

Examen parasitologique des selles : recommandations françaises ANOFEL/LABAC

Xavier Iriart^{1,2}, Philippe Poirier^{2,3,4}, Damien Costa^{2,4,5}, Frédéric Dalle^{2,4,6}, Noémie Coron^{7,8}, Nicolas Argy^{2,9}, Loïc Favennec^{2,4,5}, Elodie Pernot-Marino^{8,10}, Stéphanie Haim-Boukobza^{8,11}, Jean-Marc Giannoli^{8,12}, Frédéric Gabriel^{2,13}, Florence Robert-Gangneux^{2,14}

¹Service de Parasitologie-Mycologie, Institut Fédératif de Biologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Toulouse, France

²Collège des Enseignants de Parasitologie et Mycologie médicales (ANOFEL), France

³Service de Parasitologie-Mycologie, CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

⁴Centre National de Référence des Cryptosporidioses, Microsporidies et Autres Protozooses digestives (CNR CMAP), France

⁵Service de Parasitologie-Mycologie, CHU de Rouen, Rouen, France

⁶Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Dijon, Dijon, France

⁷Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Biogroup côte d'Azur, Mouans-Sartoux, France

⁸Réseau de Laboratoires de biologie médicale accrédités (LABAC), France

⁹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, APHP, Paris, France

¹⁰Laboratoire de microbiologie, CAB, Biogroup-Grand Est, Strasbourg, France

¹¹Cerballiance, CerbaHealthCare, Issy-les-Moulineaux, France

¹²Cerballiance, Cerba HealthCare, AURA, plateau technique de Lyon-Bron, France

¹³Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

¹⁴Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Rennes, 2 rue Henri Le Guilloux, 35000 Rennes, France

Correspondance F. Robert-Gangneux, florence.robert-gangneux@univ-rennes.fr

Mots-clés

parasitologie, examen parasitologique des selles, accréditation, méthode

Résumé

L'examen parasitologique des selles est une analyse difficile, du fait de la diversité des parasites à rechercher selon le contexte d'exposition et le terrain du patient, et leur recherche se fait traditionnellement par différentes méthodes de concentration suivies d'une lecture microscopique qui requiert une expertise. La cotation de cet examen à la nomenclature des actes de biologie médicale est devenue obsolète, du fait du développement des techniques de biologie moléculaires et des modifications épidémiologiques constatées. Les techniques de détection des acides nucléiques actuellement commercialisées, souvent en panel multiplex, ne devraient pas être utilisées sans une connaissance de leurs limites en termes de pertinence de panel de parasites détectés et de performances techniques. Ces recommandations visent à guider biologistes et auditeurs du COFRAC dans le choix des techniques et la mise en œuvre de l'examen parasitologique des selles, pour un service médical rendu optimum.

Parasitological examination of stools: french ANOFEL/LABAC recommendations

Key words

parasitology, stool parasites, lab accreditation, diagnostic methods

Abstract

Parasitological examination of stools is a challenging analysis due to the diversity of parasites to be screened for, depending on the exposure context and patient background. Parasite detection is traditionally performed using direct wet mount and various concentration methods followed by microscopic reading, which requires expertise. The quotation of this analysis in the nomenclature of medical biology procedures has become obsolete due to the development of molecular biology techniques and epidemiological changes. Currently commercialized nucleic acid detection techniques, often in multiplex panels, should not be used without an understanding of their limitations

Article reçu le 13 juin 2025, accepté le 26 juin 2025

Pour citer cet article : Iriart X, Poirier P, Costa D, Dalle F, Coron N, Argy N, Favennec L, Pernot-Marino E, Haim-Boukobza S, Giannoli J-M, Gabriel F, Robert-Gangneux F. Examen parasitologique des selles : recommandations françaises ANOFEL/LABAC. *Ann Biol Clin* 2025 ; 83(4) : 1-21. doi : 10.1684/abc.2025.1986

in terms of the relevance of the panel of parasites detected and technical performance. These recommendations aim to guide biologists and COFRAC auditors regarding the implementation of parasitological examination of stools, the choice of techniques and their limitations, for optimal medical care.

1. Introduction et objectifs

La recherche de parasites dans les selles est un examen couramment effectué en laboratoire de biologie médicale (LABM), qu'il soit privé ou hospitalier, mais nécessite une expertise particulière, du fait de la diversité des parasites potentiellement retrouvés dans les selles, et de la difficulté de leur identification par microscopie. Actuellement, cet examen est guidé par la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM), qui n'est plus en adéquation avec les nouvelles tendances épidémiologiques et les techniques récentes de diagnostic moléculaire, commercialisées ou « maison ». Les techniques d'amplification des acides nucléiques (TAAN) figurent depuis plusieurs années au répertoire des actes innovants hors nomenclature (RIHN), et leur utilisation par les laboratoires est fréquente malgré le manque de recommandations.

Dans ce contexte, le Collège des enseignants de Parasitologie et Mycologie médicales (ANOFEL) a été consulté par l'association LABAC (Association des Laboratoires accrédités) pour émettre des recommandations d'experts, en accord avec la Société Française de Parasitologie, destinées à guider l'audit des LABM par le COFRAC et à améliorer les pratiques professionnelles.

Le but de ce travail a été de fixer un cadre pour la réalisation de l'examen parasitologique des selles (EPS), en intégrant les approches d'amplification des acides nucléiques, et en tenant compte de la situation épidémiologique française en 2024 et du contexte de l'examen, pour un service médical rendu optimal. Ces recommandations ont été présentées lors d'une journée Conférence ANOFEL-LABAC le 11 septembre 2024.

La Haute Autorité de Santé (HAS), saisie pour évaluer les actes RIHN pertinents en vue d'une inscription à la NABM, a rendu un rapport sur l'utilisation des TAAN dans la prise en charge des infections gastro-intestinales le 14 septembre 2024 [1]. Cependant, la recommandation finale n'a concerné que les panels TAAN pertinents dans le cadre de syndromes diarrhéiques, et n'a pas pris totalement en compte l'avis du Centre National de Référence des Cryptosporidioses, Microsporidies et autres protozooses digestives (CNR CMAP), sollicité par la Société Française de Parasitologie pour répondre à la HAS.

Les recommandations ANOFEL-LABAC ne sont donc pas tout à fait superposables à celles figurant dans le rapport de la HAS, et tiennent compte de l'évolution épidémiologique constatée.

2. Méthodologie

- Constitution d'un groupe de travail comprenant des membres experts issus du CNR CMAP, de parasitologues hospitalo-universitaires ayant une expertise dans le diagnostic des parasitoses digestives et de biologistes médicaux issus de LABM privés responsables de l'activité de parasitologie.
- Consultation du CNR CMAP pour le recueil de données épidémiologiques.
- Enquête épidémiologique auprès de LABM privés et services de Parasitologie des CHU sur la prévalence de détection d'helminthes sur 3 ans (2021-2023).
- Analyse bibliographique : recueil des données de la littérature sur l'évaluation de TAAN versus microscopie.

3. Définition des parasites à rechercher en fonction du contexte

3.1. Données épidémiologiques

Grâce au recensement annuel des activités d'examen parasitologique des selles proposé par le CNR CMAP depuis plusieurs années, auquel participent les LABM publics et de plus en plus de LABM privés, des données épidémiologiques sur la prévalence des protozooses intestinales sont disponibles. Selon ces données déclarées (non exhaustives), sur 225 000 selles analysées en 2023 (56 000 provenant de CHU et 169 000 de LABM), *Giardia intestinalis* a été détecté dans 3 410 cas (1,5 %), *Cryptosporidium* spp. a été détecté dans 3 297 cas pour 199 000 recherches spécifiques réalisées (1,7 %), quant aux microsporidies, 485 cas ont été détectés pour 69 000 recherches spécifiques (0,7 %). La détection de *Cyclospora* spp. et *Entamoeba histolytica* était plus modeste. Par ailleurs, la détection de *Blastocystis* spp. et *Dientamoeba fragilis* était massive (23 % et 14 %, respectivement), en lien avec l'utilisation accrue de panels PCR multiplex.

D'autre part, une enquête menée *via* les laboratoires des CHU et du réseau des laboratoires privés (Biogroup et Cerballiance) participant au groupe de travail, a permis d'évaluer la prévalence des helminthoses sur la période 2021-2023, dans le but de conforter/compléter les données récemment publiées par Moniot et al. [2]. Cette enquête a montré qu'*Enterobius vermicularis* et *Taenia saginata* étaient les helminthes le plus souvent détectés en France métropolitaine, suivis par *Schistosoma* spp. et *Strongyloides stercoralis* (données en cours de publication).

3.2. Définition des parasites à rechercher à l'EPS

Sur la base de ces données épidémiologiques et de la gravité potentielle de certaines parasitoses,

deux niveaux d'exigences en termes de panel de détection de parasites ont été définis pour l'EPS, selon le contexte clinique (tableau 1). Il est donc impératif de recueillir des renseignements cliniques concernant le patient et ses risques d'exposition, pour sélectionner le panel de détection à mettre en œuvre. Les renseignements cliniques à obtenir sont détaillés en §3.4.

Il est de la responsabilité du Laboratoire de choisir les techniques adaptées pour atteindre l'objectif visé, en termes de panel de parasites à détecter et de performances de méthode.

3.2.1. Justification du panel minimal

Les données épidémiologiques françaises du CNR CMAP montrent que *Cryptosporidium* spp. est maintenant le troisième protozoaire le plus prévalent en France, après *Blastocystis* spp. (18 %) et *D. fragilis* (5 %), mais le premier pathogène, considérant la pathogénicité non prouvée de *Blastocystis* spp. et *D. fragilis*. Les cas de cryptosporidiose touchent les patients immunodéprimés et immunocompétents : en effet, 73 % des cas

Tableau 1. Définition des parasites à rechercher lors d'un EPS selon la situation.

