

# Apport de la biologie moléculaire au diagnostic des parasitoses

**M-H BESSIERES, S. CASSAING , A. BERRY, R. FABRE,  
J-F. MAGNAVAL**

**Service de Parasitologie-Mycologie *CHU - Toulouse***

# **Diagnostic biologique d'une parasitose**

**SIMPLE  
RAPIDE  
SENSIBLE  
SPECIFIQUE**

**OBJECTIF  
TRAITEMENT**

**Majorité des cas  
diagnostic direct  
morphologique  
ou/et  
sérologique**

# **DIAGNOSTIC DIRECT**

## **Diagnostic de certitude**

**Mise en évidence du parasite**

**+ - facile**

**Prélèvements : selles, urine, LCR, sang...**

**Diagnostic morphologique**

- Observation microscopique**
- examen direct du prélèvement et méthodes de concentration**

# Diagnostic morphologique

## ➤ Inconvénients

- Personnel entraîné, équipement minimum
- Observation microscopique longue et parfois difficile
- Peu sensible
- Ne permet pas dans tous les cas un diagnostic d'espèce
- Méthodes peu adaptées pour les parasites tissulaires ➡ culture et inoculation aux animaux : toxoplasme - leishmanie

# **DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE**

## **DETECTION D'ANTICORPS OU D'ANTIGENES**

### **FRÉQUEMMENT PRATIQUÉ**

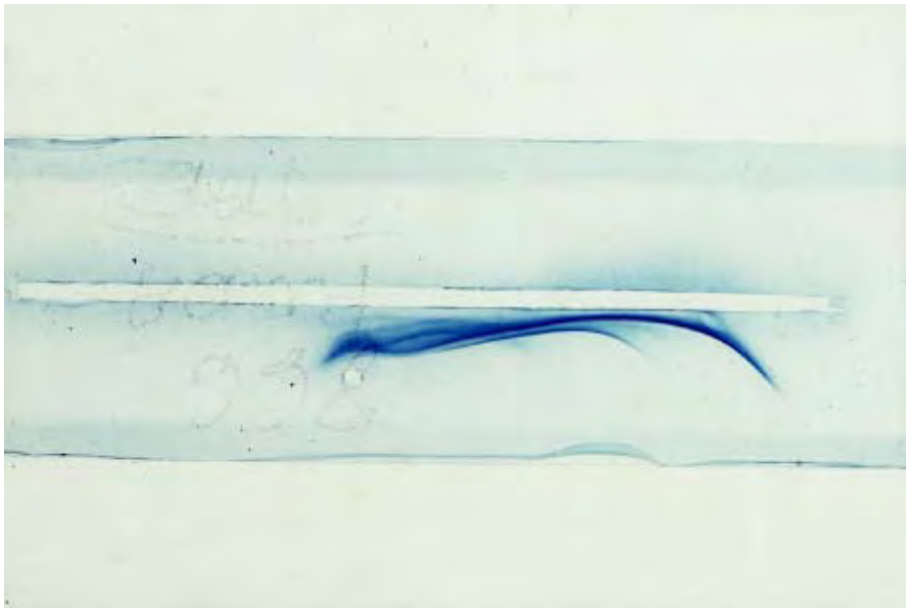
- Nombreuses techniques commercialisées sensibles, simples à réaliser, automatisables.**

### **INCONVENIENTS**

- Pas toujours possible de différencier une infection évolutive d' une immunité**
- Réaction croisée Helminthes**
- Distinction difficile entre les parasites d'un même genre**
- Peu performant chez les immunodéprimés**

