

Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2014

N° 3043

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par M. PICHARD Simon

Né le 18 Octobre 1985 à Vire

Le Mercredi 17 Septembre 2014 à Bordeaux

Validation d'une technique de PCR en temps réel pour la détection d'ADN de *Toxoplasma gondii* dans le liquide amniotique et demande d'autorisation auprès de l'Agence Régionale de Santé pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale au CHU de Bordeaux

Directeur de thèse

Docteur Isabelle ACCOCEBERRY

Jury

Mme le Professeur Marie-Edith LAFON PU-PH	Président
Mr le Professeur Robert SAURA PU-PH	Membre
Mr le Professeur Dominique DALLAY PU-PH	Membre
Mr le Docteur Clément CASTELLA PH	Membre
Mme le Docteur Isabelle ACCOCEBERRY MCU-PH	Directeur

A mon papa, porteur de mes souvenirs

Au président du jury,

Madame le Professeur Marie-Edith Lafon,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury. En acceptant de me faire partager vos connaissances, vous m'avez aidé dans la réalisation de ce travail. Vos qualités professionnelles et humaines imposent l'admiration.

A mon directeur de thèse,

Madame le Docteur Isabelle Accoceberry,

Tu m'as proposé ce travail, me faisant ainsi bénéficier de ton savoir et de ta grande expérience. Je tiens à t'exprimer mes plus sincères remerciements pour la confiance que tu m'as accordé, pour ta disponibilité, tes remarques pertinentes, ainsi que ton soutien dans ce travail.

A mon rapporteur de thèse,

Madame le Docteur Isabelle Garrigue,

Merci de m'avoir fait l'honneur d'être mon rapporteur de thèse. Je tiens à t'exprimer ma plus sincère reconnaissance pour ta grande disponibilité, tes conseils et ta bonne humeur.

A mes membres du jury,

Monsieur le Professeur Robert Saura,

Vous avez aimablement accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci pour votre collaboration et soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Dominique Dallay,

Vous me faites l'honneur de faire partie de ce jury.

Veillez recevoir mes sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Clément Castella,

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Soyez assuré de mon profond respect.

A mes amis

Mathilde, je te connais depuis l'école primaire, on a parcouru les bancs de la fac ensemble, aujourd'hui si j'en suis là, c'est en partie grâce à toi. Je sais que je pourrais toujours compter sur toi si j'ai besoin.

Aux Jullouvillais : Benoist, Romain, FX, Sophie, Marion, Laure : nos retrouvailles qu'elles soient jullouvillaises, parisiennes sont toujours une vraie réussite. J'aimerais vous voir plus souvent.

A Marion et Laure, lorsque l'on me parle d'amis, vos noms me viennent tout de suite à l'esprit. La distance ne peut nous éloigner. Chaque moment passé avec vous est unique et hors norme. Vous comptez terriblement pour moi.

A Pauline, pour ton écoute, ta gentillesse, je suis heureux de pouvoir te compter parmi mes amis.

Aux anciens du collège et lycée, à Marie, à Camille c'est toujours en réel plaisir de vous revoir.

Aux Caennais : à Hélène, Elise, Audrey, Guillaume, Jérôme, Marco, Bastien pour ces bons moments passés à vos côtés. A Alice, Audrey L, le trio d'enfer des sous-colles !!!

A mes colocs, je n'oublierai jamais ces moments partagés avec vous ;

Quentin, ton grain de folie, ton impulsivité, ton humour acide me manquent déjà. Avec toi il n'y a aucune limite, j'adore !!! Et derrière toute cette mascarade se cache quelqu'un de profondément généreux.

Marie, ton calme, ta gentillesse, ton écoute, autant de qualité chez une personne... Je suis heureux de pouvoir te compter parmi mes amis.

Sophie, ta spontanéité, ton entrain et ton immense générosité font de toi une personne extraordinaire. J'ai beaucoup d'estime pour toi.

Yan, 6 mois c'était trop court, mais quel bonheur d'avoir pu te connaître !! la fougue t'anime !!