Panel minimal : autochtone ou voyage en Europe occidentale	Panel élargi : voyage hors Europe occidentale ou immunodépression ou polynucléaires éosinophiles sanguins > 500/mm ³ ou signes cliniques persistants ou risque identifié sur questionnaire*
<i>Giardia intestinalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp. <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Enterocytozoon bieneusi</i> et <i>Encephalitozoon</i> spp. <i>Enterobius vermicularis</i> (oxyure) <i>Taenia</i> spp. <i>Strongyloides stercoralis</i> (anguillule)	Panel minimal plus : <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Cystoisospora belli</i> <i>Sarcocystis</i> spp. <i>Schistosoma</i> spp. <i>Trichuris trichiura</i> <i>Necator</i> et <i>Ancylostoma</i> spp. (ankylostomidés) <i>Hymenolepis nana</i> <i>Dibothriocephalus</i> spp. Douves

*Point d'appel lié au questionnaire §3.4.

déclarés au CNR CMAP depuis 2017 concernent des patients sans immunodépression connue, les populations les plus touchées étant les jeunes enfants (< 5 ans) et les jeunes adultes (20-34 ans) [3, 4]. De plus, 79 % des cas de cryptosporidiose ont été diagnostiqués chez des patients sans notion de séjour récent hors de France hexagonale. Ainsi ces données justifient la recherche de *Cryptosporidium* spp. dans un panel de première intention en milieu communautaire chez des sujets ayant des diarrhées. En outre, la généralisation de la recherche des cas de cryptosporidiose renforcera les connaissances épidémiologiques associées à cette parasitose et facilitera la détection des épidémies. De même, chez le sujet immunodéprimé souffrant de diarrhée, la recherche de *Cryptosporidium* spp. se justifie pleinement compte tenu de sa prévalence mais aussi d'un taux de létalité associé à la cryptosporidiose atteignant 8 % chez ces patients [5].

Concernant la giardiose, sa prévalence est estimée à 1,5 % d'après les données citées ci-dessus. Il s'agit d'une parasitose ubiquitaire, pour laquelle des formes chroniques et des cas de résistance aux traitements antiparasitaires sont de plus en plus souvent rapportés en France. Ainsi, la recherche systématique de *G. intestinalis* en panel de première intention se justifie et permettrait une meilleure prise en charge des formes chroniques et/ou résistantes aux traitements. Par ailleurs, l'acquisition de connaissances épidémiologiques sur les giardioses facilitera la détection des épidémies en France.

La dysenterie amibienne à *E. histolytica*, à forte prévalence en zone intertropicale, est une infection potentiellement mortelle. Ce parasite doit donc être recherché chez les personnels travaillant dans la restauration et son portage asymptomatique ne doit pas être ignoré pour deux raisons : il peut conduire ultérieurement à une amoebose hépatique dont le pronostic est sévère, et il peut être à l'origine d'une transmission autochtone en zone de plus faible endémicité.

L'évolution des connaissances et des outils de diagnostic nous amènent à positionner le diagnostic des microsporidioses intestinales en recherche systématique lors de la réalisation d'un EPS, malgré le classement par la HAS en recherche de deuxième intention (cf. §3.3.). En effet, les données de surveillance issues du CNR CMAP montrent que les microsporidioses sont également des infections courantes du patient immunocompétent [5]. Une enquête flash réalisée auprès de 9 LABM de ville entre le 01 juin 2024 et le 30 novembre 2024 permet de confirmer qu'il s'agit de la troisième étiologie de diarrhées causées par un eucaryote pathogène (avec une prévalence moyenne de 0,93 % dans une population de 25 271 patients), après *Cryptosporidium* spp. et *G. intestinalis* (respectivement 1,26 % sur 19 815 patients, et 1,20 % sur 11 418 patients) lors de la même enquête. Les données du CNR CMAP sur 363 patients immunocompétents diagnostiqués avec une microsporidiose entre 2018 et 2024 montrent que 95,6 % d'entre eux étaient symptomatiques au moment du diagnostic. Dans plus de 80 % des cas, les patients n'avaient pas voyagé récemment hors de France métropolitaine, confirmant le caractère principalement autochtone de la contamination. Une diarrhée était présente dans 92,7 % des cas. Au total, 3,90 % de ces patients ont été hospitalisés pour la prise en charge symptomatique de l'infection (< 14 ans dans 50 % des cas). Ces données sont cohérentes avec les tableaux cliniques décrits lors des épidémies de Suède [6] et du Danemark [7], rapportant respectivement la présence de diarrhées chez 82 % et 90 % des sujets atteints, avec dans 50 % des cas une symptomatologie durant plus d'une semaine, et dans 20 % des cas plus de deux semaines. Les données du CNR CMAP montrent également que chez l'immunocompétent, les quantités de pathogènes excrétés sont équivalentes à celles des patients immunodéprimés.

La recherche d'*E. vermicularis* (oxyure) et *Taenia* spp. de façon systématique se justifie par la fréquence d'observation de ces parasitoses en France [2].

L'anguillulose, souvent asymptomatique ou de symptomatologie aspécifique, est sous-diagnostiquée. La durée de vie du parasite est de plusieurs dizaines d'années, avec un cycle d'auto-infestation possible, permettant à l'infection de perdurer de nombreuses années après l'événement infectant. Les cas sont graves chez l'immunodéprimé (attention notamment aux immunodépresseurs chimio-induits) [8], ce qui a conduit le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) à recommander en août 2023 la réalisation de la sérologie anguillulose chez les receveurs ou donneurs d'organes. Le diagnostic d'anguillulose nécessite des techniques biologiques spécifiques (PCR ou techniques de concentration spécifiques). Actuellement, ces techniques ne sont pas réalisées de façon systématique en l'absence d'indication médicale sur la prescription.

L'anguillulose est en recrudescence en Europe en raison de l'afflux de migrants et de l'augmentation de la fréquence des voyages en zones d'endémie. Rappelons qu'en Europe, elle est présente à nos frontières (Espagne, Italie, Europe de l'Est) [9, 10]. De plus, l'anguillulose est présente en France d'Outre-Mer (Martinique, Guadeloupe, Guyane, Réunion) [11], et depuis quelques années, des cas autochtones ont été publiés (autour d'anciennes mines de charbon, en région Midi-Pyrénées, autour du bassin d'Arcachon) [12, 13]. Très récemment, Develoux et al. [14] ont rapporté des cas chez des hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes originaires de pays tropicaux. Pour l'ensemble de ces raisons, nous préconisons de rechercher *S. stercoralis* en panel de première intention.

3.2.2. Justification du panel élargi

Le panel de seconde intention (tableau 1) complète les recherches avec trois protozoaires responsables de diarrhées et la plupart des helminthes non détectés dans le panel de première intention. Ces parasites doivent être recherchés en cas de signes cliniques persistants et une recherche initiale négative (y compris en bactériologie et

virologie), ou en cas de voyage hors d'Europe occidentale, de consommation d'aliments à risque, de polynucléaires éosinophiles $> 500/\text{mm}^3$ de sang ou d'immunodépresseur. La réalisation du panel élargi est guidée par le questionnaire à soumettre au patient lors du recueil de l'échantillon de selles (voir §3.4).

Bien que couramment décrite chez l'immunodéprimé, la cystoisosporose peut être responsable de diarrhées chez l'immunocompétent [15]. En effet, 30 % des cas recensés par le CNR CMAP entre 2023 et 2024 concernaient des patients immunocompétents.

Des cas de diarrhées à *Cyclospora cayetanensis* sont régulièrement décrits chez des voyageurs de retour du Mexique, Indonésie ou Turquie. L'ECDC a rapporté en 2017 une augmentation de l'incidence des cas en provenance du Mexique, en soulignant une probable sous-estimation en France par défaut diagnostique, par rapport au Royaume-Uni [16].

Bien que méconnue, la sarcocystose intestinale est une parasitose relativement fréquente. En l'absence de panel PCR commercial incluant cette cible, le diagnostic repose sur la microscopie ou des PCR « maison ». Ainsi, cette parasitose reste sous-diagnostiquée puisque le CNR CMAP n'a pu recenser que 18 cas entre 2023 et 2024, dont 16 étaient symptomatiques (diarrhées et douleurs abdominales). Néanmoins, une étude en cours de publication réalisée chez 945 patients montre un taux de positivité de 4 % (38 patients diagnostiqués par PCR et dont un seul était positif en microscopie) chez des patients ayant bénéficié d'un EPS.

Le panel élargi doit également permettre de rechercher les helminthes non détectables dans le panel de première intention, mais qui peuvent être à l'origine de signes cliniques digestifs. Parmi ces helminthes, on retrouve notamment les schistosomes qui touchent, selon l'OMS, plus de 250 millions de personnes dans le monde dont 90 %

vivent en Afrique¹. Du fait de l'arrivée de migrants en Europe, notamment africains, la détection des agents de schistosomoses intestinales (dont *Schistosoma mansoni*) est relativement fréquente en France hexagonale. Les infections à *S. mansoni* constituent ainsi la troisième helminthose, après les téniasis et les oxyuroses (enquête nationale helminthoses 2021-2023, données en cours de publication). Cependant, il n'existe pas de risque de contamination autochtone avec les espèces de schistosomes à l'origine des formes intestinales. De ce fait, la notion de « voyage hors d'Europe occidentale » permettra d'orienter vers le panel élargi comprenant « *Schistosoma* spp. », justifiant de ne pas mettre cette cible dans le panel minimal.

Selon l'enquête nationale helminthoses menée sur la période 2021-2023, les autres helminthes digestifs sont plus rares en France hexagonale, retrouvés avec des fréquences de détection inférieures à 0,02 % (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ankylostomidés, *Hymenolepis* spp., *Dibothriocephalus* spp. ou les douves digestives [*Fasciola* spp., *Fasciolopsis buski*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Clonorchis sinensis*, *Metagonimus yokogawai*, *Opisthorchis* spp., *Heterophyes* spp., *Metorchis* spp., *Echinostoma* spp....]), justifiant leur placement dans le panel élargi.

3.3. Approche syndromique de la diarrhée aiguë communautaire

Ces recommandations font écho au rapport de la HAS, publiées en novembre 2024, concernant l'intérêt des TAAN dans la prise en charge médicale des infections gastro-intestinales [1]. Ce rapport propose *in fine* un algorithme décisionnel de prise en charge par TAAN multiplex en cas de suspicion de diarrhée infectieuse et décline la composition de deux panels parasitaires (un panel de première intention et un panel de deuxième intention). Contrairement à l'avis donné par le CNR

CMAP d'intégrer systématiquement en panel de première intention la recherche de microsporidies, cette dernière n'est recommandée par la HAS en première intention que chez les immunodéprimés, ce qui n'est plus en accord avec l'épidémiologie actuelle [5].