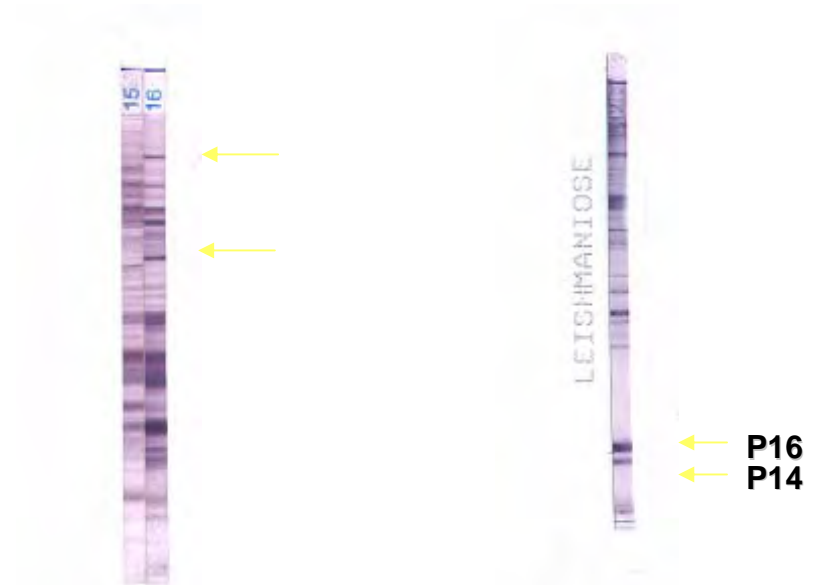
# DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE spécifique

## IMMUNOELECTROPHORESE



**Arc 5 HYDATIDOSE**

## IMMUNOBLOTTING

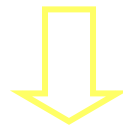


**S HA**  
Toxoplasmosis  
oculaire

Leishmaniose

# **TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE EN PARASITOLOGIE**

## **A PRATIQUER**



**Lorsque le diagnostic morphologique ou  
sérologique est impossible ou peu adapté**

**DETECTION DE L'AGENT INFECTIEUX =  
RECHERCHE D' ADN par PCR**

# **PCR EN PARASITOLOGIE**

## **POINTS ESSENTIELS**

### **TECHNIQUE MANUELLE**

- trousse non commercialisée**
- mise au point au laboratoire à chaque étape**
- dépendante opérateur : grande rigueur**

### **VALIDER LE TEST**

- sensibilité, spécificité, répétabilité, reproductibilité**
- contrôles de la réaction PCR négatif et positif**



# Mise au point au laboratoire

## Extraction de l'ADN de l'échantillon

- en faible quantité / ADN humain
- divers procédés, évolue vers l'automatisation

**CHOIX gène cible, séquences des amorces, sondes fonction de l'agent infectieux**

## optimiser la réaction PCR

- volume d'échantillon
- Nombre de cycles en présence d'Uracyl  
ADNglycosylase
- Détection des produits amplifiés BET, sondes

# **Nouvelle approche PCR en temps réel**

## **Processus automatisé**

- détection et quantification d'un émetteur fluorescent**
- émission directement proportionnel à la quantité d'amplicons générés pendant la PCR**

**Rapide : < 2 H**

**Pas de manipulation post-PCR**

**→ Réduction du risque de contamination**

**Permet de quantifier l'ADN amplifié**

**Bonne reproductibilité**

**Evolution vers la standardisation**

# **APPLICATIONS BIOLOGIE MOLECULAIRE EN PARASITOLOGIE**

**TOXOPLASMOSE**

**PALUDISME**

**LEISHMANIOSE**

# **Diagnostic moléculaire Toxoplasmose**

**Indispensable pour**

- Diagnostic de l'infection congénitale**
  - Diagnostic prénatal**
  - Diagnostic néonatal**
- Diagnostic de l'infection chez les patients immunodéprimés**
- Non pratiqué pour le diagnostic de la toxoplasmose chez les immunocompétents : caractère éphémère de la parasitémie**

**Diagnostic  
moléculaire de la toxoplasmose  
congénitale**

**Prélèvements**

**LIQUIDE AMNIOTIQUE (LA) : diagnostic prénatal**

**PLACENTA et CORDON : dépistage néonatal**

# Sensibilité et spécificité de la PCR dans le liquide amniotique

<b>Auteurs</b>	<b>Nombre patientes</b>	<b>Infectés Sensibilité</b>	<b>Non infectés Spécificité</b>
<i>ROBERT-GANGNEUX et al.1999</i>	<b>94</b>	<b>16/21 76%</b>	<b>73/73 100%</b>
<i>ROMAND et al 2001</i>	<b>270</b>	<b>48/75 64%</b>	<b>195/195 100%</b>
<i>BESSIERES et al 2002</i>	<b>148</b>	<b>54/60 90%</b>	<b>88/88 100%</b>
<i>EMSCOT Étude multicentrique européenne 2005</i>	<b>568</b>	<b>50/69 72%</b>	<b>491/499 98%</b>

