1.1	1.1	1	-
	Concentration finale	1X	-	1100 nM	1100 nM	250 nM	-
<i>Blastocystis hominis</i>	V*1 réaction	10	3.5	0.5	0.5	0.5	-
	Concentration finale	X	-	500 nM	500 nM	125 nM	-
<i>E.histolytica</i>	V*1 réaction	10	1.1	1.1	1.1	1.7	-
	Concentration finale	1X	-	1100 nM	1100 nM	425 nM	-
<i>Autres systèmes</i>	V*1 réaction	10	3.5	0.5	0.5	0.5	-
	Concentration finale	1X	-	500 nM	500 nM	125 nM	-

Autres systèmes : *A.duodenale*, *A.lumbricoides*, *C.belli*, *C.cayetanensis*, *E.vermicularis*, *N.americanus*, *S.stercoralis*, *T.saginata*, *T.trichura*

V*1 : volume pour une réaction de PCR en µL, F : forward ; R : reverse ; µM : micromolaire ; nM : nanomolaire

Annexe 5 : Tableau des résultats de notre étude

Patient	Année de naissance	Sexe	Date pvt	Service	Durée congélation avant NovoDiag	ED	Sérologie positive	PCR routine	Résultats BioFire	NovoDiag®	Clinique	Immunodépression	Hyperéosinophilie (G/L)	SIB	Voyage	Origine
Témoins négatifs PATIENTS 1-10																
11	1948	M	03/12/2020	SI/réa	2	Cristaux Charcot Leyden	NR	Neg	Neg	Neg	Anémie profonde Insuffisance cardiaque	N	N	O	Laos	Laos
12	1960	M	25/09/2019	IHU	17	<i>G.intestinalis</i>	NR	<i>G.intestinalis</i> <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i>	NR	<i>Blastocystis spp.</i> <i>G.intestinalis</i>	Aucune info	N	N	N	NR	
13	1998	M	28/07/2020	IHU	7	K d'Endolimax nana Œufs et anneaux de <i>T.saginata</i> Œufs de <i>S.</i> <i>mansoni</i>	NR	<i>Blastocystis</i> <i>spp.</i> <i>S.mansoni</i> <i>T.saginata</i>	NR	<i>Blastocystis spp.</i> <i>S.mansoni</i> <i>T.saginata/asiatica</i>	Douleurs épigastriques	N	O (0,84)	NR	NR	Ethiopie Arrivé en 2017, passage Soudan, Libye et Italie
14	1952	M	20/08/2020	IHU	7	K d' <i>E. histolytica</i> FV d' <i>E. histolytica</i>	NR	<i>E.histolytica</i> <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i>	NR	<i>Blastocystis spp.</i>	Aucune info	NR	NR	NR	NR	

Patient	Année de naissance	Sexe	Date pvt	Service	Durée congélation avant NovoDiag	ED	Sérologie positive	PCR routine	Résultats BioFire	NovoDiag®	Clinique	Immunodépression	Hyperéosinophilie (G/L)	SIB	Voyage	Origine
15	1947	F	28/12/2020	Gériatrie	2	K de <i>G. intestinalis</i>	NR	<i>G. intestinalis</i>	<i>G. intestinalis</i>	<i>G. intestinalis</i>	Diarrhées glaireuses	N	N	O	NR	
16	1991	M	21/08/2020	HORS APHM	6	K d' <i>Entamoeba coli</i> K d' <i>E. histolytica</i> / <i>dispar</i> **	NR	<i>Blastocystis</i> spp.	N	<i>Blastocystis</i> spp.	Aucune info	NR	NR	NR	NR	NR
17	2000	F	04/11/2019	IHU	15	K d' <i>Entamoeba coli</i>	Anguillule	<i>S.stercoralis</i> <i>D.fragilis</i>	N	Neg	Bilan hyperéosinophilie	N	O (1,9)	N	Née à Mayotte Réunion de 2009-2019	
18	2018	F	07/02/2021	SAU	1-2 Sem	<i>A.lumbricoides</i>	NR	<i>A.lumbricoides</i>	Z	<i>A.lumbricoides</i> <i>Hymenolepis nana</i>	Vers dans les selles	NR	NR	NR	NR	Bosnie
19	1965	M	05/02/2021	SI/réa	1-2 Sem	K de <i>G.intestinalis</i> <i>Blastocystis</i> spp.	NR	<i>G.intestinalis</i> <i>Blastocystis</i> spp.	<i>G.intestinalis</i>	<i>Blastocystis</i> spp.	Aucune info (découverte fortuite)	N	N	O	NR	Comores

Patient	Année de naissance	Sexe	Date pvt	Service	Durée congélation avant NovoDiag	ED	Sérologie positive	PCR routine	Résultats BioFire	NovoDiag®	Clinique	Immunodépression	Hyperéosinophilie (G/L)	SIB	Voyage	Origine
20	1952	M	19/01/2021	IHU	1	<i>K de G. intestinalis</i>	NR	<i>G. intestinalis</i>	<i>G. intestinalis</i>	<i>G. intestinalis</i>	Nausées, Vomissement, Diarrhées	N	N	N	NR	
21	1950	M	21/02/2020	Chir gè	12	K d'E. <i>histolytica</i> et /ou dispar***.	Ambiase	<i>E. histolytica</i>	N	Neg	AEG (asthénie, perte poids) Diarrhées	GH	O (1,8)	N	NR	
22	1993	M	03/03/2020	Chir gè	11	Scolex	NR	<i>E. granulosus</i>	N	<i>Schistosoma spp.</i>	Toux fébrile Lésions hépatiques	N	O (0,7)	O	NR	Algérie France depuis 2019
23	2012	M	03/03/2020	Chir ped	11	K de <i>G. intestinalis</i>	NR	<i>G. intestinalis</i>	<i>G. intestinalis</i>	<i>G. intestinalis</i>	Diarrhées Douleurs abdo	GR	N	O	NR	
24	1959	M	28/04/2020	HORS AP	10	NR	NR	<i>C. parvum</i>	N	<i>Cryptosporidium spp.</i>	Aucune info	VIH	NR	NR	NR	NR