En se focalisant uniquement sur la symptomatologie diarrhéique, telle que définie par l'HAS (3 selles liquides/j ou plus fréquentes qu'habituellement, évoluant depuis moins de 14 jours), quel que soit le statut immunitaire du patient, les recommandations communes du groupe LABAC/ANOFEL-CNR CMAP peuvent se réduire aux cibles décrites dans le [tableau 2](#).

Le panel diagnostique des diarrhées communautaires ne comprend donc que des protozoaires et les microsporidies. Les justifications sont décrites plus haut (§3.2).

Cependant, en cas de diarrhées prolongées avec un panel de première intention négatif (ainsi que les panels bactériologique et virologique) ou de retour de voyage hors Europe occidentale depuis moins de 15 jours, le laboratoire doit aussi mettre en place le panel de deuxième intention ciblant d'autres parasites responsables de diarrhées aiguës.

Attention : Ces panels « diarrhées aiguës » ne doivent pas se substituer à l'examen parasitologique des selles décrit dans les paragraphes précédents. L'EPS permet en effet de détecter l'ensemble des parasites digestifs à l'origine d'in-

Tableau 2. Définition des panels diagnostiques des diarrhées aiguës.

Panel de première intention : autochtone ou voyage en Europe occidentale	Panel de deuxième intention : voyage hors Europe occidentale ou immunodépression
<i>Giardia intestinalis</i>	Panel de première intention plus :
<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cystoisospora belli</i>
<i>Enterocytozoon bieneusi</i> et <i>Encephalitozoon</i> spp.	<i>Sarcocystis</i> spp.

¹ <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>

fections intestinales, notamment les helminthes, pouvant entraîner des diarrhées plus ou moins prolongées et intermittentes et des symptômes cliniques beaucoup plus variés que la simple « diarrhée aiguë ». Ainsi, ces panels ciblés « diarrhées aiguës » n'ont d'intérêt que dans le cadre d'une recherche syndromique infectieuse associant un diagnostic bactériologique et virologique. D'autre part, cette « Approche syndromique de la diarrhée aiguë » n'a pour l'instant, pas été inscrite à la NABM.

3.4. Renseignements cliniques

Les renseignements cliniques que le LABM doit recueillir activement sont :

- Consommations d'aliments à risque : viande crue/insuffisamment cuite, poisson cru, plantes « aquatiques » en salade (cresson, pissenlit, roquette), eau du robinet/de puits, crudités non lavées².
- Signes cliniques : type (diarrhée, douleurs abdominales ou épigastriques, fièvre, cutanés, autres), date de début, durée, périodicité, traitement modifiant le transit.
- Symptômes similaires dans l'entourage (signes digestifs).
- Voyage hors d'Europe occidentale¹ (France, Royaume-Uni, Europe du nord, Suisse, Italie, Espagne, Portugal, Allemagne, Autriche) : pays ou zone continentale, dates approximatives, type de séjour (au moins sur les cinq dernières années).
- Si migrant¹ : pays d'origine et pays/zones géographiques traversé(e)s.
- Immunodépression¹ : traitement immunosuppresseur, transplantation d'organes solides, greffe de moelle osseuse, VIH, ID congénitale, autre cause.
- Polynucléaires éosinophiles¹ > 500/mm³ de sang (si possible).

² Renseignements permettant de justifier la mise en œuvre du panel élargi.

- Traitement antiparasitaire récent : date de fin de traitement et molécule utilisée.
- Profession (plombier, égoutier, mineur, contact avec les jeunes enfants).
- Loisirs (baignades en eau douce, piscine).

3.5. Mise en œuvre des panels au laboratoire

Les recommandations du groupe de travail sont les suivantes et graduées dans le [tableau 3](#) :

- Le laboratoire doit mettre en œuvre une procédure permettant de recueillir les renseignements cliniques nécessaires à l'exécution de l'EPS selon le panel recommandé.
- En l'absence de renseignements cliniques (cas qui doit rester marginal), la mise en œuvre du panel large (association des deux panels) est recommandée
- Devant un résultat d'EPS négatif sur 3 selles et recherches négatives également en bactériologie/virologie, avec persistance des symptômes et renseignements cliniques pertinents en faveur d'une origine parasitaire, le prélèvement doit être transmis à un laboratoire expert (CHU).

Tableau 3. Gradation des recommandations de choix des panels de détection.

Recommandé	<ul style="list-style-type: none"> - Recueil systématique des renseignements cliniques et sélection pertinente des parasites à rechercher grâce au panel le mieux adapté - Sélection des méthodes pertinentes à mettre en œuvre
Acceptable	<p>En absence de renseignements cliniques, mise en œuvre des 2 panels</p> <ul style="list-style-type: none"> - En absence de renseignements cliniques, mise en œuvre du panel minimal uniquement - Non-transmission à un laboratoire expert dans les situations suivantes :
Non acceptable	<ul style="list-style-type: none"> • Prescription explicite ou renseignements cliniques indiquant une recherche non réalisable au laboratoire (ex : schistosomose) • Dans un contexte de symptômes persistants et recherches négatives

4. Recommandations pré-analytiques

4.1. Nombre de prélèvements

La ponte des œufs d'helminthes n'est pas quotidienne, et il est nécessaire d'espacer les prélèvements de quelques jours (3 selles sur 7 à 10 jours). Par ailleurs, les délais de ponte ne sont pas les mêmes pour tous les helminthes (tableau 4). Plusieurs études ont montré que la sensibilité de détection des helminthes augmente avec le nombre d'échantillons analysés [17, 18].

Pour l'émission des protozoaires, cette recommandation est moins nette. Cependant, un EPS est réalisé pour rechercher à la fois protozoaires et helminthes, et donc le nombre et la fréquence des prélèvements s'appliquent. Une étude récente a cependant montré que le diagnostic moléculaire est généralement capable de détecter un protozoaire dès la première selle [19].

Globalement, les recommandations sont de réaliser un EPS sur trois prélèvements espacés de quelques jours (tableau 5).

Tableau 4. Délais d'émission des œufs d'helminthes après infestation (d'après [20]).

Parasite	Délai d'émission des œufs d'helminthes après infestation
Oxyure	3 semaines
Ascaris	2 mois
Trichocéphale	1 mois
<i>Taenia</i> spp.	3 mois
Anguillule	3 à 4 semaines
Ankylostomidés	5 à 6 semaines
Schistosomes intestinaux	2 mois
Bothriocéphale	3 à 6 semaines
Grande douve et petite douve	2 à 3 mois
Autres douves	4 semaines

Tableau 5. Gradation des recommandations sur le nombre d'échantillons à analyser.

Recommandé	Réalisation de l'examen sur 3 selles sur 7 à 10 jours, idéalement espacées d'au moins 2 jours, même si positivité du premier et/ou deuxième échantillon(s)
Acceptable	Réalisation de l'examen sur moins de 3 selles avec rédaction d'un commentaire sur le compte-rendu indiquant les limitations au prescripteur
Non acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - Plusieurs selles réalisées le même jour - Réalisation de l'examen sur moins de 3 selles sans commentaire sur le compte-rendu indiquant les limitations au prescripteur

4.2. Acheminement et conservation des selles

4.2.1. En cas d'analyse par microscopie

La fixation des selles permet la préservation des formes les plus labiles (formes végétatives de *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*...) pour l'examen microscopique (tableau 6).

Les techniques de fixation peuvent être : merthiolate-iode-formol (MIF), acide acétique-acétate de sodium-formol (SAF), formol 10 %, bichromate de potassium 2,5 à 5 % [20].

Cependant, les colorations spécifiques nécessaires à la recherche des coccidies par microscopie ne peuvent pas être réalisées sur selles déjà fixées avec certains solvants (MIF, éosine...). Seul le SAF et le bichromate de potassium sont compatibles avec d'autres colorations [21]. De plus, l'utilisation de la PCR est très souvent incompatible avec les milieux de fixation ou de préservation usuels [22-24]. Il est donc recommandé de ne pas fixer l'intégralité des selles lorsqu'une recherche de coccidies est réalisée en microscopie ou si le laboratoire utilise une stratégie de diagnostic mixte (PCR/Microscopie). *A minima*, il sera nécessaire de vérifier les compatibilités entre le fixateur utilisé et la technique de coloration/PCR

Tableau 6. Gradation des recommandations de conservation des selles destinées à l'examen microscopique.

Recommandé	<ul style="list-style-type: none"> - Pour l'examen microscopique des formes végétatives : fixation après émission - Pour la recherche de larves d'anguillules, conserver les selles jusqu'à 48 heures à TA - Ne pas fixer l'intégralité des selles si recherche de coccidies/microsporidies en microscopie ou utilisation d'une stratégie de diagnostic incluant de la PCR
Acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de fixation et conservation à température ambiante si examen direct réalisé dans les 12 heures, avec mention de la limitation sur le compte-rendu - Pas de fixation si détection des protozoaires par PCR - Conservation à +4°C si la recherche d'anguillules est réalisée par PCR
Non acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de fixation et recherche de protozoaires par microscopie seule, sans mention de la limitation de l'examen dans le compte-rendu - Fixation de l'ensemble du prélèvement avec un solvant inadapté à la recherche microscopique des coccidies (en cas de recherche microscopique seule des coccidies) ou à la réalisation de PCR - Conservation à +4 °C si la recherche d'anguillules est réalisée par technique de Baermann ou coproculture

envisagée. Ce commentaire vaut également pour la recherche des microsporidies par microscopie.

Les larves rhabditoïdes et strongyloïdes d'anguillules peuvent survivre à température ambiante (TA) plusieurs jours et ne nécessitent pas de fixation [25, 26].

4.2.2. En cas d'analyse par PCR

Lorsque l'examen parasitologique des selles est réalisé (au moins partiellement) à l'aide de techniques moléculaires (PCR), les recommandations

concernant la conservation des selles avant examen, peuvent différer par rapport à celles existantes pour les méthodes microscopiques.

