

Diagnostic des parasitoses intestinales de l'immunodéprimé

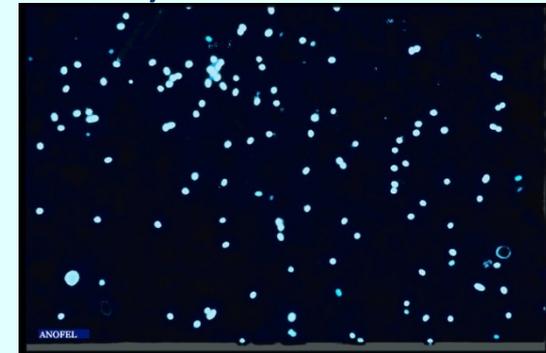
Jean MENOTTI

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
Hôpital Saint-Louis
AP-HP / Université Paris Diderot



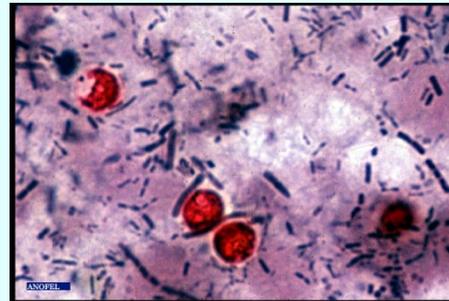
Parasites intestinaux de l'immunodéprimé

- Microsporidies (protistes dérivant de Zygomycètes)



- Protozoaires de la classe des Coccidies :

- Cryptosporidies
- *Cystoisospora belli*



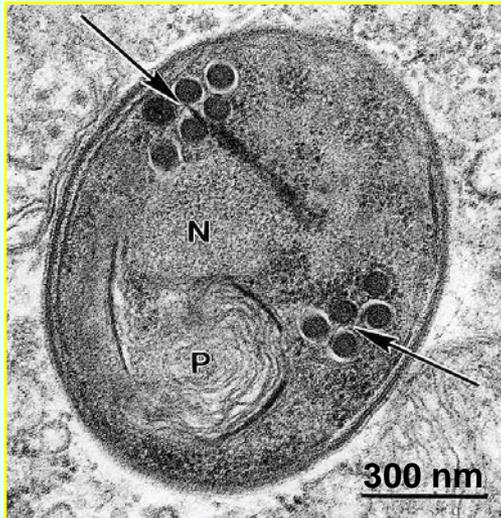
- Helminthes de la classe des Nématodes :

- Anguillules



Microsporidioses humaines

2 principales espèces de microsporidies pathogènes pour l'homme :



Enterocytozoon bienewisi

(photo. Chalifoux et al., 1998)



Encephalitozoon intestinalis

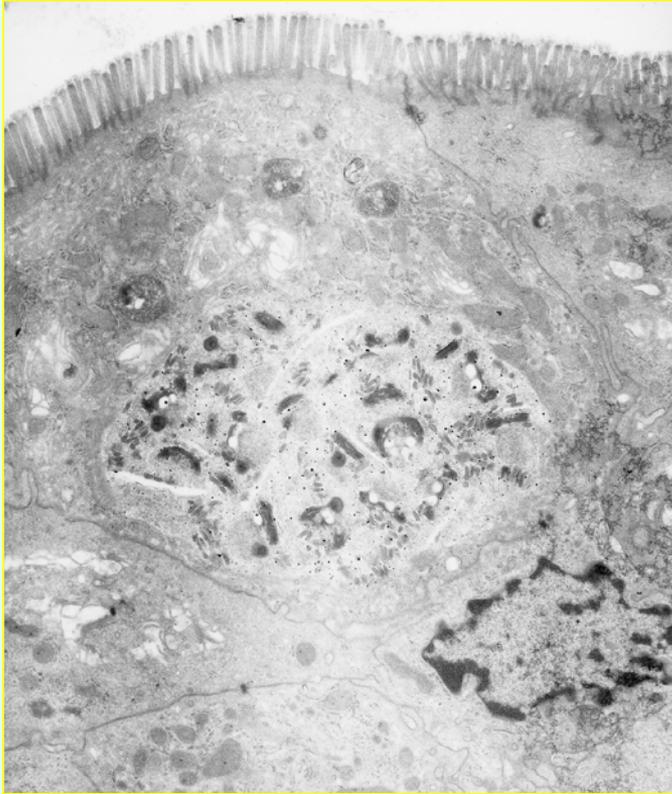
(photo. C. Sarfati)

Facteurs de risque : immunodépression

- infection par le VIH
- transplantations (Rabodonirina et al., 1996 ; Cotte et al., 1999 ; Lanternier et al., 2009 ; Talabani et al., 2010)
- traitements par corticoïdes (Silverstein et al., 1997)

Microsporidioses : aspects cliniques et physiopathologiques

■ Microsporidiose due à *E. bienewisi* :



(photo. C. Sarfati)

● Signes cliniques :

- diarrhées chroniques
- inappétence
- malabsorption intestinale
- perte de poids
- ± déshydratation

● Physiopathologie :

- duodenum et jejunum
- cytoplasme apical des entérocytes
- parfois atrophie villositaire
- ± atteinte des voies biliaires

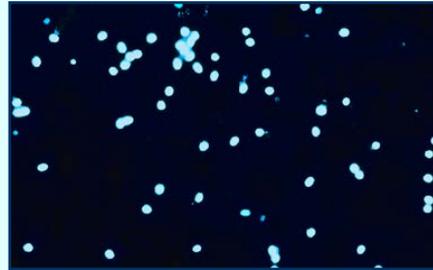
■ Microsporidiose due à *E. intestinalis* :

- infections intestinales et broncho-pulmonaires
- dissémination à d'autres organes

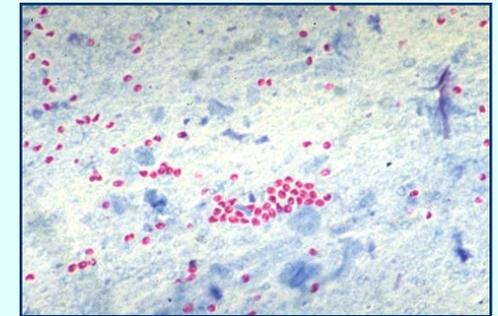
Diagnostic des microsporidioses

■ Diagnostic classique :