# **Diagnostic prénatal PCR Liquide amniotique**

**Sensibilité variable mais bonne spécificité**

- réponse rapide moins de 48 à 72 h**
- remplace inoculation souris**

**Quantification ADN LA par PCR temps réel\***

- <10 toxo/ml 46 % des cas**
- entre 10 et 100 toxo/ml 30 %**
- > 100 toxo/ml 24 %**
- charge parasitaire élevée et infection maternelle précoce risque élevé d'infection sévère**

*\*Costa et al Prenat diagn 2001 21 85-88*

# **PCR LA EXAMEN INDISPENSABLE**

## **Diagnostic de la toxoplasmose congénitale**

**Tous les cas ne sont pas diagnostiqués**

### **Faux négatifs**

- méthodes +- sensibles / laboratoire**
- quantité d 'ADN cible insuffisante pour initier la réaction : faible charge parasitaire**
- inhibition non spécifique de la réaction PCR**
- foetus non contaminés à la date de l'amniocentèse**
  - passage retardé du parasite au FOETUS**

**Bilan néonatal et postnatal obligatoire pour confirmer ou exclure l'infection congénitale**



# **Autres applications**

**Diagnostic de l'infection toxoplasmique chez  
les patients immunodéprimés**

**VIH**

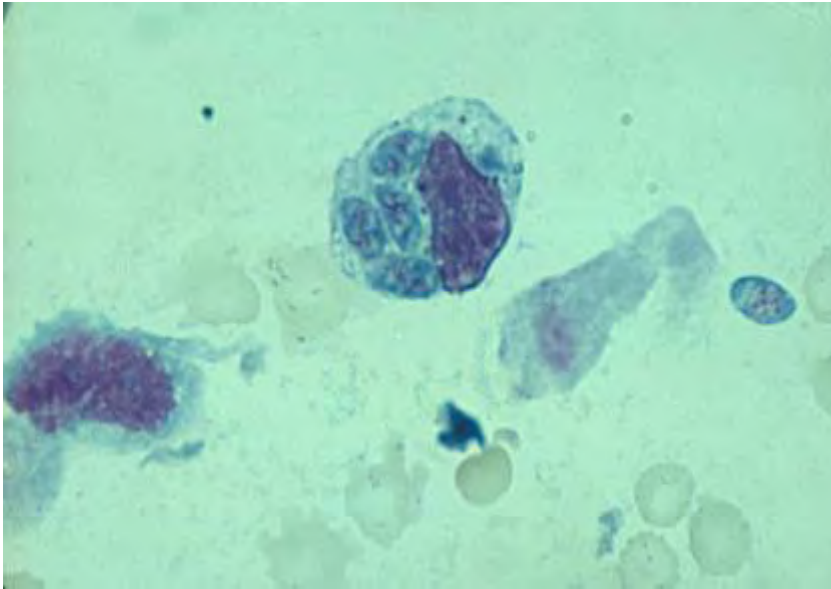
**Transplantés**

**Greffés de moelle**

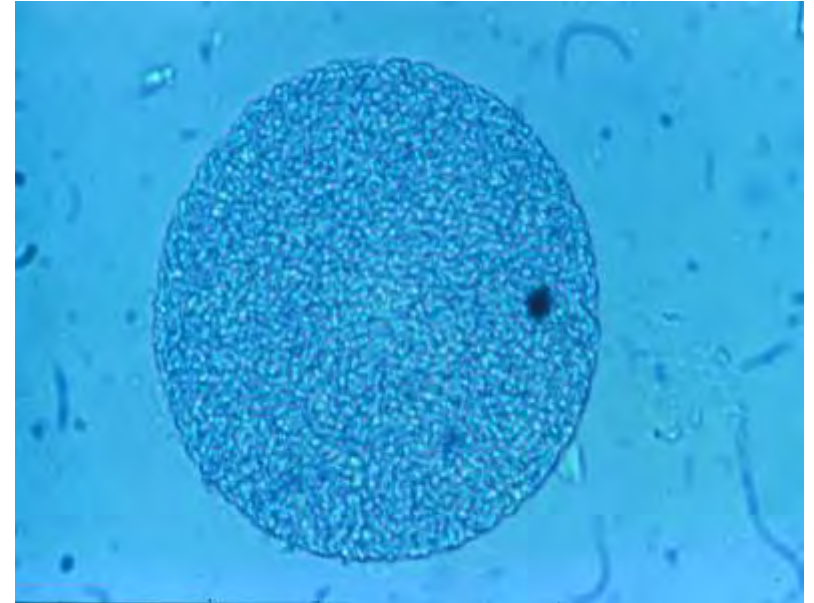
**Détection du toxoplasme par PCR**

**Examen essentiel et urgent**

**PRELEVEMENTS**  
 **multiples**  
 **fonction du contexte clinico-biologique**  
 **avant thérapeutique**



**SANG**  
**HUMEUR AQUEUSE**  
**LCR**  
**LBA**  
**MOELLE OSSEUSE**



**BIOPSIE**  
**musculaire**  
**cérébrale...**

# Diagnostic moléculaire Toxoplasmose et immunodépression

Compilation de résultats\*- Patients non traités  
PCR : spécificité élevée

SENSIBILITE Prélèvement	FORMES CLINIQUES TOXOPLASMOSE		
	cérébrale	disséminée	pulmonaire