En effet, certains milieux de fixation ou de préservation ne doivent pas être utilisés car ils entraîneraient une diminution notable des performances des PCR, voire une absence de détection. C'est notamment le cas du formol ou de ses dérivés [22-24, 27], du SAF, de l'alcool polyvinylique de faible viscosité ou de certains fixateurs prêts à l'emploi [27].

À l'inverse, plusieurs publications montrent qu'une conservation à +4 °C des échantillons de selles permet d'éviter toute altération de l'ADN parasitaire cible, jusqu'à une semaine après le début du stockage [22, 23, 28, 29]. En plus d'une conservation à +4 °C, l'utilisation de milieu de préservation compatible avec les PCR est possible, comme le milieu Cary-Blair [30], le bichromate de potassium (2,5 à 5 %) ou l'éthanol absolu, mais ne semble avoir que peu d'influence sur la conservation à 7 jours par rapport à l'effet de la température elle-même [23, 28]. De plus, l'utilisation de ces milieux entraîne une dilution de l'échantillon de selles, ce qui pourrait potentiellement altérer la détection moléculaire chez des patients faiblement parasités. La congélation des échantillons de selles est une alternative, n'entraînant pas de perte de sensibilité de détection par PCR [22, 28, 29].

D'autre part, il est considéré acceptable de conserver l'échantillon de selles 24 heures à température ambiante, avant passage à +4 °C. Ce délai permet notamment, lorsque cela est nécessaire, de réaliser des techniques microscopiques complémentaires aux PCR, sans que l'échantillon ne subisse de dégradations liées au placement à +4 °C (lyse des formes végétatives de protozoaires et des larves d'anguillules) [20]. Durant ce délai, la dégradation de l'ADN contenu dans les œufs et les kystes est probablement proche de zéro et l'on peut considérer que, même si les formes végétatives étaient lysées, l'essentiel de l'ADN de ces stades resterait présent dans l'échantillon et pourrait ensuite être détecté par PCR.

Au-delà d'une semaine, les échantillons de selles toujours maintenus à +4 °C ne semblent subir que peu d'altération de l'ADN, et ce jusqu'à un mois [22, 23, 28]. Passé ce délai, certains auteurs préconisent plutôt un stockage dans de l'éthanol ou du bichromate de potassium à +4 °C, ce qui donnerait de meilleurs résultats, notamment pour les kystes de *G. intestinalis* [23]. Cependant, cette situation ne concerne normalement pas les laboratoires de biologie médicale dont les délais de rendu des résultats n'excèdent généralement pas une semaine. Il est aussi possible de congeler l'échantillon pour des envois groupés au CNR CMAP.

Il est enfin à noter que ces recommandations françaises (tableau 7) sont en accord avec celles émises par le CDC concernant le diagnostic moléculaire sur échantillon de selles [27].

4.2.3. Limites

Étant donné le volume restreint d'études publiées sur le sujet, ces données ne concernent à l'heure actuelle qu'un nombre relativement limité d'espèces parasitaires (*G. intestinalis*, ankyslostomes, microsporidies, *D. fragilis*, *Blastocystis* spp.). Cependant, nous avons étendu les recom-

mandations à l'ensemble des parasites digestifs, considérant que ces parasites représentaient la diversité des infections parasitaires à protozoaires, microsporidies, helminthes. Le mode optimal de conservation pourrait aussi dépendre du stade parasitaire : les formes végétatives de *G. intestinalis* semblent ainsi mieux se conserver dans le bichromate de potassium que dans l'alcool 70 % ou le formol 10 %, alors que les trois fixateurs conviennent pour les kystes [22]. L'ensemble de ces recommandations seront donc à réévaluer quand plus de données concernant le diagnostic moléculaire des parasites digestifs seront disponibles dans la littérature.

5. Recommandations analytiques

5.1. Examen macroscopique

Il est essentiel de faire un examen macroscopique, quelle que soit la consistance de la selle.

Il consiste en une évaluation de l'aspect de la selle (glairo-sanglante, liquide, pâteuse, moulée, dure...) et une recherche d'éléments parasitaires (adultes, proglottis).

5.2. Quantité de selles et modalités d'échantillonnage pour analyse

Comme évoqué précédemment, il existe au cours du temps une irrégularité d'excrétion des éléments parasitaires dans les selles, notamment des œufs d'helminthes, entraînant une variabilité diagnostique inter-échantillons [31-33].

Cependant, il peut aussi exister d'importants facteurs de variabilité intra-échantillon. C'est notamment le cas pour la répartition des œufs d'helminthes dans les fèces [32]. Pour certaines espèces (schistosomes, oxyures), les concentrations d'œufs sont plus importantes en surface de la selle qu'à l'intérieur de celle-ci [34, 35].

Tableau 7. Gradation des recommandations de conservation spécifiques à la PCR.

Recommandé	Conservation à +4 °C sans conservateur jusqu'à 1 semaine
Acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - Congélation à -20 °C - Utilisation de milieux de conservation sans impact sur les PCR : Bichromate de potassium à +4 °C, Ethanol absolu à +4 °C, Milieu Cary-Blair (Fecal swab) à +4 °C - Conservation à température ambiante pendant 24 heures avant stockage à +4 °C
Non acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - Conservation dans des milieux fixateurs incompatibles avec la biologie moléculaire (ex : Formol) - Conservation à température ambiante > 24 heures

Ainsi, dans le cas d'une recherche ciblée sur les oxyures dans une selle moulée, un lavage de la selle avec de l'eau physiologique, suivi du recueil et de la centrifugation du liquide, permet aisément la visualisation des œufs dans le culot. Pour d'autres espèces (ankylostomes, trichocéphales, *Ascaris*, *S. japonicum*), il existe des différences notables dans les concentrations d'œufs le long de l'axe longitudinal de la selle [34-37]. Les concentrations d'œufs d'ankylostomides ou de *S. japonicum* sont par exemple plus élevées dans la partie antérieure des échantillons de selles que dans la partie postérieure, alors que c'est l'opposé pour l'espèce *Trichuris trichiura* [35, 36]. Pour les protozoaires, les données concernant la variabilité intra-échantillon sont rares, mais le diagnostic par PCR étant plus performant que pour les helminthes, on peut supposer que la répartition de ces parasites dans la selle pourrait être plus homogène.

Ainsi, pour les helminthes, du fait d'une importante inégalité dans la répartition des œufs (et probablement des larves) dans les fèces, pouvant interférer sur les performances de détection des PCR, nous recommandons d'homogénéiser l'échantillon et de prélever à différents endroits de la selle, de manière à augmenter la probabilité d'inclure des éléments parasitaires dans la prise d'essai recommandée de 200 mg (tableau 8).

Les pratiques permettant la détection des pathogènes digestifs bactériens et viraux par PCR ont largement évolué ces dernières années, avec une utilisation plus fréquente des écouvillons avec milieux de transport (*fecal swab*). La méthode « *fecal swab* » employée en pratique courante par les laboratoires consiste à tremper un écouvillon dans les fèces puis le replacer dans le milieu de transport avant analyse. Selon une étude récente sur plus de 3 500 selles analysées en routine par PCR multiplex et microscopie, le « *fecal swab* » associé à la détection des protozoaires par PCR multiplex, permettait d'obtenir une sensibilité équivalente voire meilleure à la microscopie, même si l'objet de ce travail n'était

Tableau 8. Gradation des recommandations de prise d'essai pour analyse.

Recommandé	<ul style="list-style-type: none"> - Utiliser des selles « en vrac » et homogénéiser l'échantillon (homogénéisation manuelle, vortex, ± lavage si selle moulée) pour la recherche d'helminthes et de protozoaires - Prélever une noix de selles pour chaque technique de concentration (sauf Kato) - Prélever ≥ 200 mg pour une recherche d'helminthes par PCR - Prélever ≥ 200 µL si selle liquide pour une recherche par PCR - Utiliser une spatule en lieu et place du <i>fecal swab</i>, en cas de selles dures
Acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - Récueillir au <i>fecal swab</i> au moins 200 mg/200 µL*, en prélevant la selle en 3 endroits minimum (intérieur et extérieur, sur la longueur de la selle) pour la recherche de protozoaires et d'helminthes
Non acceptable	<p>Toute autre pratique que celles citées ci-dessus :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Non-homogénéisation de l'échantillon avant la prise d'essai sur selles « en vrac » (helminthes et protozoaires) - Absence d'échantillonnage multiple en <i>fecal swab</i> - <i>Fecal swab</i> peu chargé pour la recherche d'helminthes ou pour l'échantillonnage de selles dures

*À charge du laboratoire de valider la calibration de la prise d'essai (adapter par pesée avant/après charge de l'écouvillon ou autre méthode).

pas d'évaluer spécifiquement les performances associées à l'utilisation du « *fecal swab* » [19]. Des études permettant d'évaluer les performances du « *fecal swab* » pour la recherche d'helminthes par PCR sont en revanche nécessaires, car une étude récente a montré une sensibilité imparfaite sur la détection d'helminthes en utilisant ce type d'échantillonnage, même si d'autres explications peuvent être évoquées [38]. En particulier, la pratique consistant à utiliser un « *fecal swab* chargé », en prélevant la selle en de multiples endroits, doit être évaluée pour connaître son niveau de performance. En attendant d'avoir des informations suffisantes à ce sujet, il a été décidé

de mettre cette pratique en « recommandation acceptable » (tableau 8).

À noter que des études évaluant le « rectal swab » (écouvillonnage rectal avant placement dans le milieu de transport) en comparaison avec une selle « en vrac », ont été réalisées pour le diagnostic de protozooses (giardiose et cryptosporidiose) [39, 40]. Ces études montrent une diminution de la sensibilité de détection par l'utilisation du « rectal swab », avec une augmentation importante de Ct, par rapport au Ct obtenu sur selles « en vrac ». La sensibilité de cette technique est beaucoup moins bonne pour la recherche parasitaire (57 %) que pour la recherche bactérienne (87 %) ou virale (66 %) [39]. De plus, il est probable que la sensibilité serait encore moins élevée pour la recherche d'helminthes (hors oxyure), étant donné les problèmes de répartition d'œufs évoqués précédemment.