- Coloration à l'Uvitex 2B

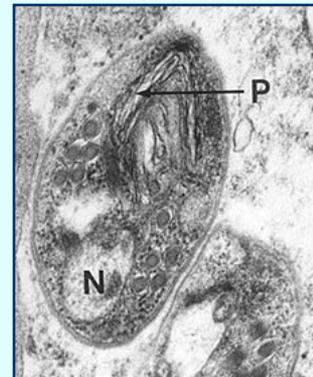


- Coloration au Trichrome de Weber modifié

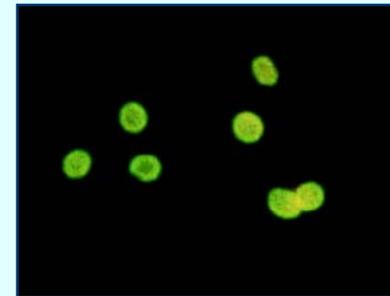


Photos ANOFEL

- Microscopie électronique



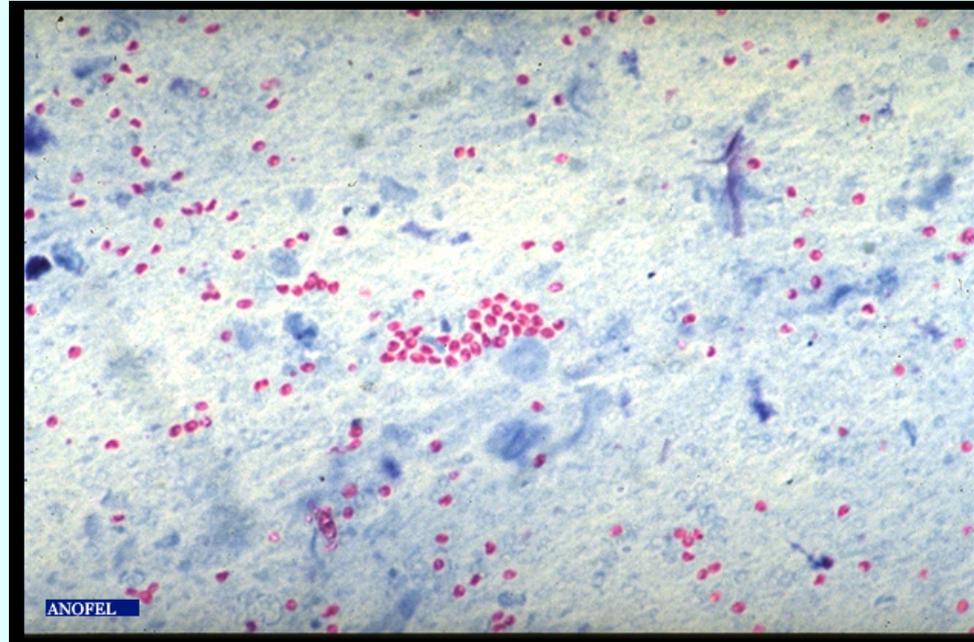
- Anticorps monoclonaux



- ## ■ Diagnostic par PCR → diagnostic d'espèce (indispensable pour orienter le traitement)

Diagnostic des microsporidioses

■ Coloration au Trichrome de Weber modifié

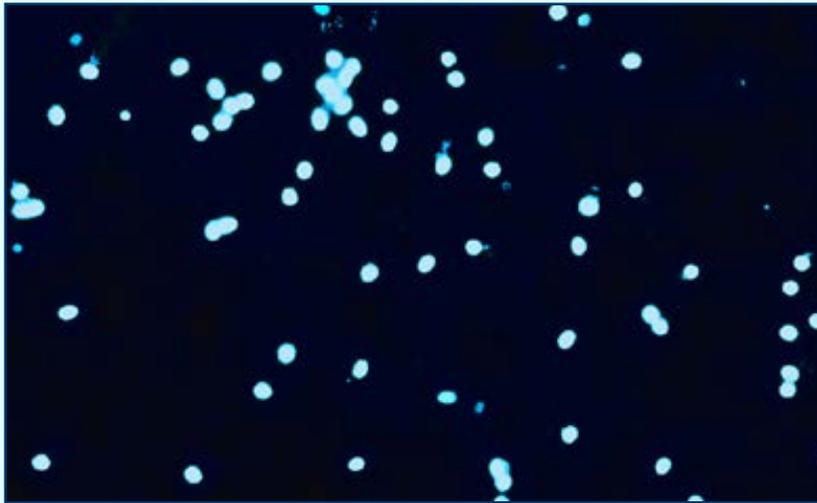


Spores d'*Enterocytozoon bienersi*

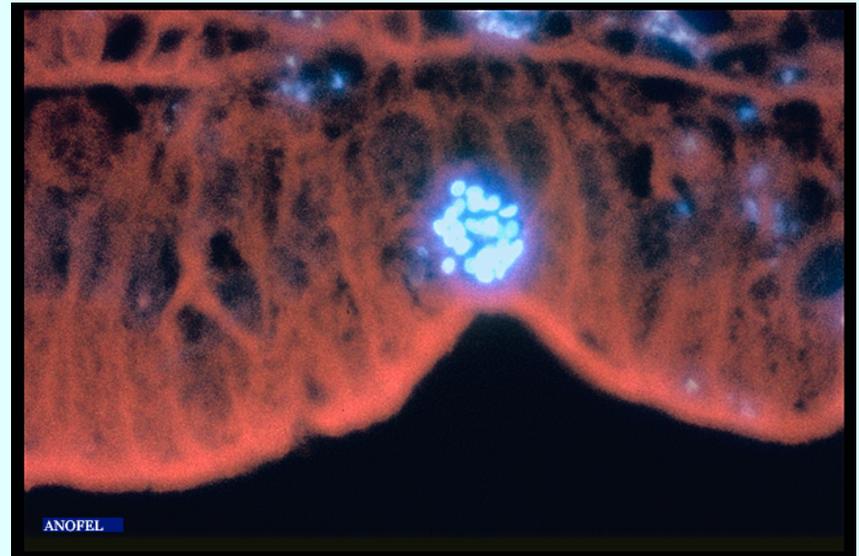
Microscopiste expérimenté car lecture difficile !
Confusion possible avec certaines bactéries

Diagnostic des microsporidioses

■ Coloration à l'Uvitex 2B



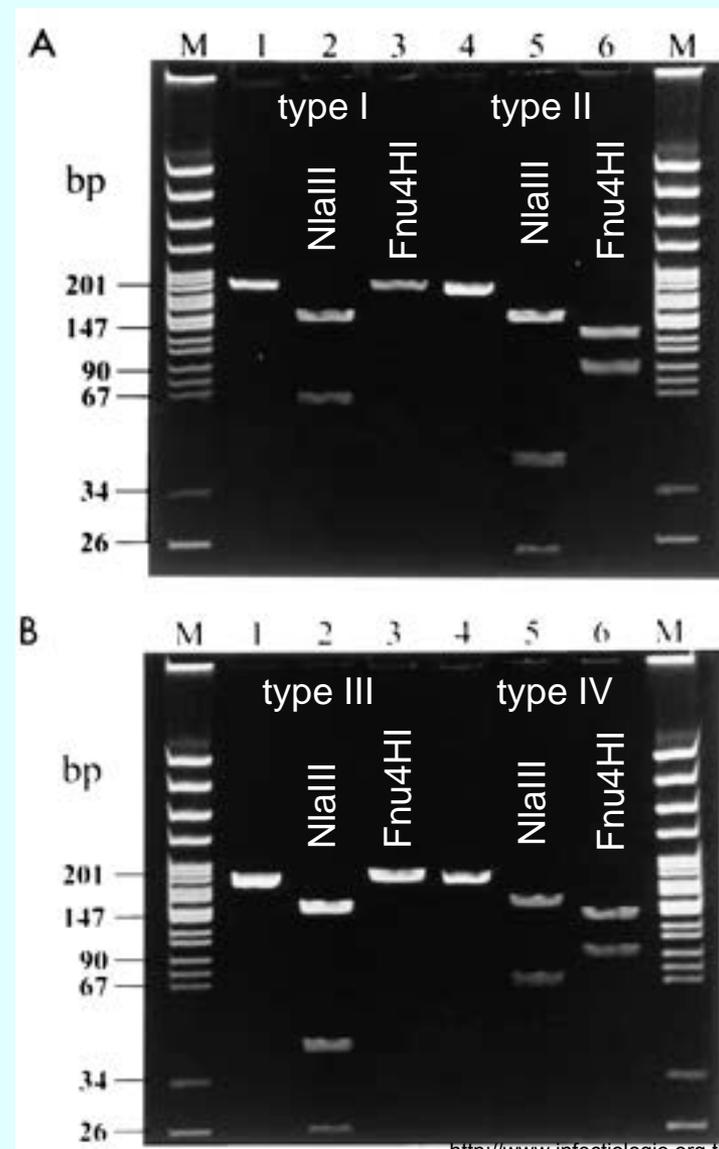
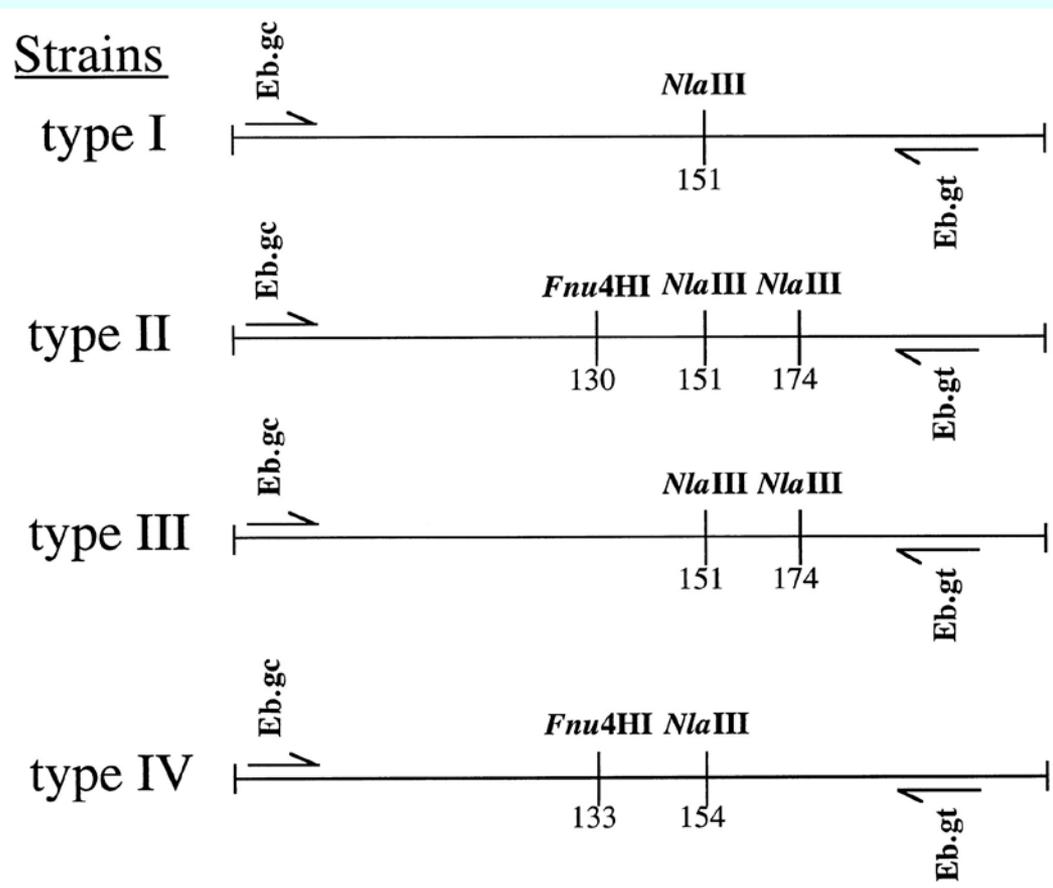
Spores d'*Enterocytozoon bieneusi*