<b>SANG</b>	<b>42%</b>	<b>100%</b>	<b>75%</b>
<b>LCR</b>	<b>59%</b>	<b>45%</b>	
<b>LBA</b>		<b>100%</b>	<b>100%</b>

\*d'après Bastien P. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002,96,S1205-215



# **PCR et suivi allogreffés de moelle osseuse Étude européenne multicentrique \***

## **EVALUER INTÉRÊT PCR SANG**

### **Méthode**

**PCR sang 1 fois/semaine (100<sup>ème</sup>j) puis tous les 15 jours 180<sup>ème</sup> j post-greffe patients immunisés**

### **Définitions :**

- **Toxoplasmose infection (TI) : PCR+ sang +/- fièvre.**
- **Toxoplasmose maladie (TM) : diagnostic clinique (encéphalite ++, formes polyviscérales) radiologique et PCR+ sang, LCR ou LBA.**

*\*Martino R et al. Clinical infectious diseases. 2005; 40: 67-78.*

# Analyse des données patients immunisés\*

**TI précède TM (J35 vs J64)**

- Incidence TI env. 16% et TM 6 %
  - EVOLUTION TI                      TM env. 38%
- PCR+ → traitement antitoxoplasmique
- Traitement TI + fièvre inexpliquée  
disparition fièvre et PCR -

**TM déclarée                      décès dans la moitié des cas**

**Thérapie précoce                      chances de guérison →**

**Intérêt d'un diagnostic précoce**

**PCR SANG NOUVEL OUTIL DE DIAGNOSTIC**

*\*Martino R et al. Clinical infectious diseases. 2005; 40: 67-78.*

# Facteurs de risque TOXOPLASMOSE

## Transplantés - Greffés de moelle

- **Greffés de moelle**  
Receveur immunisé  
en prégreffe/Donneur  
non immunisé
- **Transplantés**  
Receveur non immunisé  
en prégreffe/Donneur  
immunisé

**Les 6 premiers mois après la greffe**

**Diagnostic précoce / ↘ gravité**

**Immunodépression ++**

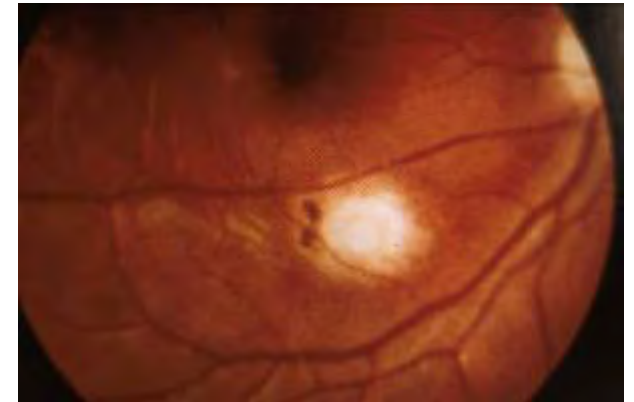
**Absence de prophylaxie anti-toxoplasmose.**