5.3. Recherche de parasites par microscopie

5.3.1. Techniques à utiliser

Toutes les techniques ne sont pas équivalentes pour détecter les formes parasitaires (formes trophiques, kystes, œufs, larves). Il est donc préférable de choisir des techniques complémentaires permettant de détecter un spectre large de parasites (ou complémentaires des PCR utilisées, le cas échéant) (tableau 9). L'association d'une technique de flottation et d'une technique diphasique ou de deux techniques de flottation de densités différentes est optimale. Une technique de flottation en sulfate de zinc de densité 1,15 à 1,18 est adaptée pour les kystes de protozoaires et les coccidies qui ont tous une densité < 1,12, tandis que la plupart des helminthes sont aisément concentrés avec une densité > 1,18 [41]. Cependant, la densité de recueil des parasites peut varier selon que la selle est utilisée fraîche ou fixée dans le MIF. Ainsi, la densité optimale pour les œufs d'ankylostomidés et larves d'anguillules

Tableau 9. Techniques de concentrations pertinentes ou non selon les parasites recherchés.

Parasite	Technique(s) non adaptée(s)	Technique(s) adaptée(s)
Rhizo-flagellés	<ul style="list-style-type: none"> - Technique de flottation Willis - Techniques diphasiques (trophozoïtes) - Technique de Kato 	<ul style="list-style-type: none"> - Techniques diphasiques (kystes) : Bailenger, Ritchie - Technique de flottation à densité à 1,18 - Examen direct après fixation (trophozoïtes)
Coccidies	Toute autre technique que les techniques adaptées	<ul style="list-style-type: none"> - Colorations spécifiques : Auramine, Ziehl modifié (Henricksen...) - Contraste de phase (Heine), glycérine - Microscopie UV en confirmation de l'ED pour <i>Cyclospora</i> spp. et <i>Sarcocystis</i> spp.
Œufs d'oxyures	Techniques diphasiques	<ul style="list-style-type: none"> - Test de Graham (scotch-test) - Technique de flottation à densité à 1,18 - Lavage de la selle moulée ou compacte et centrifugation du liquide de lavage
Œufs d'ankylostomidés	Technique de Kato avec lecture réalisée au-delà de 30 minutes	<ul style="list-style-type: none"> - Techniques diphasiques - Technique de flottation à densité à 1,18
Larves d'anguillules	Technique de Kato	<ul style="list-style-type: none"> - Technique de Baermann - Coproculture sur lame ou gélose
Autres helminthes	Techniques par flottation de densité ≤ 1,18	<ul style="list-style-type: none"> - Techniques diphasiques (Bailenger, MIF, Ritchie) - Techniques de flottation de densité > 1,18 - Technique de Kato

non fixés est de 1,06, mais peut aller jusqu'à 1,25, si les selles ont été fixées dans le MIF.

5.3.2. Habilitations

Un des risques les plus importants à maîtriser est l'habilitation des lecteurs dans le cas de la recherche par microscopie. Le laboratoire devra s'assurer que chaque opérateur est capable de distinguer un élément parasitaire d'un élément non parasitaire et en référer à un opérateur expert, à défaut de pouvoir l'identifier précisément (nature parasitaire ou non, identification du parasite et de ses stades éventuels) (tableau 10).

L'habilitation pourra utiliser des banques de parasites et/ou des images des différents parasites les plus fréquemment rencontrés [42]. Le niveau

autonome pourra consister à identifier les parasites du panel minimal, et à reconnaître les parasites du panel étendu sans forcément les identifier précisément (examen microscopique et éléments macroscopiques). Le niveau confirmé comprendra l'identification des parasites des deux panels. Il est proposé que l'habilitation repose sur des reconnaissances d'images et des recherches microscopiques utilisant des selles positives et des selles négatives (au moins dix).

D'autre part, il existe des programmes de formation continue en ligne permettant le maintien des compétences en parasitologie (ex : e-PARASITImage).

5.3.3. Contrôles de qualité

Des contrôles internes doivent être utilisés pour s'assurer de la qualité et de la conservation des réactifs utilisés pour les techniques de préparation de l'échantillon avant examen microscopique (coloration, concentration). Pour les colorations, il est nécessaire d'inclure une lame de contrôle positif dans chaque série de lames colorées (ex : Ziehl-Neelsen). La qualité des réactifs de concentration doit être vérifiée à l'aide de suspensions

Tableau 10. Recommandations sur l'habilitation des personnels.

Recommandé	<p>Chaque opérateur :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Est habilité à reconnaître tous les parasites recherchés dans les panels - Sait détecter la présence d'éléments parasitaires macroscopiques - Sait reconnaître les éléments non parasitaires classiques d'une selle (hématies, leucocytes, les cristaux de Charcot-Leyden, etc.) - Répond au moins une fois/semestre à un EEQ ou un CQI
Acceptable	<p>L'opérateur sait différencier un élément parasitaire macroscopique ou microscopique, d'un élément non parasitaire, et en référer à un opérateur expert à défaut de l'identifier précisément, et reconnaître des cristaux de Charcot-Leyden</p>
Non acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - L'opérateur ne sait pas détecter un élément parasitaire macroscopique - L'opérateur ne sait pas différencier un élément parasitaire d'un élément non parasitaire - Pas de participation individuelle à un programme d'EEQ ou CQI pour la lecture microscopique

Tableau 11. Recommandations sur les modalités de contrôle des techniques de concentration.

Recommandé	<ul style="list-style-type: none"> - Inclusion d'une lame de contrôle positive dans chaque série de lames colorées - Réalisation d'un contrôle de l'étape de concentration sur chaque selle (technique diphasique) <ul style="list-style-type: none"> • billes commercialisées • levures colorées ou selle positive
Acceptable	<p>Réalisation d'un contrôle des dispositifs de concentration et de coloration à chaque changement de lot/réception de commande argumenté dans une analyse de risque</p>
Non acceptable	<p>Absence de contrôle des dispositifs de concentration et de coloration</p>

Tableau 12. Recommandations de pré-traitement.

Recommandé	Réalisation d'un broyage par billes
Acceptable	Absence de broyage pour les protozoaires non-coccidies et microsporidies*
Non acceptable	Absence de broyage pour les œufs d'helminthes et coccidies

*Si le laboratoire a fait la preuve de l'inutilité du broyage sur un nombre significatif d'échantillons dont des faibles charges parasitaires.

« maison » ou de préparations commercialisées (billes) ou encore de selles positives (tableau 11).

5.4. Diagnostic moléculaire

5.4.1. Pré-traitement de l'échantillon

Le broyage mécanique de l'échantillon est recommandé (tableau 12), car il permet une homogénéisation des structures parasitaires contenues dans la selle, mais surtout de rompre la paroi des œufs d'helminthes et kystes ou oocystes de protozoaires.

Il a été montré que le broyage mécanique permettait d'améliorer le Ct de détection de certains protozoaires, notamment *Cryptosporidium* spp., et des microsporidies [43-45]. Cependant le type de billes utilisées et le kit d'extraction d'ADN influencent également le niveau de détection [44]. Cette variabilité nécessite donc une évaluation sur site et justifie le rendu d'un résultat qualitatif uniquement.

La réalisation d'une PCR helminthes sans appliquer un prétraitement par broyage avec billes entraîne également une perte de sensibilité [46]. Autier et al. [38] ont montré une nette amélioration des performances obtenues avec le kit AllPlex GI helminthes, lorsqu'un broyage mécanique était effectué avant extraction. Le broyage permet d'améliorer la sensibilité sur certaines cibles de façon importante (*T. trichiura*, *E. vermicularis*, *A. lumbricoides*), aussi bien en termes de nombre d'échantillons détectés, qu'en gain de Ct (chute de 10 Ct).

5.4.2. Technique d'amplification

Le choix de la méthode utilisée, commerciale ou maison, simplex ou multiplex, est de la responsabilité du laboratoire, qui doit s'assurer des performances de la technique, en faisant une évaluation sur site et une recherche bibliographique. En particulier, l'efficacité de la combinaison méthode de broyage/méthode d'extraction /méthode d'amplification doit être vérifiée.

Pour les microsporidies de l'immunocompétent, le traitement reposant sur une prise en charge symptomatique et non sur une thérapeutique ciblée contre le pathogène, une méthode permettant de détecter de manière globale (sans distinction d'espèce) *E. bienewisi* et *Encephalitozoon* spp. peut convenir dès lors que l'échantillon est ensuite envoyé au CNR MAP pour identification précise.

5.4.3. Contrôles de qualité

La détection de parasites dans les selles est doublement compliquée, du fait de la paroi épaisse de la plupart des parasites et de la matrice biologique qui présente de nombreux inhibiteurs de PCR. Parmi ces inhibiteurs, on retrouve fréquemment dans les selles, des dérivés de l'hème, de la bilirubine, des sels biliaires et des hydrates de carbone complexes, qui peuvent être extraits en même temps que l'ADN du pathogène [47]. Ces écueils peuvent entraîner une diminution des performances des techniques moléculaires. Comme évoqué précédemment, le pré-broyage permet une meilleure libération de l'ADN parasitaire, mais la qualité de l'extraction est ensuite déterminante pour éliminer les inhibiteurs. Il est donc important de disposer d'indicateurs permettant de valider cette étape (tableau 13).

Il est ainsi recommandé de disposer d'un témoin interne permettant de vérifier l'absence d'inhibiteurs. Ce témoin est présent dans la très grande majorité des kits commerciaux, qu'il soit incorporé directement dans le mix de PCR ou à introduire avant l'extraction de l'échantillon (il peut alors servir également de témoin d'extraction). Pour les techniques de PCR « maison », il sera nécessaire

Tableau 13. Recommandations sur l'usage et l'interprétation des contrôles de qualité pour le diagnostic moléculaire.