Spores d'*Encephalitozoon intestinalis*

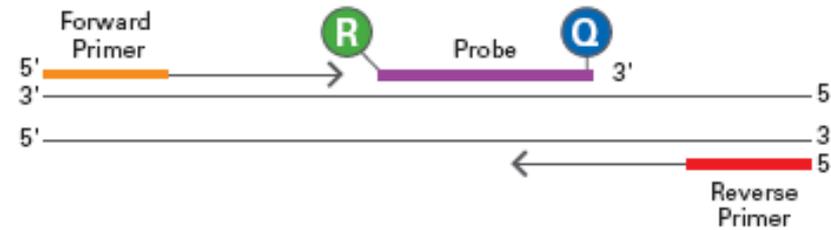
Typage moléculaire d'*Enterocytozoon bieneusi* par PCR-RFLP (Liguory et al., 1998)

PCR spécifique de l'ITS d'*E. bieneusi*
(Velasquez et al., 1996)



PCR en temps réel avec sonde d'hydrolyse (TaqMan)

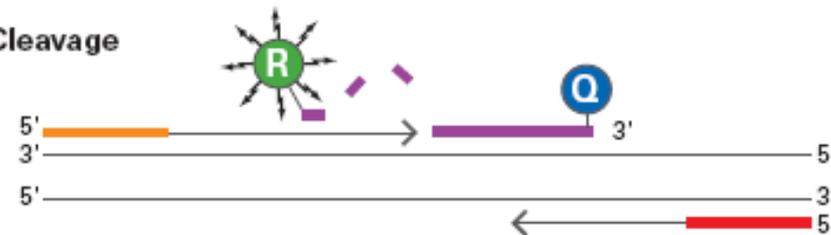
Polymerization



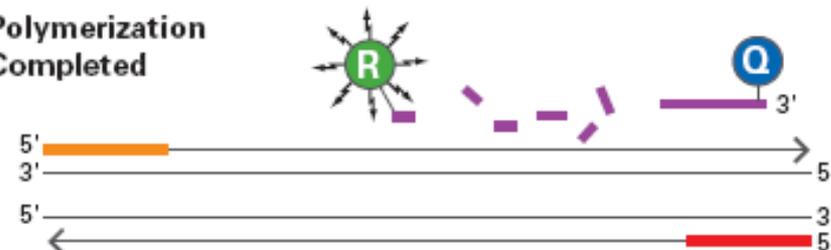
Strand Displacement



Cleavage



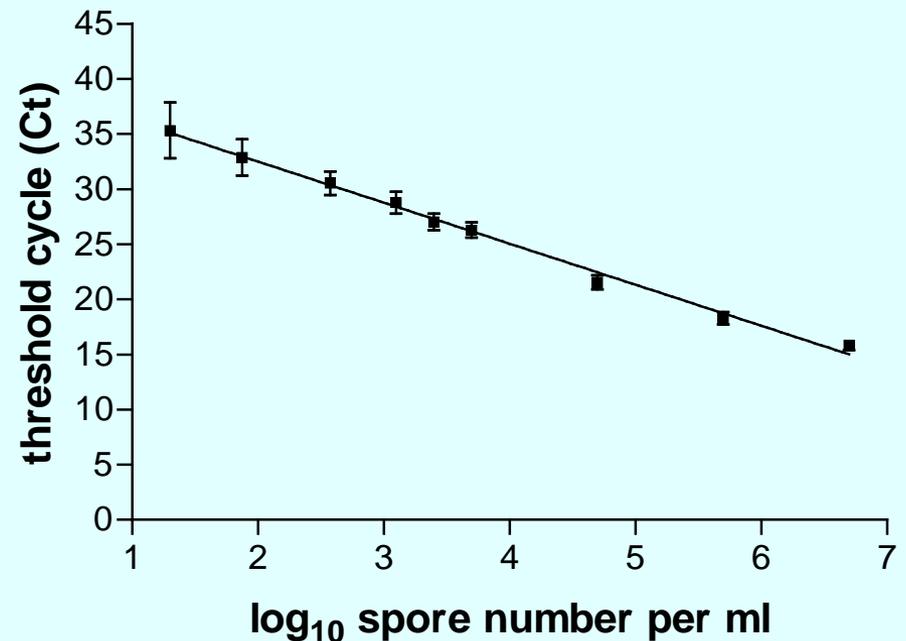
Polymerization Completed



PCR en temps réel pour *Encephalitozoon intestinalis*

PCR avec sonde TaqMan sur le gène codant pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (Menotti et al., JCM 2003) :

- Des dilutions sérielles d'une suspension de spores d'*E. intestinalis* obtenues par culture sur la lignée cellulaire humaine U-373-MG ont été utilisées comme standards externes.
- Une corrélation entre les valeurs de cycles seuils d'amplification obtenues et les numérations de spores a été établie au cours de 5 expérimentations indépendantes de PCR en temps réel et a permis d'obtenir la droite standard représentée ci-contre