A la cinquième coloc Léa pour tes activités toujours plus extra-scolaires.

Aux Bordelais,

A Antoine et Juliette, Anne et Bastien, Marie C, Cécile, Emilie : nos moments partagés ensemble sont toujours réussis, je me sens en famille avec vous.

A Nico, mon alter ego dans ce domaine qui nous est si cher !!!

A Mohamed, le Maroc a son représentant idéal,

A Sophie, une grande dame, j'aime tes valeurs et ton goût pour les belles choses,

A Hélène, je suis ravi d'avoir pu, au moins une fois au cours de notre internat, travailler à tes côtés. Merci d'avoir apporté ta bonne humeur et tes bonnes idées dans ce travail.

A Vincent, pour le bon temps passé ensemble à l'internat,

A Pierre, pour ces moments partagés et ton organisation hors-norme,

A Nayelie, le rayon de soleil antillais, pour le plaisir annoncé de se retrouver prochainement.

Aux bonnes rencontres du travail

A mes collègues internes qui m'ont accompagné et supporté au cours de ces années, pour les galères et les fous rires partagés ensemble.

Je cite au passage : Camille, Tanguy, David, Heidi, Jessika, Coralie, Adrien, Marie T, Marie C, Barni, JB, Marine, Cindy, Benoit, Laura, Sandra, Olivier, Vincent qui ont rendu les stages encore plus agréable.

Aux Toulousains : Elsa, Camille, Sarah, Morgane, Catherine, Tiffany, Benjamin, Laura pour ces 6 derniers moi d'internat passés à vos côtés.

A Julien, parce que la bactériologie sans un super assistant ne serait pas ce qu'elle est.

A toutes les personnes qui m'ont aidé pour cette thèse ; à Brigitte pour ton aide précieuse dans ce travail, aux techniciens de parasitologie et du PTBM...

A mes chefs pour votre enseignement pendant ces quatre années d'internat.

A ma famille

A ma maman, ton irremplaçable et inconditionnel soutien, ton éducation, ton amour m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui. Je suis fier d'être ton fils.

A Marine, ta personnalité aussi forte et singulière ne laisse personne indifférent. Tu es une source inépuisable d'inspiration. Je t'admire !!! Ton énergie t'emmènera loin.

A Margaux, tu seras toujours la petite sœur que l'on devra protéger. Je t'ai vu grandir et t'affirmer. Je te le dis pas suffisamment : Tu es formidable !! Tu pourras toujours compter sur moi.

A Eric (et toute sa petite famille), mon parrain, pour ton soutien et ta bienveillance. Papa ne pouvait pas espérer meilleur frère.

A mes grands-parents, pour tous ces fabuleux moments passés ensemble : nos mois d'été à Lancieux, les repas du dimanche avec les cousins, les Noël en famille.

A ma grand-mère maternelle, pour toutes ces journées passées ensemble pendant mon enfance.

A la famille Decréquy, pour avoir su m'accueillir avec tant de naturel et de générosité.