Recommandé	<ul style="list-style-type: none"> - Validation des analyses en fonction : <ul style="list-style-type: none"> • des témoins négatifs et positifs (CQI) de la série • des témoins d'extraction pour chaque échantillon • des témoins de détection des inhibiteurs pour chaque échantillon - Réanalyse de la série si le résultat de CQI est > 2Ct par rapport à la valeur cible - Suivi des statistiques de Ct de CQI sur un logiciel adapté - Visualisation de l'aspect des courbes d'amplification
Acceptable	<p>Inclusion d'un contrôle d'extraction par série ou à une fréquence définie par une analyse de risque argumentée</p> <ul style="list-style-type: none"> - Absence de témoin négatif - Absence de témoin positif - Absence de témoin validant l'absence d'inhibiteur
Non acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de témoin validant la qualité de l'extraction - Absence de témoin validant la qualité de l'extraction pour chaque échantillon en cas d'extraction manuelle

d'intégrer ce témoin « d'absence d'inhibiteurs » au système de PCR permettant la détection parasitaire (tableau 13). Des systèmes comprenant des fragments d'ADN exogène associés au système de PCR (sonde/amorces) permettant leurs détections, existent sur le marché [48].

D'autre part, il est essentiel de prévoir une stratégie de vérification de la qualité de l'extraction d'ADN, permettant *a minima* de contrôler les réactifs et/ou le bon fonctionnement de l'automate d'extraction. Dans la plupart des situations, le contrôle d'absence d'inhibiteurs peut aussi jouer ce rôle s'il a été intégré dans l'échantillon avant l'extraction. Il faut donc préférentiellement opter pour cette stratégie lorsque l'on développe une PCR « maison ». Beaucoup de kits commerciaux utilisent aussi cette stratégie d'introduction

du témoin avant extraction de l'échantillon, mais certains font exception à cet usage en incorporant directement le témoin d'absence d'inhibiteur dans le mix de PCR. Ce témoin ne pourra donc pas être utilisé en tant que « témoin de bonne extraction ». Dans ce cas, on peut avoir recours à un système de rajout d'ADN exogène dans chaque échantillon, avant extraction. À défaut, pour les extractions automatisées, il est possible de prévoir, *a minima*, une stratégie de vérification de la qualité de l'extraction par l'introduction d'un échantillon positif connu, idéalement par série d'extraction ou bien à une fréquence à définir par le laboratoire par une analyse de risque argumentée.

5.4.4. Vérification/Validation de méthode

Comme pour toute vérification/validation de méthode, celle-ci doit être adaptée à l'épidémiologie du laboratoire et aux ressources biologiques disponibles.

Il est recommandé, si possible, de passer 8 échantillons par cible PCR pour le panel minimal (parasites les plus fréquents). La méthode PCR (pré-traitement + extraction d'ADN + amplification) doit être comparée à des méthodes microscopiques utilisant une technique adaptée (tableau 9) ou à une technique moléculaire de référence.

Pour les parasites du panel élargi, le nombre d'échantillons positifs devrait être au minimum de 4, sauf pour les parasites rares pour lesquels un échantillon peut s'avérer suffisant, faute de matériel disponible. Il est important de vérifier la spécificité sur au moins 10 échantillons négatifs.

5.5. Recommandations spécifiques pour la recherche de *Strongyloides stercoralis*

Comme pour beaucoup de parasites digestifs, l'excrétion larvaire de *S. stercoralis* dans les selles est irrégulière et souvent faible dans les infections chroniques non compliquées [49]. Des travaux de Nielsen et al. [50], ont montré que l'examen parasitologique d'un seul prélèvement de selles ne permettait de diagnostiquer que 53 % des infec-

tions à *S. stercoralis* (par technique dérivée du Baermann et culture). La sensibilité montait à 74 % pour 3 selles et atteignait 100 % après analyse de 7 prélèvements [50]. Une méta-analyse de la littérature concernant les méthodes de diagnostic des anguilluloses (rassemblant 11 études et plus de 9 000 patients) a rapporté une sensibilité de l'examen direct des selles d'environ 21 %, alors que la sensibilité de la technique de Baermann et de la coproculture atteignaient 72 % et 89 %, respectivement [51]. L'examen microscopique standard doit donc nécessairement être complété par des techniques plus sensibles, telles que la méthode de Baermann ou la coproculture.

Les techniques de PCR, plus récentes, présentent aussi des sensibilités élevées permettant de les recommander en première intention. L'avantage de la PCR, par rapport à la méthode de Baermann et à la coproculture, est de s'affranchir de la viabilité du parasite, permettant la détection d'ADN provenant de larves mortes. Une méta-analyse de Buonfrate et al., rapporte une sensibilité globale des « PCR *Strongyloides* » d'environ 72 % sur 14 études datant d'avant 2016 [52]. Cependant, les sensibilités rapportées dans cette méta-analyse étaient extrêmement hétérogènes variant de 16 à 100 %, s'expliquant par le manque de standardisation, en termes d'extraction d'ADN (pré-traitement, quantité analysée, technique d'extraction) et d'amplification (cible, type de PCR). D'autre part, les PCR *Strongyloides* les plus récentes, notamment commerciales, semblent présenter des performances supérieures à celles décrites dans cette méta-analyse, variant de 86 % à 100 % [2, 38, 53]. Même si l'augmentation de la sensibilité reste plus modeste que pour certains autres helminthes, le broyage par billes préalable à l'extraction permet d'augmenter les performances de détection d'environ 6 % à 10 % [38, 54]. Ce broyage est donc préconisé pour la recherche d'anguillule par PCR (tableau 14).

Si un laboratoire opte pour la mise en place d'une méthode moléculaire pour la détection des anguillules, il sera nécessaire de bien évaluer,

Tableau 14. Recommandations spécifiques concernant la recherche de *S. stercoralis*.

Recommandé	Utiliser une technique adéquate reconnue : Baermann, coproculture ou PCR avec pré-broyage mécanique (billes)
Acceptable	Chez le patient n'ayant pas voyagé et sans contexte clinique évocateur ni demande explicite de recherche d'une anguillulose : mise en place d'une technique de concentration chargée en selle de type diphasique (ex : Bailenger, Ritchie) et préciser la possibilité de faux négatifs - Recherche de <i>Strongyloides stercoralis</i> par PCR sans pré-broyage mécanique (billes) - Ne pas réaliser une technique spécifique recommandée :
Non acceptable	<ul style="list-style-type: none"> chez un patient ayant voyagé ou avec un contexte clinique évocateur devant une recherche d'anguillules motivée (sur prescription ou d'après le questionnaire de renseignements)

choisir, mais parfois aussi d'optimiser la méthode pour obtenir des performances comparables ou supérieures à celles des techniques conventionnelles (Baermann ou coproculture). Dès lors que les bonnes pratiques de PCR ont été appliquées, que les témoins de validation sont conformes et que la validation de méthode est satisfaisante, il n'apparaît pas nécessaire de confirmer une PCR positive par quelque autre technique que ce soit.

Il est enfin rappelé que le diagnostic par biologie moléculaire de la strongyloïdose, au même titre que pour les techniques parasitologiques basées sur la microscopie, nécessitent idéalement l'analyse d'au moins 3 échantillons espacés de quelques jours pour améliorer la sensibilité globale de détection [55]. Dans certaines situations, compte tenu de la reproduction du parasite (cycle d'auto-infestation) ou de la latence possible de l'infection, il peut être pertinent de

combiner plusieurs techniques en cas de forte suspicion clinique.

6. Recommandations post-analytiques (tableau 15)

6.1. Interprétation d'un examen négatif

Certains résultats doivent être accompagnés d'un commentaire, notamment si :

- Existence reconnue d'un problème pré-analytique (inhibiteur de PCR par exemple) et impossibilité de répéter l'analyse.
- Recherche trop précoce par rapport à la date supposée de contamination en cas de voyage récent (délai d'émission des œufs pour les helminthes).

Tableau 15. Recommandations post-analytiques en cas de signes cliniques persistants (tous désordres digestifs) et résultat négatif.

	<ul style="list-style-type: none"> – Prendre en compte les résultats de bactériologie et virologie et adapter les commentaires : <ul style="list-style-type: none"> • En fonction de la méthode utilisée et des renseignements cliniques • En fonction des parasites suspectés (délai d'émission des œufs) – Demander un prélèvement de contrôle en cas d'observation de cristaux de Charcot-Leyden ou si < 3 prélèvements analysés – Faire un examen microscopique large ou transmettre à un laboratoire expert
Recommandé	
Acceptable	NA
Non acceptable	<ul style="list-style-type: none"> – Absence de commentaires adaptés – Absence d'examen microscopique ou de transmission en seconde intention à un laboratoire expert en cas de persistance de signes cliniques (tous désordres digestifs)

- Incapacité de la PCR utilisée à détecter les espèces de *Cryptosporidium* autres que *C. hominis* et *C. parvum* (représentant 5 à 10 % des cas de cryptosporidioses, selon les données du CNR CMAP).
- Méthode utilisée non optimale au regard des recommandations de cet article.

Il est également souhaitable de rappeler l'importance de répéter la recherche sur plusieurs échantillons de selles prélevés à plusieurs jours d'intervalle pour la recherche d'helminthes (3 en 7 à 10 jours).

6.2. Interprétation d'un résultat positif

Les discordances « microscopie (+)/PCR (-) » doivent faire évoquer un problème analytique et doivent être contrôlées. En cas de confirmation de cette discordance, il est conseillé d'envoyer la selle à un laboratoire expert. En revanche, une fois la validation de la méthode PCR correctement effectuée, il est inutile de confirmer des discordances « microscopie (-)/PCR (+) ».

6.2.1. Résultat positif pour *Blastocystis* spp. ou *Dientamoeba fragilis*

La pathogénicité de ces deux parasites est controversée. Le rôle de *Blastocystis* spp. dans les manifestations cliniques, notamment le syndrome de l'intestin irritable, est débattu, et la signification de sa présence associée à une dysbiose (cause ou conséquence ?) n'est pas claire [56]. Des études ont montré une corrélation positive entre la présence de *Blastocystis* spp. et la diversité microbienne [57, 58]. De plus, Terveer et al. ont rapporté que chez 31 patients receveurs de transplantation fécale provenant de donneurs positifs pour *Blastocystis* spp., le suivi clinique était similaire à des receveurs d'échantillons négatifs, suggérant l'absence de pathogénicité [59]. Cependant ces études sont la plupart du temps incomplètes car ne prennent pas en compte les génotypes de *Blastocystis* spp., dont la grande diversité génétique pourrait être corrélée à une variabilité dans l'impact sur le microbiote ou les

signes cliniques [60]. En ce qui concerne *D. fragilis*, un flagellé intestinal fréquemment retrouvé chez des sujets asymptomatiques [61], sa pathogénicité n'a pu davantage être démontrée, ni son influence sur le microbiote [62, 63]. Il est en revanche établi qu'il est fréquemment associé aux oxyures, et en cas de détection chez l'enfant, il pourrait être pertinent de proposer un scotch-test.