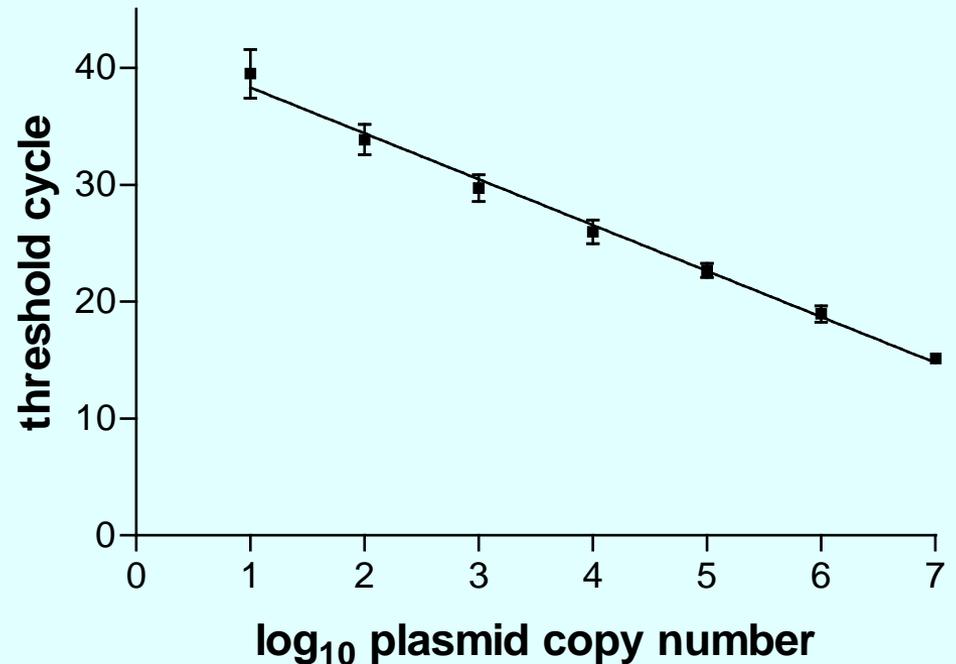
PCR en temps réel pour *Encephalitozoon intestinalis*

- L'analyse d'échantillons cliniques provenant de 8 patients immunodéprimés atteints de microsporidiose à *E. intestinalis* a montré :
 - la dissémination de l'infection par voie hématogène, avec la présence d'ADN d'*E. intestinalis* dans le sang de certains patients
 - le tropisme tissulaire d'*E. intestinalis* vers certains organes, avec la présence de fortes charges parasitaires dans des selles, des urines ou des prélèvements broncho-pulmonaires

PCR en temps réel pour *Enterocytozoon bienewisi*

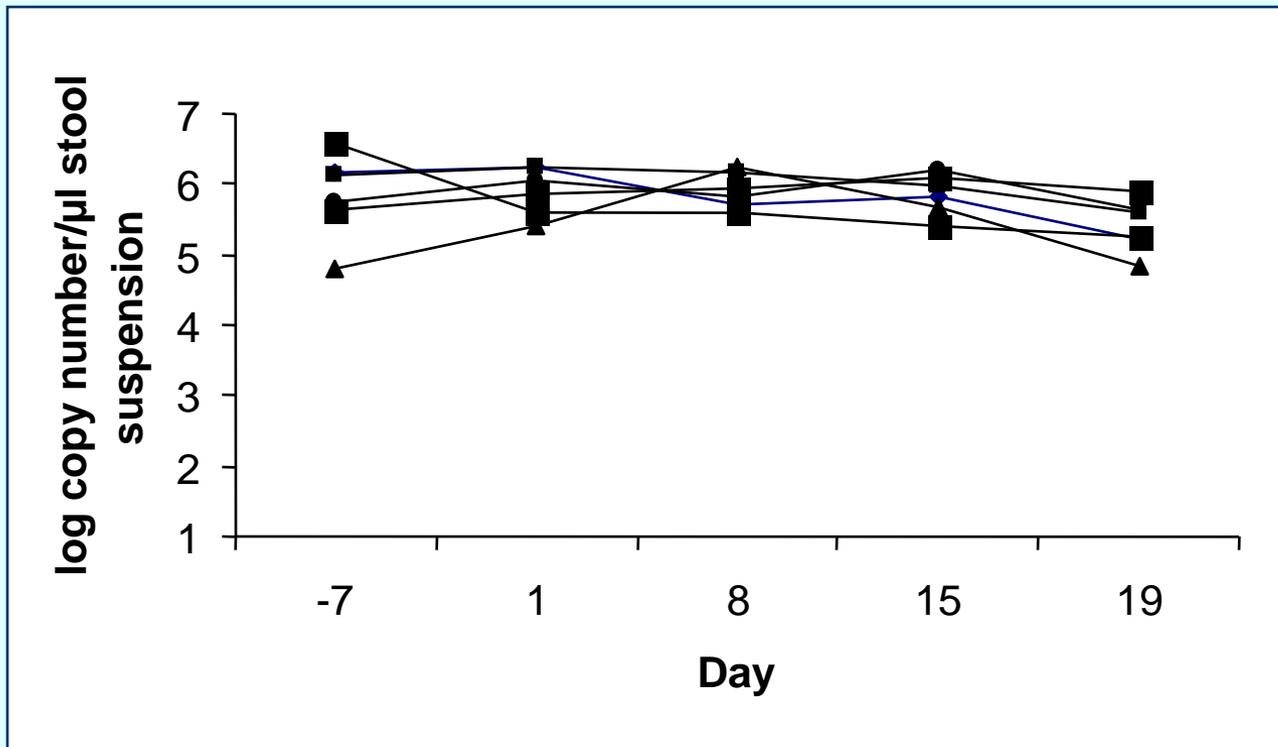
PCR avec sonde TaqMan sur le gène codant pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (Menotti et al., JID 2003) :

- Des dilutions sérielles de l'ADN d'un plasmide portant le gène codant pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomale d'*E. bienewisi* ont été utilisées comme standards externes
- La droite standard représentée ci-contre a été obtenue à partir de la relation établie entre les cycles seuils d'amplification et les nombres de copies du plasmide au cours de 10 expérimentations indépendantes de PCR en temps réel



PCR en temps réel pour *Enterocytozoon bienewisi*

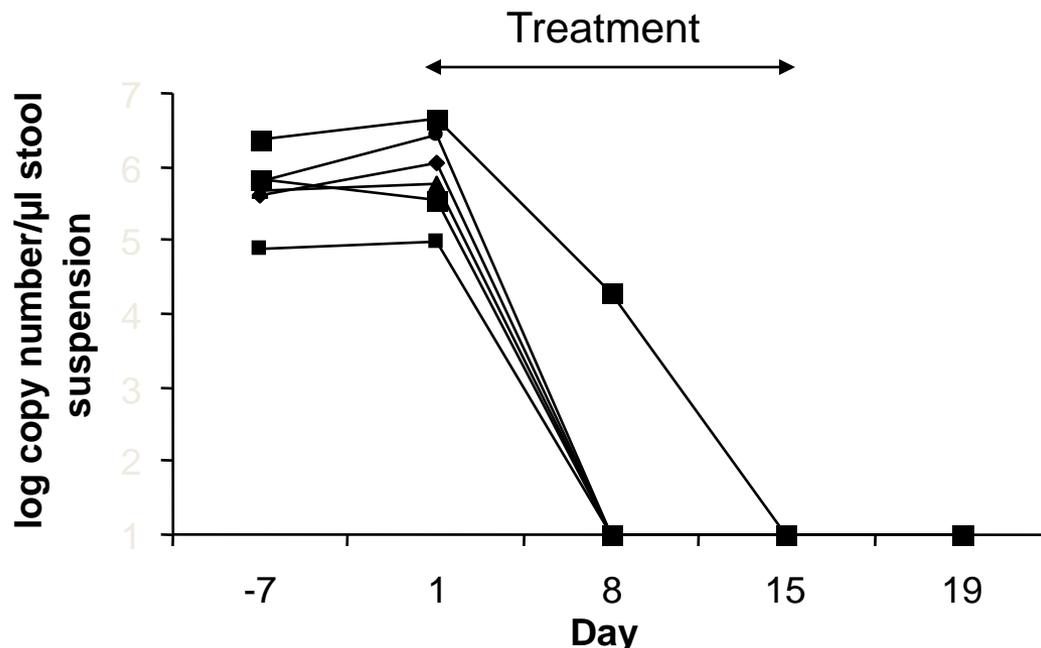
L'analyse d'échantillons de selles itératifs provenant de 6 patients atteints de microsporidiose à *E. bienewisi* a permis l'étude de l'excrétion parasitaire au cours de l'infection



Il n'a pas été noté de variation significative dans l'excrétion d'ADN parasitaire au cours du temps ($p=0,46$).