**PAS DE CONSENSUS au niveau SUIVI ID**

# Diagnostic moléculaire de la toxoplasmose oculaire

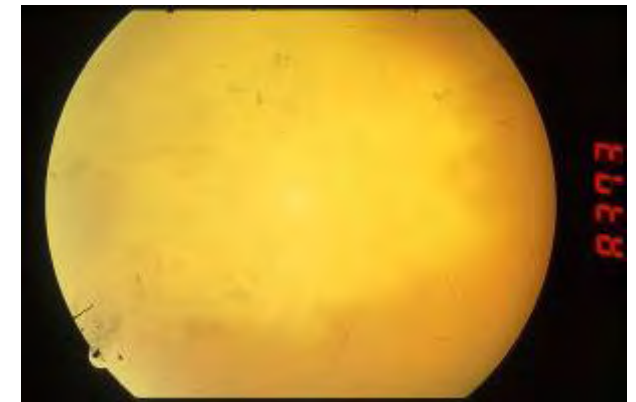
## Étude CHU TOULOUSE \*

- 60 Toxoplasmoses oculaires / 111 uvéites
- Sensibilité
  - PCR = 28%
  - Synthèse locale d'IgG : = 65%



Synthèse intraoculaire d'anticorps plus sensible que la PCR

Complémentarité des 2 tests  
**S = 77%**





## RESULTATS EN FONCTION DU STATUT IMMUNITAIRE

Statut	PCR+	Synthèse intraoculaire d' Ac IgG
immunitaire		
Immuno- compétents	11/49 (22%)	34/49 (69%)
Immuno- déprimés	6/11 (55%)	5/11 (45%)

**IMMUNODÉPRIMÉS : PCR significativement PLUS SENSIBLE que la synthèse intraoculaire d'IgG / immunocompétents.**

# **AUTRE APPLICATION TYPAGE DE SOUCHES DE TOXOPLASME**

**Typage souches non réalisé en pratique courante**

**Isolats type II**

- Très fréquent en pathologie humaine**
- France 85 % dans infections congénitales asymptomatiques ou cliniques (bénignes ou sévères) et des immunodéprimés**

**Autres génotypes Type I, recombinants ou atypiques**

- Rare et associés à des formes + sévères en particulier oculaire**

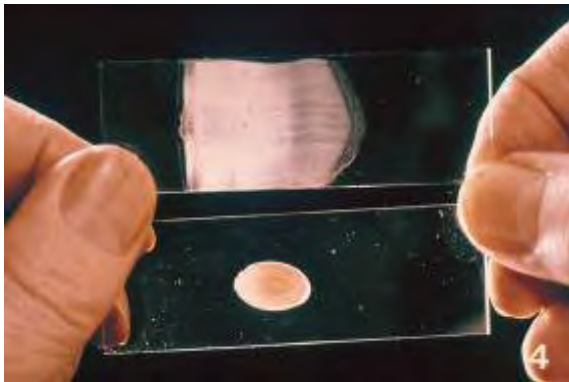
# **Autres applications de la biologie moléculaire en parasitologie**

## **PALUDISME**

**Infection très répandu en zone tropicale  
concerne plus de 2 milliards d'individus  
cause plus de 2 millions de décès chaque  
année**

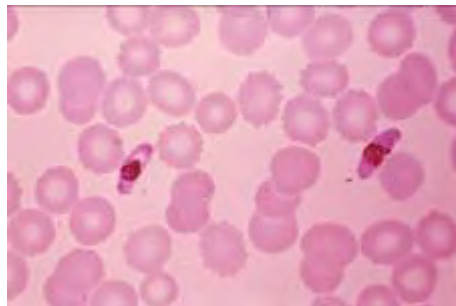
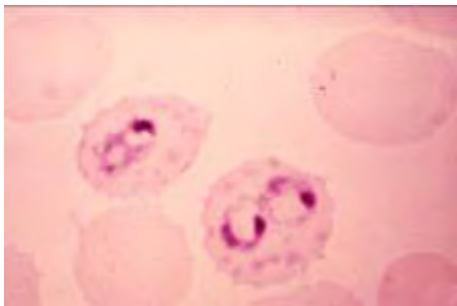
# DIAGNOSTIC DU PALUDISME D IMPORTATION EN PRATIQUE COURANTE