Au total, il est nécessaire d'informer le prescripteur de l'absence de recommandations de traitement, en cas de détection de l'un ou l'autre de ces parasites (tableau 16). En cas de troubles digestifs persistants associés à une présence répétée de *Blastocystis* spp. ou *D. fragilis*, il peut être utile de discuter du dossier en réunion pluridisciplinaire, voire d'adresser le patient pour un avis spécialisé.

6.2.2. Distinction d'*Entamoeba histolytica* et *E. dispar*

Plusieurs amibes du complexe *Entamoeba* peuvent être présentes dans les selles, dont la plupart sont non pathogènes. En particulier *Entamoeba dispar* est fréquemment retrouvée dans les selles en France et est considérée comme non pathogène. Pour cette raison, il est indispensable de disposer d'outils permettant la distinction entre *E. dispar* et *E. histolytica*, cette dernière étant pathogène et potentiellement grave, et pouvant conduire ultérieurement à une amébose hépatique (tableau 17).

Tableau 16. Recommandations sur l'interprétation de la présence de *Blastocystis* spp. et *D. fragilis*.

Recommandé	Commentaire biologique indiquant le rôle pathogène controversé et n'incitant pas au traitement en première intention
Acceptable	Ne pas rendre de résultat pour <i>Blastocystis</i> spp. et <i>D. fragilis</i> en le spécifiant et l'argumentant
Non acceptable	Absence d'interprétation biologique spécifique sur un résultat positif pour <i>Blastocystis</i> et <i>D. fragilis</i>

Tableau 17. Recommandations sur le diagnostic précis d'*E. histolytica* en cas de microscopie positive sans formes hématophages.

Recommandé	Faire une confirmation d'espèce d' <i>Entamoeba histolytica</i> par PCR lorsque des kystes ou formes végétatives d' <i>E. histolytica/dispar</i> sont retrouvés en microscopie, afin d'orienter le traitement
Acceptable	Rendre <i>E. histolytica/dispar</i> sous réserve que l'identification d'espèce soit sous-traitée à un laboratoire réalisant l'identification de l'espèce <i>E. histolytica</i>
Non acceptable	Absence de diagnostic moléculaire permettant la distinction entre <i>E. histolytica</i> et <i>E. dispar</i> Utilisation d'un test antigénique pour le diagnostic d'espèce

La microscopie ne permet pas classiquement de faire la distinction entre ces deux espèces (seule l'observation en microscopie de formes végétatives hématophages est pathognomonique d'*E. histolytica*, mais celles-ci sont très rarement observées). Les tests antigéniques disponibles en France ont des sensibilités et spécificités variables et ne permettent pas toujours la distinction entre *E. histolytica* et *E. dispar* [64]. Les tests PCR détectant le complexe *Entamoeba* sp. ne permettent pas de faire la distinction entre *E. dispar* et *E. histolytica*. Il est donc nécessaire d'utiliser des tests PCR ou panels permettant l'identification spécifique d'*E. histolytica* [65].

6.3. Lien avec le CNR CMAP

Il est recommandé de participer au réseau du CNR CMAP afin de faire évoluer les connaissances sur les parasitoses concernées (tableau 18). À cette fin, il est proposé d'envoyer les échantillons aux différents centres d'expertise et de déclarer les cas en ligne³. Une participation régulière à la

³ <https://cnrcryptosporidioses.chu-rouen.fr/>

Tableau 18. Recommandations de surveillance épidémiologique.

Recommandé	<ul style="list-style-type: none"> - Envoi au CNR CMAP des selles positives à : <ul style="list-style-type: none"> •Cryptosporidies • Microsporidies • <i>G. intestinalis</i> (suspicion de résistance ou d'épidémie) - Déclaration exhaustive des cas sur le site du CNR
Acceptable	<ul style="list-style-type: none"> - Envoi des échantillons sans données épidémiocliniques complètes sur la plateforme du CNR (uniquement N° dossier, nom/prénom, âge, sexe, date de prélèvement et code postal) - Envois groupés (sauf augmentation d'incidence constatée)
Non acceptable	Absence d'envoi au CNR CMAP

surveillance épidémiologique est importante car elle permet de repérer un risque épidémique.

En cas de doute sur la positivité d'un échantillon, le CNR CMAP peut également apporter une aide diagnostique au titre de sa mission d'expertise.

6.4. Conduite à tenir en post-thérapeutique

Il est recommandé de contrôler la négativation des selles après traitement, afin d'identifier les éventuels échecs thérapeutiques. Cependant, des données complémentaires sont nécessaires pour préciser le délai de négativation d'une PCR après un traitement bien conduit et/ou une résolution des signes cliniques. Même si la négativation d'une PCR *G. intestinalis* a été estimée comme étant rapide (1 semaine) dans une étude [66], il n'en est pas de même pour une PCR *Cryptosporidium*, qui peut rester positive 4 semaines ou plus. Pour objectiver un éventuel échec thérapeutique, il faut donc effectuer un contrôle tardif ou utiliser la microscopie. ■

Liens d'intérêts :

les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Financement

L'étude n'a reçu aucun financement.

Contributions des auteurs :

Tous les auteurs ont recueilli les données ; XI, FRG, PP, FG, DC, JMG, FD, LF ont rédigé la première version ; tous les auteurs ont revu et corrigé le manuscrit.

Références

1. Haute Autorité de Santé. Intérêt des techniques d'amplifications des acides nucléiques (TAA) multiplex dans la prise en charge médicale des infections gastro-intestinales. 2024.
2. Moniot M, Nourrisson C, Bailly E, Lambert C, Combes P, Poirier P. Current status of intestinal parasitosis and microsporidiosis in industrialized countries: Results from a prospective study in France and Luxembourg. *PLoS Negl Trop Dis* 2024 ; 18 : e0012752.
3. Costa D, Razakandrainibe R, Sautour M, Valot S, Basmacıyan L, Gargala G, et al. Human cryptosporidiosis in immunodeficient patients in France (2015-2017). *Exp Parasitol* 2018; 192 : 108-112.
4. Costa D, Razakandrainibe R, Valot S, Vannier M, Sautour M, Basmacıyan L, et al. Epidemiology of Cryptosporidiosis in France from 2017 to 2019. *Microorganisms* 2020 ; 8 : 1358.
5. Costa D. CNR Cryptosporidioses, Microsporidioses et autres Protozooses digestives - Rapport 2024.
6. Decraene V, Lebbad M, Botero-Kleiven S, Gustavsson A-M, Löfdahl M. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiol Infect* 2012 ; 140 : 519-527.
7. Michlmayr D, Alves de Sousa L, Müller L, Jokelainen P, Ethelberg S, Vestergaard LS, et al. Incubation Period, Spore Shedding Duration, and Symptoms of Enterocytozoon bienersi Genotype C Infection in a Foodborne Outbreak in Denmark, 2020. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2022 ; 75 : 468-475.
8. Collet F, Favory R, Augusto D, Moukassa D, Dutoit E, Mathieu D. Hémoptysie massive associée à une hyperinfestation pulmonaire à *strongyloides stercoralis*. *Rev Mal Respir* 2005 ; 22 : 815-818.
9. Ottino L, Buonfrate D, Paradies P, Bisoffi Z, Antonelli A, Rossolini GM, et al. Autochthonous Human and Canine Strongyloides stercoralis Infection in Europe: Report of a Human Case in An