PCR en temps réel pour *Enterocytozoon bienewisi*

L'analyse d'échantillons de selles itératifs provenant de 6 patients traités par fumagilline au cours de l'essai thérapeutique ANRS 090 a permis l'étude de l'efficacité de la fumagilline dans le traitement de la microsporidiose intestinale à *E. bienewisi*



L'excrétion d'ADN parasite est devenue indétectable dans les selles de 5 patients dès le jour 8.

Chez un patient, l'ADN d'*E. bienewisi* est resté détectable au jour 8, mais à un niveau plus bas. Cependant, l'excrétion d'ADN parasite est aussi devenu indétectable aux jours 15 et 19 pour ce patient.

Au total, la fumagilline a induit une réduction moyenne de 4,7 log de l'ADN d'*E. bienewisi* dans les selles après 2 semaines de traitement

Cryptosporidiose

Protozoaire intestinal (classe des Coccidies)

Multiplication intracellulaire asexuée et sexuée à la surface des entérocytes.

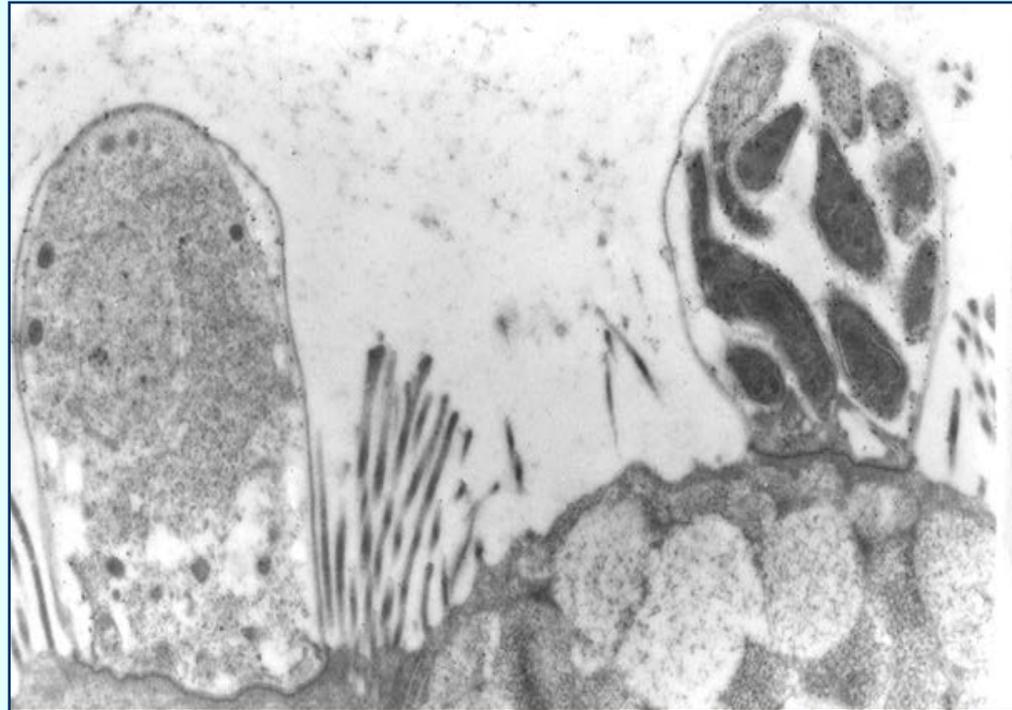
Emission d'**oocystes** directement contaminants

Contamination :
par ingestion d'oocystes.

Espèces :

- *Cryptosporidium parvum* (zoonose)
- *C. hominis* (~ strictement humain)

Autres espèces : *C. felis*, *C. canis*,
C. meleagridis, *C. muris*...



Parasitisme des entérocytes par *C. parvum*.
Photo A. Bonnin. ANOFEL

Cryptosporidiose : épidémiologie et clinique

Epidémiologie :

- Contamination de l'environnement par des oocystes
- Rôle des animaux d'élevage +++
- Épidémies dues à la contamination des ressources d'eau

Clinique :

Sujet immunocompétent :

Diarrhée spontanément résolutive en 2 à 3 semaines

Durée et gravité des symptômes plus marquées chez l'enfant et personne âgée

Rares localisations extra digestives

Sujet immunodéprimé (VIH+, greffé rénal...) :

Diarrhée chronique, malabsorption, cachexie

Localisations biliaires

Prévalence : 0,3% dans la population française.
3% chez sujets VIH+



Cryptosporidiose : diagnostic

Diagnostic :

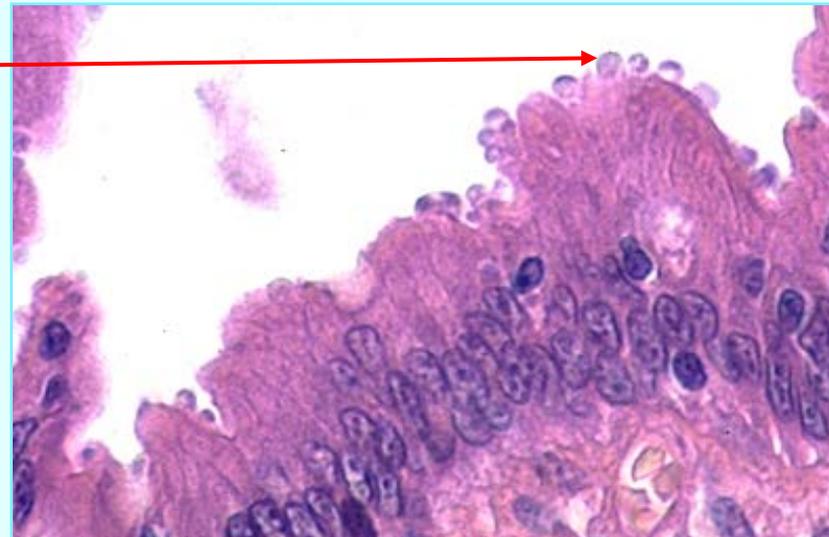
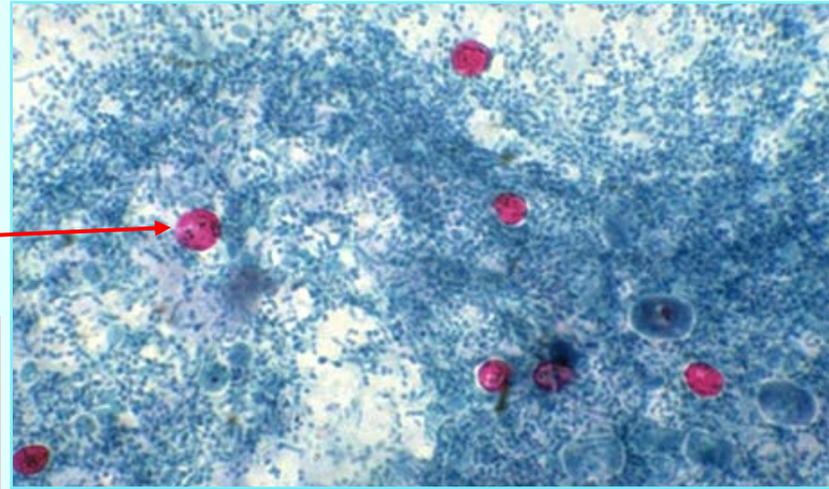
Examen des selles par microscopie optique (coloration de Ziehl-Neelsen modifiée) : mise en évidence des oocystes

Penser à demander cette recherche sur la prescription !!!! car elle n'est pas faite systématiquement

Histologie
PCR

Identification spécifique :

PCR-RFLP
PCR + séquençage
PCR en temps réel



Tests immunochromatographiques pour la détection d'antigènes de *Cryptosporidium*