A Anne, gardienne de mes rêves, pour le bonheur que me procure la vie à tes côtés.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	18
2. GENERALITES SUR L'INFECTION A TOXOPLASMA GONDII	19
2.1. HISTORIQUE	19
2.2. AGENT PATHOGENE : <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	19
2.2.1. <i>Taxonomie</i>	19
2.2.2. <i>morphologie et biologie</i>	20
2.2.2.1. Les tachyzoïtes.....	20
2.2.2.2. Le bradyzoïte.....	22
2.2.2.3. Le sporozoïte	23
2.2.3. <i>Le cycle biologique du parasite</i>	25
2.2.3.1. Le cycle sexué chez le chat.....	25
2.2.3.2. Le cycle extraintestinal chez l'hôte intermédiaire	26
2.2.4. <i>Résistance et sensibilité des différentes formes de T. gondii</i>	27
2.2.5. <i>Modes de contamination de l'homme</i>	28
2.2.5.1. A partir des kystes	28
2.2.5.2. A partir d'oocystes	29
2.2.5.3. A partir de tachyzoïtes	29
2.2.6. <i>Principaux génotypes de T. gondii</i>	30
2.3. EPIDEMIOLOGIE	33
2.3.1. <i>La séroprévalence</i>	33
2.3.1.1. La prévalence dans le monde	33
2.3.1.2. La prévalence en France.....	33
2.3.2. <i>Incidence de la toxoplasmose au cours de la grossesse</i>	35
2.4. L'INFECTION A <i>TOXOPLASMA GONDII</i> CHEZ LA FEMME ENCEINTE	36
2.4.1. <i>Aspects réglementaires</i>	36
2.4.1.1. En France	36
2.4.1.2. A l'étranger.....	37
2.4.2. <i>Toxoplasmose acquise : aspects cliniques</i>	38
2.4.3. <i>Le diagnostic de l'infection maternelle</i>	39
2.4.3.1. cinétique d'apparition des anticorps	39
2.4.3.2. techniques de mise en évidence des anticorps.....	41
2.4.3.3. Techniques utilisant des antigènes figurés.....	42
2.4.3.4. Techniques utilisant des antigènes solubles	43
2.4.3.5. Techniques complémentaires.....	46
2.4.4. <i>Interprétation des résultats sérologiques de la femme enceinte et conduite à tenir</i>	49
2.5. COUT DU DEPISTAGE.....	54

2.6.	PREVENTION DE L'INFECTION TOXOPLASMIQUE : PROPHYLAXIE.....	55
3.	LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE.....	57
3.1.	TRANSMISSION MATERNO-FŒTALE.....	57
3.2.	EPIDEMIOLOGIE.....	58
3.2.1.	<i>Mise en place d'un dispositif de surveillance en France</i>	58
3.2.2.	<i>Prévalence et incidence</i>	59
3.3.	ASPECTS CLINIQUES DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE	61
3.3.1.	<i>Premier stade</i>	61
3.3.2.	<i>Deuxième stade</i>	61
3.3.3.	<i>Troisième stade</i>	62
3.3.4.	<i>Lésions chorio-rétiniennes</i>	62
3.3.5.	<i>Lésions neurologiques</i>	63
3.3.6.	<i>Les tableaux cliniques</i>	64
3.4.	DEFINITION D'UN CAS DE TOXOPLASMOSE CONGENITALE EN FRANCE	65
3.5.	DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE.....	66
3.5.1.	<i>Diagnostic prénatal</i>	66
3.5.1.1.	Diagnostic prénatal échographique.....	66
3.5.1.2.	Diagnostic prénatal biologique.....	68
3.5.2.	<i>Diagnostic néonatal (DNN)</i>	72
3.5.2.1.	Indication du DNN.....	72
3.5.2.2.	Modalités du DNN	72
3.5.2.3.	Interprétation des résultats du DNN biologique	74
3.5.3.	<i>Diagnostic post-natal</i>	75
3.6.	PRONOSTIC.....	76
3.6.1.	<i>Le devenir de la grossesse</i>	76
3.6.2.	<i>Morbidité à la naissance</i>	76
3.6.3.	<i>Le pronostic visuel</i>	77
3.6.4.	<i>Le pronostic neurologique</i>	78
3.7.	TRAITEMENT.....	79
3.7.1.	<i>Principaux médicaments antiparasitaires utilisés</i>	79
3.7.2.	<i>Prise en charge de la femme enceinte en France</i>	80
3.7.2.1.	Traitement prénatal de l'infection	80
3.7.2.2.	Perspectives.....	81
3.7.2.3.	Traitement postnatal	82
3.7.2.4.	Perspectives.....	83