- Italian Teen and Systematic Review of the Literature. *Pathog Basel Switz* 2020 ; 9 : 439.
10. Duvignaud A, Pistone T, Malvy D. Strongyloidiasis in a young French woman raises concern about possible ongoing autochthonous transmission in Spain. *Int J Infect Dis* 2016 ; 42 : 43-44.
 11. Nicolas M, Perez JM, Carme B. [Intestinal parasitosis in French West Indies: endemic evolution from 1991 to 2003 in the University Hospital of Pointe-a-Pitre, Guadeloupe]. *Bull Soc Pathol Exot* 1990 2006 ; 99 : 254-257.
 12. Magnaval JF, Mansuy JM, Villeneuve L, Cassaing S. A retrospective study of autochthonous strongyloidiasis in Région Midi-Pyrénées (Southwestern France). *Eur J Epidemiol* 2000 ; 16 : 179-182.
 13. Magnaval J-F, Fillaux J, Fabre R, Cassaing S, Valentin A, Iriart X, et al. Epidemiological, Clinical and Laboratory Features of Strongyloidiasis in 69 Attendees at a French Outpatient Clinic. *Pathog Basel Switz* 2023 ; 12 : 983.
 14. Develoux M, Siguier M, Hennequin C, Pialoux G. [Sexual transmission of strongyloidiasis in men who have sex with men (MSM) in Paris]. *Med Trop Sante Int* 2025 ; 5 : mtsi.v5i1.2025.660.
 15. Ohno M, Inatomi O, Imai T, Takahashi K, Bamba S, Konishi K, et al. Chronic cystoisosporiasis in an immunocompetent adult: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2021 ; 100 : e24890.
 16. European Centre for Disease Prevention and Control. Cyclospora infections in European travellers to Mexico. 2017.
 17. Knopp S, Mgeni AF, Khamis IS, Steinmann P, Stothard JR, Rollinson D, et al. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl Trop Dis* 2008 ; 2 : e331.
 18. Steinmann P, Zhou X-N, Du Z-W, Jiang J-Y, Wang L-B, Wang X-Z, et al. Occurrence of Strongyloides stercoralis in Yunnan Province, China, and Comparison of Diagnostic Methods. *PLoS Negl Trop Dis* 2007 ; 1 : e75.
 19. Robert-Gangneux F, Duval X, Cazala C, Belaz S, Dupuis A, Guegan H, et al. Improvement of the diagnosis of intestinal protozoa using a multiplex qPCR strategy compared to classical microscopy: a prospective study on 3,500 stool samples over 3 years. *J Clin Microbiol* 2025 ; 63 : e0161024.
 20. ANOFEL. Parasitologie et mycologie médicales, Guide des analyses et pratiques diagnostiques. Edition Elsevier Masson. ISBN 10 : 2294753631; 2022.
 21. Yang J, Scholten T. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. *Am J Clin Pathol* 1977 ; 67 : 300-304.
 22. Kuk S, Yazar S, Cetinkaya U. Stool sample storage conditions for the preservation of Giardia intestinalis DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012 ; 107 : 965-968.
 23. Wilke H, Robertson LJ. Preservation of Giardia cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J Microbiol Methods* 2009 ; 78 : 292-296.
 24. Abdelsalam IM, Sarhan RM, Hanafy MA. The Impact of Different Copro-preservation Conditions on Molecular Detection of Cryptosporidium Species. *Iran J Parasitol* 2017; 12 : 274-283.
 25. Page W, Judd J, Bradbury R. The Unique Life Cycle of Strongyloides stercoralis and Implications for Public Health Action. *Trop Med Infect Dis* 2018 ; 3 : 53.
 26. Buonfrate D, Bradbury RS, Watts MR, Bisoffi Z. Human strongyloidiasis: complexities and pathways forward. *Clin Microbiol Rev* 2023 ; 36 : e00033-23.
 27. CDC Dpd. Diagnostic Procedures - Stool Specimens.
 28. Papaiaikovou M, Pilotte N, Baumer B, Grant J, Asbjornsdottir K, Schaefer F, et al. A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen. *PLoS Negl Trop Dis* 2018 ; 12 : e0006130.
 29. Wolk DM, Schneider SK, Wengenack NL, Sloan LM, Rosenblatt JE. Real-time PCR method for detection of Encephalitozoon intestinalis from stool specimens. *J Clin Microbiol* 2002; 40 : 3922-3928.
 30. Autier B, Gangneux J-P, Robert-Gangneux F. Evaluation of the Allplex™ Gastrointestinal Panel-Parasite Assay for Protozoa Detection in Stool Samples: A Retrospective and Prospective Study. *Microorganisms* 2020 ; 8 : 569.
 31. Tarafder MR, Carabin H, Joseph L, Balolong E, Olveda R, McGarvey ST. Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, Ascaris lumbricoides and Trichuris trichiura infections in humans in the absence of a "gold standard." *Int J Parasitol* 2010 ; 40 : 399-404.
 32. Hall A. Quantitative variability of nematode egg counts in faeces: a study among rural Kenyans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981 ; 75 : 682-687.
 33. Berhe N, Medhin G, Erko B, Smith T, Gedamu S, Bereded D, et al. Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with Schistosoma mansoni. *Acta Trop* 2004 ; 92 : 205-212.
 34. Ye XP, Donnelly CA, Anderson RM, Fu YL, Agnew A. The distribution of Schistosoma japonicum eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Ann Trop Med Parasitol* 1998 ; 92 : 181-185.
 35. Yu JM, de Vlas SJ, Yuan HC, Gryseels B. Variations in fecal Schistosoma japonicum egg counts. *Am J Trop Med Hyg* 1998 ; 59 : 370-375.
 36. Krauth SJ, Coulibaly JT, Knopp S, Traoré M, N'Goran EK, Utzinger J. An in-depth analysis of a piece of shit: distribution of Schistosoma mansoni and hookworm eggs in human stool. *PLoS Negl Trop Dis* 2012 ; 6 : e1969.
 37. Ye XP, Donnelly CA, Fu YL, Wu ZX. The non-randomness of the distribution of Trichuris trichiura and Ascaris lumbricoides eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Trop Med Int Health™IH* 1997 ; 2 : 261-264.
 38. Autier B, Gangneux J-P, Robert-Gangneux F. Evaluation of the Allplex™ GI-Helminth(I) Assay, the first marketed multiplex PCR for helminth diagnosis. *Parasite Paris Fr* 2021 ; 28 : 33.
 39. Kotar T, Pirš M, Steyer A, Cerar T, Šoba B, Skvarc M, et al. Evaluation of rectal swab use for the determination of enteric pathogens: a prospective study of diarrhoea in adults. *Clin Microbiol Infect* 2019 ; 25 : 733-738.

40. Maasch JRMA, Arzika AM, Cook C, Lebas E, Pilotte N, Grant JR, et al. Rectal Swabs as an Alternative Sample Collection Method to Bulk Stool for the Real-Time PCR Detection of *Giardia duodenalis*. *Am J Trop Med Hyg* 2020 ; 103 :1276-1282.
41. Leméteil D. Retour d'expérience pour l'examen parasitologique des selles : revue des techniques et implication sur l'accréditation. *Rev Fr Lab* 2020 ; 20-31.
42. ANOFEL. Librairie pédagogique de Parasitologie & Mycologie médicales.
43. Claudel L, Valeix N, Basmacıyan L, Pereira B, Costa D, Vincent A, et al. Comparative Study of Eleven Mechanical Pretreatment Protocols for *Cryptosporidium parvum* DNA Extraction from Stool Samples. *Microorganisms* 2021 ; 9 : 297.
44. Valeix N, Costa D, Basmacıyan L, Valot S, Vincent A, Razakandrainibe R, et al. Multicenter Comparative Study of Six *Cryptosporidium parvum* DNA Extraction Protocols Including Mechanical Pretreatment from Stool Samples. *Microorganisms* 2020 ; 8.
45. Nourrisson C, Moniot M, Tressol M, Lambert C, Fréalle E, Robert-Gangneux F, et al. Multicenter comparative study of Enterocytozoon bienersi DNA extraction methods from stool samples, and mechanical pretreatment protocols evaluation. *Sci Rep* 2024 ; 14 : 15404.
46. Ayana M, Cools P, Mekonnen Z, Biruksew A, Dana D, Rashwan N, et al. Comparison of four DNA extraction and three preservation protocols for the molecular detection and quantification of soil-transmitted helminths in stool. *PLoS Negl Trop Dis* 2019 ; 13 : e0007778.
47. Dąbrowska J, Groblewska M, Bendykowska M, Sikorski M, Gromadzka G. Effective Laboratory Diagnosis of Parasitic Infections of the Gastrointestinal Tract : Where, When, How, and What Should We Look For? *Diagn Basel Switz* 2024 ; 14 :2148.
48. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods San Diego Calif* 2001 ; 25 : 419-429.
49. Genta RM. *Strongyloides stercoralis*: immunobiological considerations on an unusual worm. *Parasitol Today Pers Ed* 1986 ; 2 : 241-246.
50. Nielsen PB, Mojon M. Improved diagnosis of *strongyloides stercoralis* by seven consecutive stool specimens. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 1987 ; 263 : 616-618.
51. Campo Polanco L, Gutiérrez LA, Cardona Arias J. [Diagnosis of *Strongyloides Stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013)]. *Rev Esp Salud Publica* 2014 ; 88 : 581-600.
52. Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Cinquini M, Cruciani M, Fittipaldo A, et al. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection-A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2018 ; 12 : e0006229.
53. Coppens J, Drieghe C, Potters I, Schwob J-M, Van Esbroeck M. Evaluation of the Allplex GI Parasite and Helminth PCR Assay in a Belgian Travel Clinic. *Diagn Basel Switz* 2024 ; 14 : 1998.
54. Srirungruang S, Mahajindawong B, Nimitpanya P, Bunkasem U, Ayuyoe P, Nuchprayoon S, et al. Comparative Study of DNA Extraction Methods for the PCR Detection of Intestinal Parasites in Human Stool Samples. *Diagn Basel Switz* 2022 ; 12 : 2588.
55. Chan AHE, Thaenkham U. From past to present: opportunities and trends in the molecular detection and diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. *Parasit Vectors* 2023 ; 16 : 123.
56. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. Blastocystis is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One* 2014 ; 9 : e111868.
57. Audebert C, Even G, Cian A, The Blastocystis Investigation Group, Safadi DE, Certad G, et al. Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 25255.
58. Stensvold CR, van der Giezen M. Associations between Gut Microbiota and Common Luminal Intestinal Parasites. *Trends Parasitol* 2018 ; 34 : 369-377.
59. Terveer EM, Van Gool T, Ooijevaar RE, Sanders IMJG, Boeije-Koppens E, Keller JJ, et al. Human Transmission of *Blastocystis* by Fecal Microbiota Transplantation Without Development of Gastrointestinal Symptoms in Recipients. *Clin Infect Dis* 2020 ; 71 : 2630-2636.
60. Cifre S, Gozalbo M, Ortiz V, Soriano JM, Merino JF, Trellis M. Blastocystis subtypes and their association with Irritable Bowel Syndrome. *Med Hypotheses* 2018 ; 116 : 4-9.
61. Jokelainen P, Hebelstrup Jensen B, Andreassen BU, Petersen AM, Röser D, Krogfelt KA, et al. *Dientamoeba fragilis*, a Commensal in Children in Danish Day Care Centers. *J Clin Microbiol* 2017 ; 55 : 1707-1713.
62. van Kalleveen MW, Budding AE, Benninga MA, Savelkoul PHM, van Gool T, van Maldeghem I, et al. Intestinal Microbiota in Children With Symptomatic *Dientamoeba fragilis* Infection : A Case-control Study. *Pediatr Infect Dis J* 2021 ; 40 : 279-283.
63. Tchamwa Bamini G, Charpentier E, Guemas E, Chauvin P, Fillaux J, Valentin A, et al. No evidence of pathogenicity of *Dientamoeba fragilis* following detection in stools: A case-control study. *Parasite* 2024 ; 31 : 40.
64. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba species. *Clin Microbiol Rev* 2007 ; 20 : 511-532.
65. Ali IKM. Intestinal amebae. *Clin Lab Med* 2015 ; 35 : 393-422.
66. van den Bijllaardt W, Overdeest IT, Buiting AG, Verweij JJ. Rapid clearance of *Giardia lamblia* DNA from the gut after successful treatment. *Clin Microbiol Infect* 2014 ; 20 : O972-974.