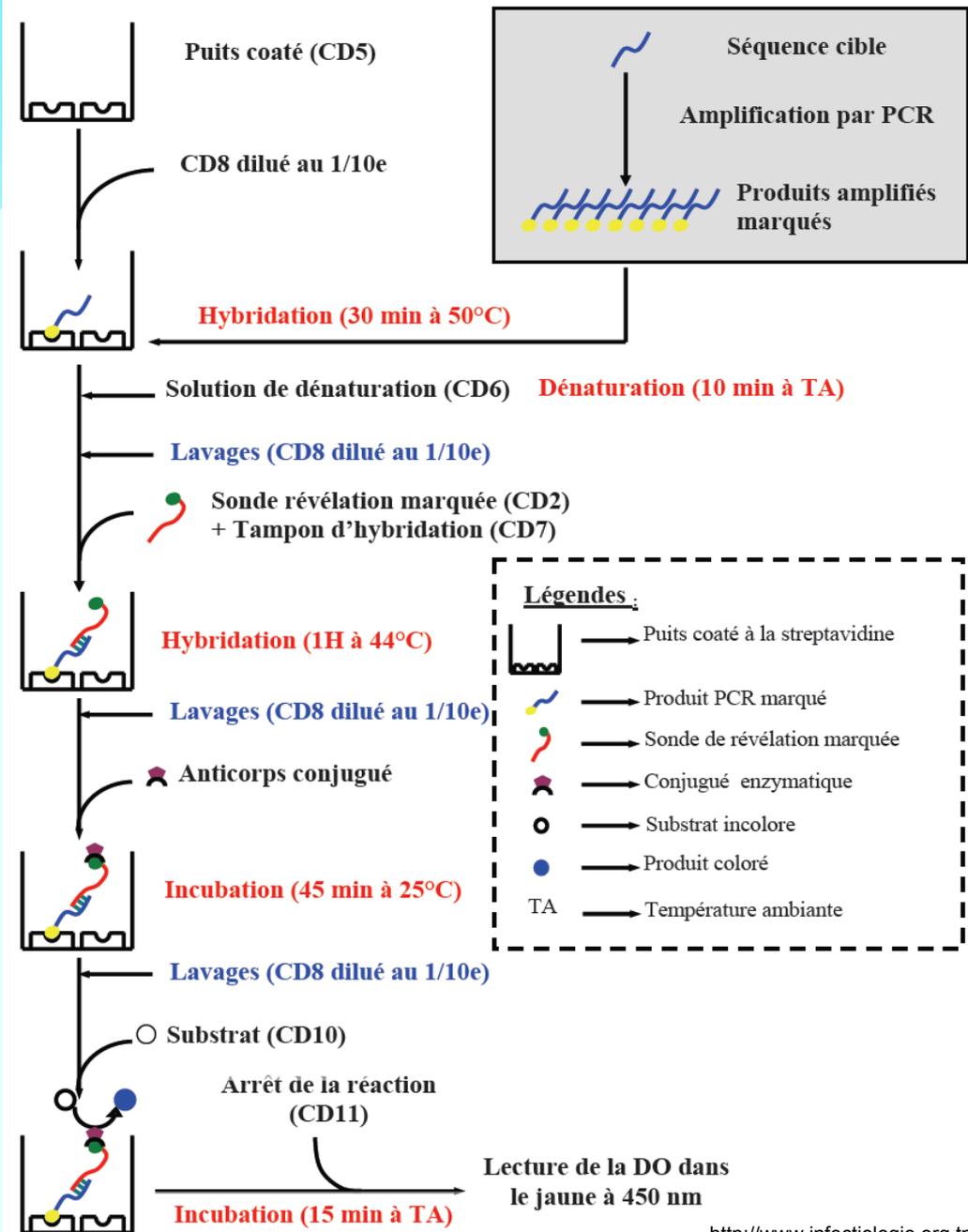
- Sensibilité acceptable pour *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium hominis* (73 à 87%)
- Sensibilité très faible pour les autres espèces de *Cryptosporidium* (30 à 33%)

Agnamey et al., 2011

<http://www.infectiologie.org.tn>

Cryptodiag® : PCR-ELISA *Cryptosporidium*

Schéma du fonctionnement du test



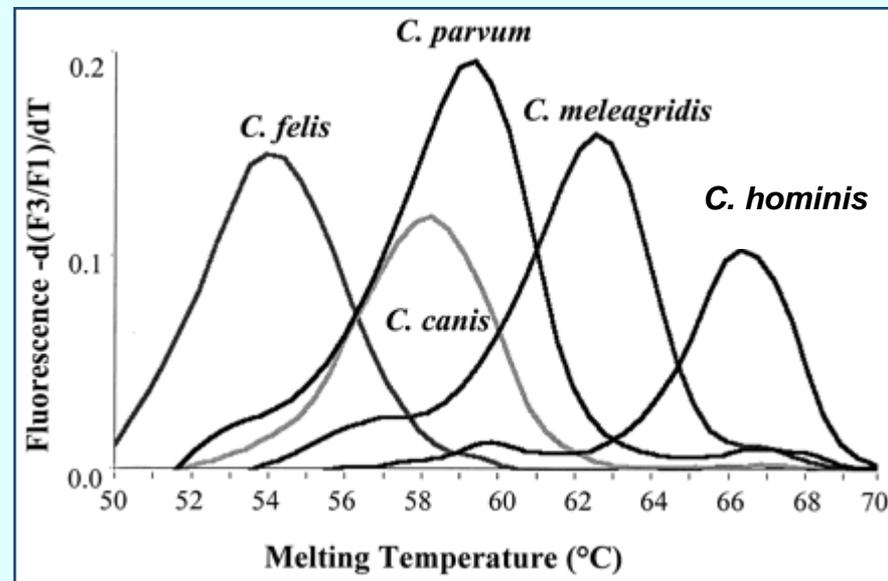
Extraction à l'aide du kit fourni, à partir de 200 µl de selles diluées au 1/10 dans du PBS

PCR avec 1 des 2 amorces marquée

ELISA avec sondes marquées spécifiques de *Cryptosporidium* spp., *C. hominis* et *C. parvum*

PCR en temps réel pour *Cryptosporidium* spp.

- PCR avec sonde TaqMan pour *C. hominis*, *C. parvum* et *C. meleagridis* (Fontaine et Guillot, 2002 et 2003)
- 3 PCR avec sondes TaqMan spécifiques du gène de la SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. et des gènes LIB13 de *C. hominis* et *C. parvum* (Hadfield et al., 2011)
- PCR avec sondes d'hybridation permettant la détection quantitative et l'identification de *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis* et *C. felis* (Limor et al., 2002)



PCR en temps réel pour la quantification de *Cryptosporidium* spp. et l'identification de *C. parvum* et *C. hominis*

- Evaluation multicentrique dans 4 laboratoires de Parasitologie de CHU et 1 laboratoire vétérinaire de l'ANSES
 - Quantification par qPCR avec sonde générique et identification d'espèce par qPCR avec sondes spécifiques testées sur 100 ADN dans chaque laboratoire
 - 9 techniques d'extraction d'ADN testées sur 20 échantillons de selles
- Résultats :
 - Reproductibilité de la qPCR entre laboratoires : satisfaisante
 - Importance de la technique d'extraction utilisée
- Conclusion :
 - Nouvel outil permettant le diagnostic de cryptosporidiose avec quantification des charges parasitaires et identification des 2 principales espèces de *Cryptosporidium*
 - Technique bien adaptée à une utilisation en routine

PCR en temps réel multiplex pour la détection simultanée de 4 protozoaires dans les selles