Patient	Année de naissance	Sexe	Date pvt	Service	Durée congélation avant NovoDiag	ED	Sérologie positive	PCR routine	Résultats BioFire	NovoDiag®	Clinique	Immunodépression	Hyperéosinophilie (G/L)	SIB	Voyage	Origine
25	2012	M	24/09/2020	SAU	5	<i>Endolimax nana</i>	NR	<i>Blastocystis</i> spp. <i>D.fragilis</i>	Neg	<i>Blastocystis</i> spp. <i>D.fragilis</i>	Contexte social difficile Encoprésie Selles moulées	NR	O (1,5)	NR	NR	
26	1967	M	23/11/2020	IHU	3	<i>Blastocystis</i> spp.	NR	<i>Blastocystis</i> spp. <i>D.fragilis</i>	N	<i>Blastocystis</i> spp. <i>D.fragilis</i>	Diarrhées Constipation Douleurs abdominales	N	N	N	NR	
27	2002	F	20/12/202	SAU	2	<i>Blastocystis</i> spp.	NR	<i>Blastocystis</i> spp. <i>D.fragilis</i>	Neg	<i>Blastocystis</i> spp. <i>D.fragilis</i>	Diarrhée aigüe, sang dans selles Vomissement Apyrétique	N	NR	N	NR	
28	1959	F	28/09/2020	COVID	4	Neg	NR	<i>E.bienneusi</i>		<i>E.bienneusi</i>	Diarrhées liquidiennes persistantes	GR	N	N	NR	
29	2019	M	25/01/202	Hémo ped	13	Neg	NR	Neg	Neg	Neg	Bilan pré greffe MO Abcès marge anale, sang dans selles	N	O	O	NR	

Patient	Année de naissance	Sexe	Date pvt	Service	Durée congélation avant NovoDiag	ED	Sérologie positive	PCR routine	Résultats BioFire	NovoDiag®	Clinique	Immunodépression	Hyperéosinophilie (G/L)	SIB	Voyage	Origine
30	1952	M	17/01/2020	Neuro	13	Neg	Anguillule	<i>S.stercoralis</i> <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i>	N	<i>Blastocystis spp.</i>	Découverte fortuite	N	O (1,4)	N	NR	Né en guadeloupe
31	1987	F	06/03/2020	IHU	11	Neg	NR	<i>G.intestinalis</i>	N	<i>G.intestinalis</i>	Suivi paludisme au retour du Soudan	N	N	N	Soudan	
32	1977	F	31/01/202	IHU	12	Neg	Neg*	<i>E.histolytica</i> <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i> <i>D.fragilis</i>	N	<i>Blastocystis spp.</i> <i>D.fragilis</i>	Amibiase Asthénie, nausées, céphalées	N	N	N	Bali, Chine, Singapour Cambodge, Laos	Thaïlande France depuis 2 ans
33	1976	M	06/03/2020	IHU	11	<i>K d'Entamoeba</i> <i>coli</i> <i>K d'E.histolytica</i> <i>et/ou dispar***</i>	NR	<i>E.histolytica</i> <i>D.fragilis</i> <i>Blastocystis</i> <i>spp</i>	N	<i>Blastocystis spp.</i> <i>D.fragilis</i>	Douleurs abdo exquise flanc gauche Diarrhée, Nausées Céphalées, Apyrétique	N	N	N	Voyages en Afrique +++ Retour d'Angola depuis 2 semaines	
34	1984	M	12/02/202	IHU	1-2 Sem	<i>K d'E.histolytica</i> <i>et/ou dispar***</i>	NR	<i>E.histolytica</i> <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i>	N	<i>Blastocystis spp.</i>	Aucunes infos	N	N	N	NR	

Patient	Année de naissance	Sexe	Date plvt	Service	Durée congélation avant NovoDiag	ED	Sérologie positive	PCR routine	Résultats BioFire	NovoDiag®	Clinique	Immunodépression	Hyperéosinophilie (G/L)	SIB	Voyage	Origine
35	1950	F	20/05/2021	SI/réa	1	NR	NR	<i>G.intestinalis</i>	<i>G.intestinalis</i>	<i>G.intestinalis</i>	Anevrisme cérébral	NR	NR	NR	NR	
36	1979	F	22/04/2021	COVID	2	<i>G.intestinalis</i>	NR	<i>G.intestinalis</i>	N	<i>G.intestinalis</i>	Rejet de greffe mixte Diarrhée	GR	N	O	NR	

Plvt : prélèvement, M : masculin ; F : féminin ; N : non ; O : oui ; NR : non renseigné ; GH : greffe hépatique ; GR : greffe rénale ; K : kyste ; FV : formes végétatives ; REA : réanimation ; CT : cycle threshold ; SAU : service d'accueil des urgences ; CHIR : chirurgie ; PED : pédiatrie ; hemato : hématologie ; SI : soins intensifs ; sem : semaines ; abdo : abdominale ; SIB : syndrome inflammatoire biologique ; ED : examen direct ; PCR : Polymerase Chain Reaction.

* : sérologie helminthe négative

** : PCR routine *Entamoeba histolytica* négative

*** : PCR routine *Entamoeba histolytica* positive

Annexe 9 : tableau des données démographiques, biologiques, cliniques de la cohorte de l'étude NovoDiag® Stool Parasite