Morphologie  
frottis sanguin  
goutte épaisse



*trophozoïtes*

*gamétocytes*



*Plasmodium falciparum*

Détection de l'antigène HRP2  
spécifique de *P. falciparum*



négatif

positif

# **PCR appliqué au diagnostic du paludisme**

## **Laboratoire de parasitologie CHU Toulouse**

### **PCR**

- en temps réel**
- multiplex : diagnostic de genre et d'espèce**
- technique de référence sensible et spécifique**

**doit être réalisé si contexte clinique évocateur et examens courants négatifs**

**évite les examens itératifs**

# APPORT PCR diagnostic du paludisme

## ➤ Sensibilité

- Gain de 6 % / techniques conventionnelles
- Permet d'écarter un accès palustre évolutif
- Diagnostic de faible parasitémie : patients sous chimioprophylaxie mal adaptée ou immunisés vivant en zone d'endémie

## ➤ Identification d' espèce

parfois difficile sur le frottis sanguin après traitement ou prophylaxie *Pl.vivax* et *Pl.ovale*

## ➤ Diagnostic d'un polyparasitisme

# Autres applications LEISHMANIOSE VISCÉRALE

## PCR

- + sensible / diagnostic courant : sérologie, direct et culture moelle osseuse**
- PCR SANG 97% / 55% culture**
  - MOELLE OSSEUSE 100% versus 81%**
- précoce**
- évite un prélèvement de moelle osseuse**
- diagnostic de faible parasitémie immunodéprimés et rechute lors de suivi thérapeutique**