Target organism	Oligonucleotide	Sequence (5'-3') and labels
<i>Giardia lamblia</i>	Sense primer	GAC GGC TCA GGA CAA CGG TT
	Antisense primer	TTG CCA GCG GTG TCC G
	Probe	FAM-CCC GCG GCG GTC CCT GCT AG-BHQ
<i>Cryptosporidium parvum</i> / <i>Cryptosporidium hominis</i>	Sense primer	CTT TTT ACC AAT CAC AGA ATC ATC AGA
	Antisense primer	TGT GTT TGC CAA TGC ATA TGA A
<i>Entamoeba histolytica</i>	Probe	NED-TCG ACT GGT ATC CCT ATA A-MGB
	Sense primer	ATT GTC GTG GCA TCC TAA CTC A
	Antisense primer	GCG GAC GGC TCA TTA TAA CA
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Probe	VIC-TCA TTG AAT GAA TTG GCC ATT T-MGB
	Sense primer	CAA CGG ATG TCT TGG CTC TTT A
	Antisense primer	TGC ATT CAA AGA TCG AAC TTA TCA C
PhHV	Probe	FAM-CAA TTC TAG CCG CTT AT-MGB-BHQ
	Sense primer	GGG CGA ATC ACA GAT TGA ATC
	Antisense primer	GCG GTT CCA AAC GTA CCA A
	probe	Cy5-TTT TTA TGT GTC CGC CAC CAT CTG GAT C-BHQ

PhHV, phocid herpes virus; BHQ, Black Hole Quencher; MGB, Minor Groove Binder. Fluorophores: Cy5, FAM, NED, and VIC

Etude sur 397 prélèvements de selles :

Target	Microscopy ⁺ / PCR ⁺	Microscopy ⁺ / PCR ⁻	Microscopy ⁻ / PCR ⁺	Microscopy ⁻ / PCR ⁻
<i>Entamoeba histolytica</i>	1	–	–	396
<i>Giardia lamblia</i>	28	1 ^a	16	352
<i>Cryptosporidium</i> <i>parvum/hominis</i>	2	–	1	394
<i>Dientamoeba fragilis</i>	64	5	58	270

Microscopic re-examinations of discrepant samples are not included. Results of repeated paraPCR of initially inhibited samples are included. The protozoa in mixed infections are presented as separate detections.

^aOne PCR inhibited sample was positive for *G. lamblia* by microscopy and is included in the Microscopy⁺/PCR⁻ results for *G. lamblia*.

- 2 réactions par échantillon
- Contrôle interne
- Meilleure sensibilité

Bruijnesteijn et al., 2009

<http://www.infectiologie.org.tn>

Isosporose à *Cystoisospora belli*

Coccidiose intestinale

Multiplication intracellulaire

Emission d'oocystes immatures

Clinique:

Diarrhée aiguë et chronique

Epidémiologie:

Endémique (zones tropicales)

Zoonose: non

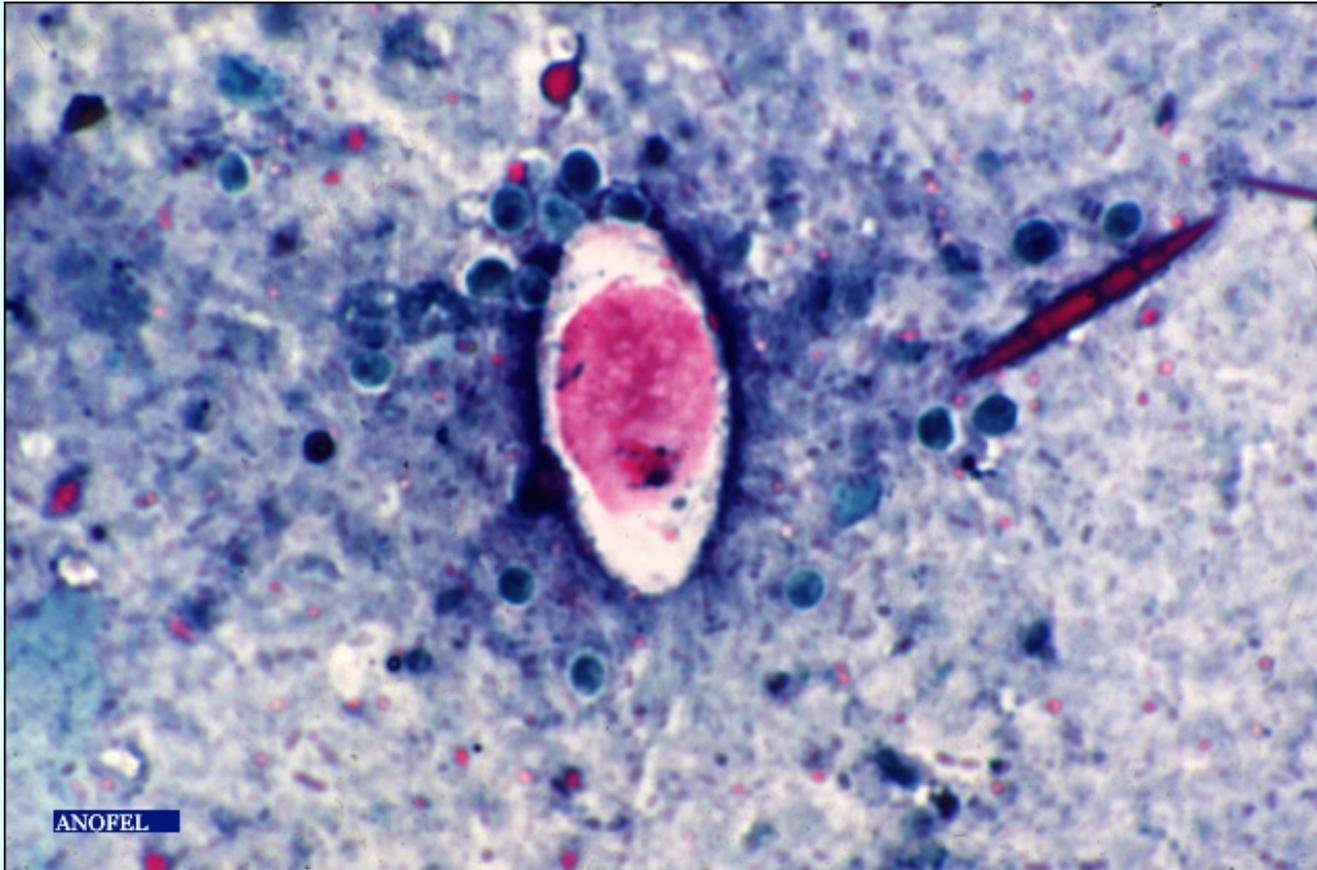
Diagnostic

Microscopie optique



Oocyste immature (G) et sporulé (D) de *C. belli*
Photo P. Marty, Poitiers. ANOFEL

Cystoisospora belli



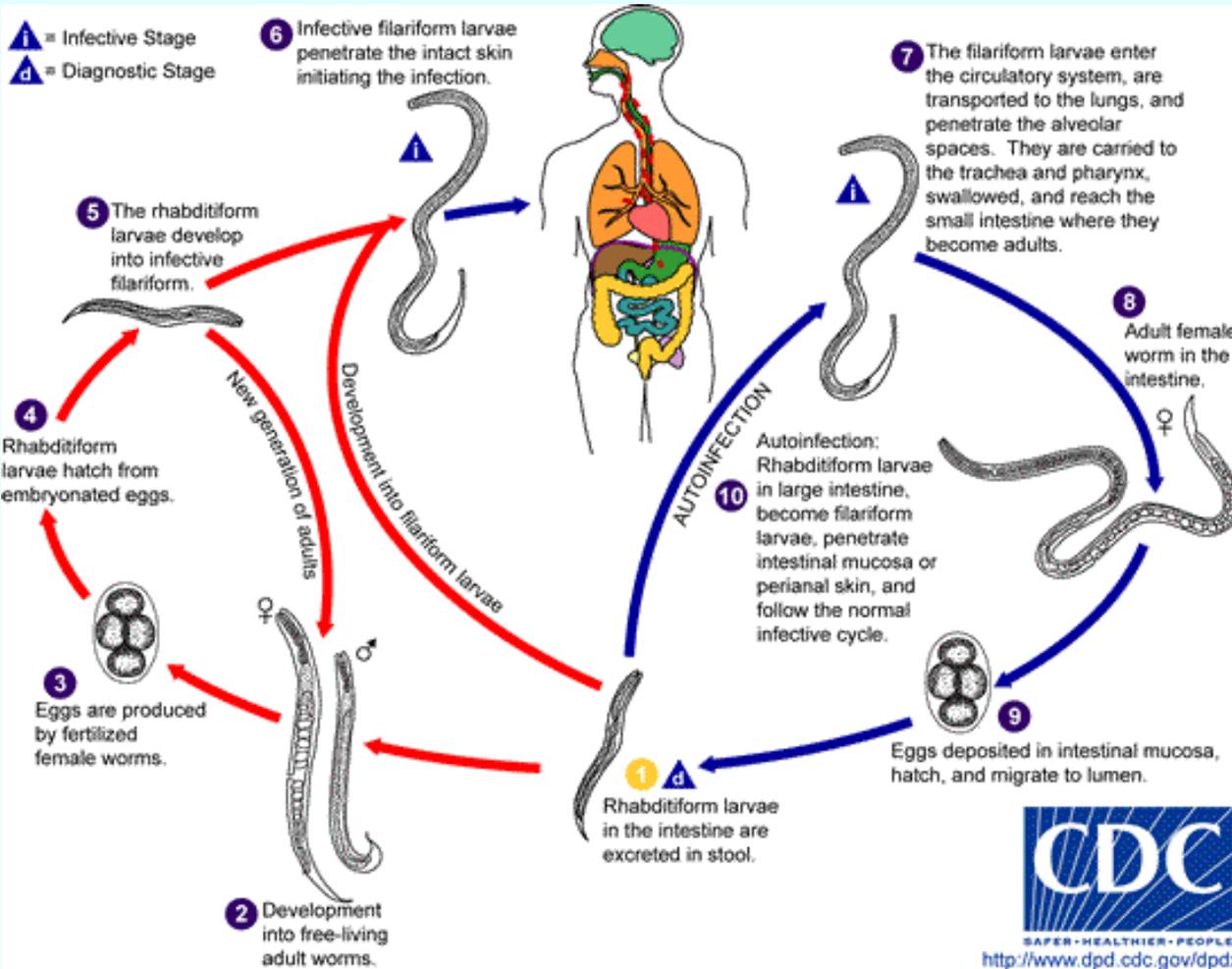
Oocyste immature de *C. belli* (coloration de Ziehl-Neelsen modifiée)
Photo C. Sarfati, hôpital St-Louis, Paris. ANOFEL

PCR en temps réel pour *Cystoisospora belli*

- PCR en temps réel avec sonde TaqMan ciblant la région ITS2
- Spécificité vérifiée sur 27 ADN d'autres parasites et de bactéries
- 100% sensibilité et spécificité sur 141 selles :
 - 21 positives microscopiquement
 - 120 négatives microscopiquement
- Charges parasitaires élevées pour les 21 échantillons positifs :
Ct entre 22,8 et 30,5

Ten Hove et al., 2008

Anguillulose à *Strongyloides stercoralis*



Contamination: voie transcutanée
Migration larvaire

Maturation dans l'intestin grêle (femelles)

Emission de larves non infectantes dans les selles (rhabditoïdes)

Maturation des larves (strongyloïdes) et formation d'adultes en milieu humide et chaud.

Attention !:
Cycle
d'autoinfestation

Taille : 2 mm. Femelles parthénogénétiques

Anguillulose

■ Clinique (peut être asymptomatique) :

- phase de pénétration cutanée : parfois dermatite d'invasion
- phase de migration larvaire : parfois pseudo-syndrome de Loeffler
- phase d'état :
 - signes digestifs
 - manifestations cutanées : prurit, *larva currens*

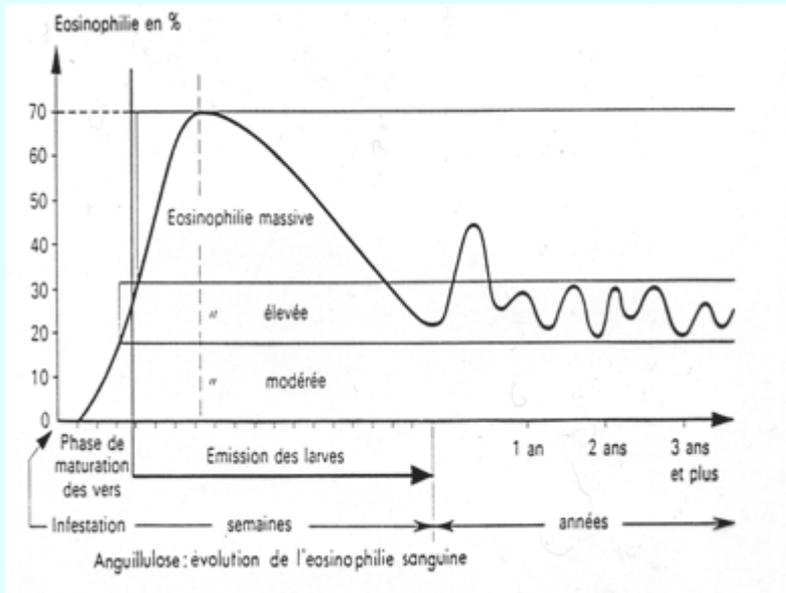


- anguillulose maligne : sujets immunodéprimés, **traités par corticoïdes** ou autres immunosuppresseurs

Anguillulose

■ Diagnostic :

- diagnostic d'orientation : hyperéosinophilie évoluant en dents de scie
- diagnostic de certitude : recherche des larves d'anguillule dans les selles **par la technique de Baermann**



Infections intestinales opportunistes diagnostiquées chez 143 patients VIH+ avec <100 CD4/mm³

- Etude prospective sur 3 ans incluant tous les patients VIH+ consécutifs hospitalisés ou consultant en Maladies Infectieuses à l'hôpital Saint-Louis et présentant <100 CD4/mm³
- Prévalence globale des parasites intestinaux : 17%
 - 8 patients : cryptosporidies dont 4 *C. hominis*
 - 6 patients : microsporidies (*E. bienersi* avec charge parasitaire élevée)
 - 1 patient : *Cystoisospora belli*
 - 1 patient : *Strongyloides stercoralis*
- Patients avec parasites intestinaux avaient + souvent des diarrhées (76% vs 56%, $p=0,025$) et étaient + souvent au stade C (84% vs 69%, $p=0,024$) que patients sans parasite
- Prévalence des parasitoses intestinales reste assez élevée chez les patients VIH+ avec taux de CD4 bas \Rightarrow une recherche systématique de parasites pathogènes dans les selles devrait être effectuée chez ces patients, même en l'absence de diarrhées

Conclusions

- **Microscopie** : ne pas oublier de **demandeur la recherche spécifique des parasites opportunistes** chez un patient immunodéprimé
 - Oocystes de cryptosporidies : coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (permet également la visualisation de *C. belli*)
 - Spores de microsporidies : coloration au trichrome de Weber ou Uvitex 2B
 - Larves d'anguillules : technique de Baermann
- **Diagnostic moléculaire** :
 - Gain potentiel de sensibilité, mais conditionné par le choix judicieux des gènes amplifiés et des amorces et sondes utilisées
 - Diagnostic d'espèce pour les microorganismes non identifiables morphologiquement : microsporidies (→ traitement), cryptosporidies
 - PCR en temps réel :
 - pas de manipulations post-PCR ⇒ - de risques de contamination
 - Intérêt de la quantification pour évaluer les charges parasitaires (→ suivi thérapeutique)
 - Nécessaire évaluation clinique de chaque technique mise au point
 - Commercialisation de kits : standardisation, mais évaluation clinique à réaliser également !
 - Automatisation, multiplexage, diminution du volume réactionnel → détection simultanée de plusieurs parasitoses intestinales

Merci à

Francis Derouin
Claudine Sarfati
Samia Hamane
Olivier Liguory
Cyril Savin

Laboratoire de
Parasitologie-Mycologie



Hôpital Saint-Louis, Paris

Jean-Michel Molina
Juliette Pavie
Matthieu Lafaurie
Sébastien Gallien

Service de
Maladies
Infectieuses et
Tropicales