# **Autres diagnostics par PCR**

**Nombreuses applications possibles**

**Amibiase**

**SI IMMUNODEPRESSION**

**Cryptosporidies,**

**Microsporidies,**



# Diagnostic biologique d'une parasitose

## CHOIX METHODES

fonction de la  
parasitose  
du contexte  
bioclinique  
épidémiologique



morphologie  
ou/et  
sérologie  
ou/et  
PCR

**PCR**

**RAPIDE  
SIMPLE  
SENSIBLE  
SPECIFIQUE**

**Améliore le  
diagnostic direct  
d'une parasitose**



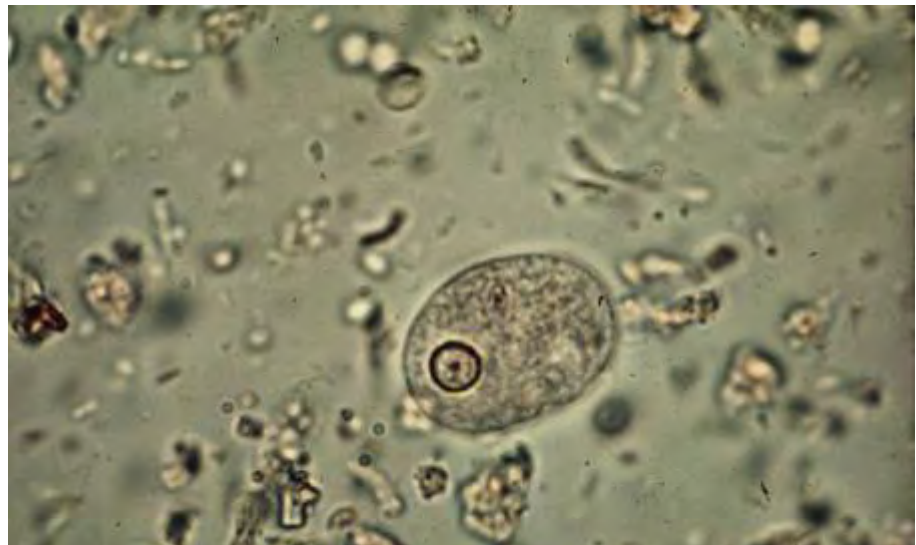
**OXYURE ADULTE**



**ŒUF SCHISTOSOMA HAEMATOBIIUM**



**LARVE ANGUILLULE**



**TROPHOZOÏTE ENTAMOEBA HISTOLYTICA**

## **LIMITES TECHNIQUE PCR**

### **EVITER FAUX NÉGATIFS**

- prélever**
  - avant traitement**
  - plusieurs sites en fonction pathologie**

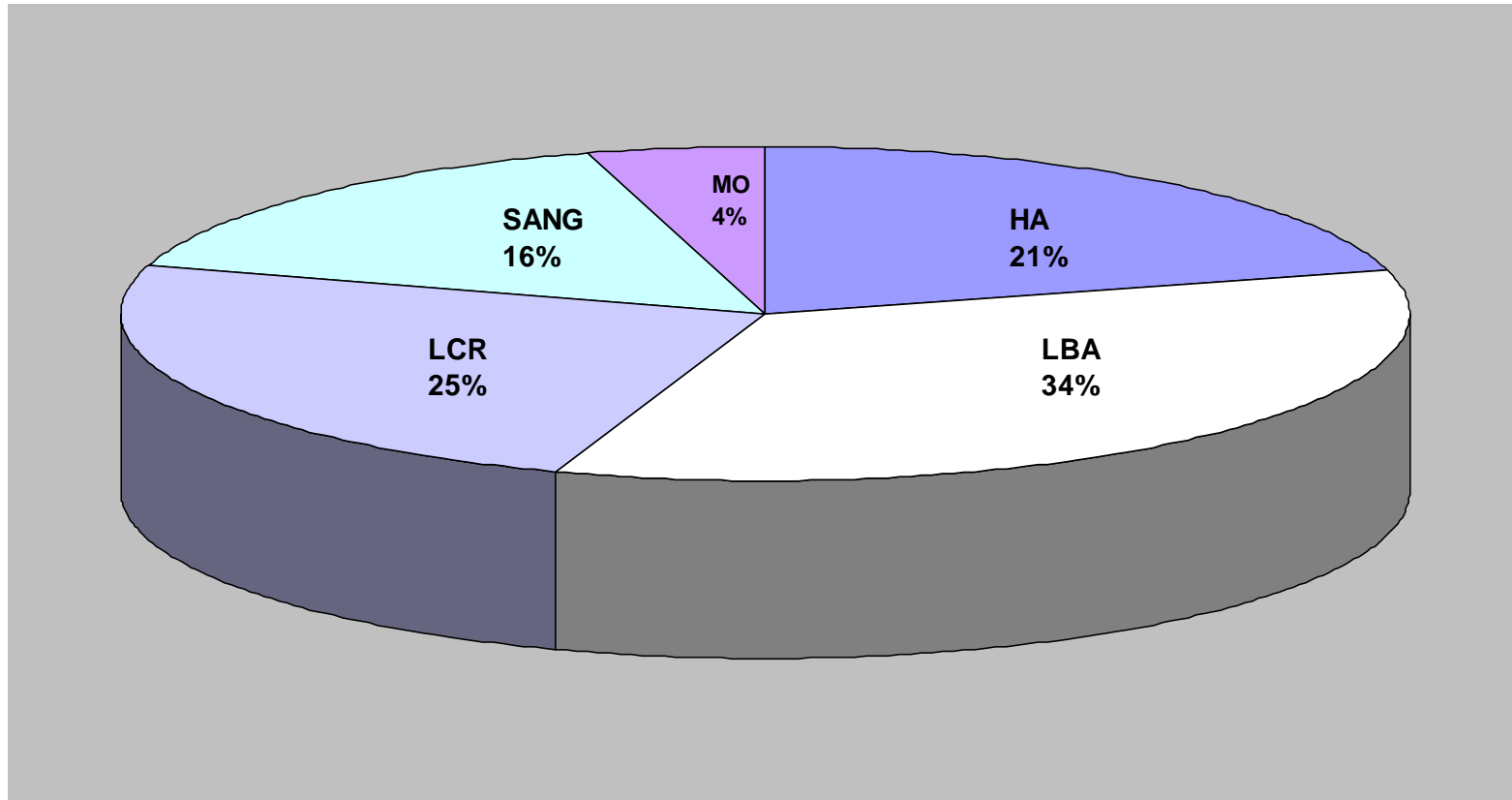
**Seuls ont une valeur les résultats positifs**

- PCR réalisée dans des laboratoires spécialisés**
- AMELIORATION PCR temps réel**

# Diagnostic moléculaire Toxoplasmose

Répartition des prélèvements positifs en PCR

Laboratoire de parasitologie CHU Toulouse



**134 prélèvements**