4. VALIDATION D'UNE TECHNIQUE DE PCR EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION D'ADN DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> DANS LE LIQUIDE AMNIOTIQUE ET DEMANDE D'AUTORISATION AUPRES DE L'AGENCE REGIONALE DE SANTE POUR LE DIAGNOSTIC PRENATAL DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE AU CHU DE BORDEAUX.....	84
4.1. INTRODUCTION.....	84
4.2. VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE PCR POUR LA DETECTION DE L'ADN DE <i>T. GONDII</i> DANS LE LIQUIDE AMNIOTIQUE.....	85
4.2.1. <i>Matériels et méthodes</i>	85
4.2.1.1. Les échantillons cliniques de liquide amniotique	85
4.2.1.2. Tachyzoïtes vivants de <i>T. gondii</i>	85
4.2.1.3. Suspensions de tachyzoïtes à différentes concentrations	86
4.2.1.4. La gamme du CNR	86
4.2.1.5. Extraction de l'ADN	87
4.2.1.6. Amplification de l'ADN	88
4.2.1.7. Contrôles de qualité.....	90
4.2.1.8. Résultats.....	91
4.2.1.9. Analyse de risque	93
4.2.1.10. Paramètres de la technique à valider.....	94
4.2.2. <i>Résultats</i>	95
4.2.2.1. Pré-analytique	95
4.2.2.2. Validation des performances de la technique de PCR en temps réel.....	95
4.2.2.3. Quantification.....	108
4.2.2.4. Conclusion sur l'aptitude de la méthode	110
4.3. CONSTITUTION ET DEPOT DU DOSSIER DE DEMANDE D'AUTORISATION D'ACTIVITES DE DPN DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE AUPRES DE L'ARS	111
4.3.1. <i>Constitution du dossier</i>	111
4.3.1.1. Activité prévisionnelle (L3131-2).....	112
4.3.1.2. Infrastructure du laboratoire, équipement et matériel affectés à l'activité DPN	112
4.3.1.1. Le système informatique du laboratoire (SIL)	113
4.3.1.2. Le système de management de la qualité	113
4.3.1.3. Praticiens en charge de l'activité du DPN	114
4.3.1.4. Personnel du laboratoire affecté à l'activité du DPN	115
4.3.1.5. Prise en charge de l'échantillon de liquide amniotique au laboratoire	115
4.3.1.6. Technique de PCR.....	117
4.3.1.7. Rendu des résultats	117
4.3.1.8. Archivage	118
4.3.1.9. Suivi des enfants	118
4.3.2. <i>Dépôt du dossier</i>	118
5. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	119
6. CONCLUSION	129

7. BIBLIOGRAPHIE.....	130
8. ANNEXES.....	141
8.1. ANALYSE DE RISQUE	141
8.2. CONDITIONS DE PRELEVEMENT ET ACHEMINEMENT DU LA.....	147
8.3. FICHE DE RENSEIGNEMENT A ADRESSER AU LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE	148
8.4. FICHE DE SUIVI DE GROSSESSE APRES LE DPN	149
8.5. LETTRE A LA MERE APRES LE PRELEVEMENT DE LA.....	150
8.6. LETTRE DE RELANCE AU MEDECIN.....	151
8.7. PERFORMANCES DE L'EXTRACTION	152
8.8. PERFORMANCES DE L'AMPLIFICATION.....	154

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	Accueil de biologie centralisée
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFNOR	Agence française de normalisation
Ag	Antigène
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et Evaluation en Santé
ANOFEL	Association française des enseignants de parasitologie et mycologie
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARS	Agence régionale de santé
CE	Conformité européenne
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CI	Charge immunitaire
CMV	Cytomégalovirus humain
CNQ	Contrôle national de qualité
CNR	Centre national de référence
Cofrac	Comité français d'accréditation
CQI	Contrôle qualité interne
CSP	Code de la Santé Publique
CT	Cycle threshold (cycle seuil)
CV	Coefficient de variation
DNN	Diagnostic néo-natal
DNTP	Désoxy-nucléotides triphosphate
DPN	Diagnostic prénatal
EEQ	Evaluation externe de la qualité
EIA	Enzyme immuno assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GBEA	Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale
HAS	Haute autorité de santé
IC	Contrôle interne

Ig	Immunoglobuline
IMG	Interruption médicale de grossesse
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IV	Intra-veineux
IVG	Interruption volontaire de grossesse
LA	Liquide amniotique
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LBM	Laboratoire de biologie médicale
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MFIU	Malformation fœtale intra utérine
MGG	May-Grünwald Giemsa
NABM	Nomenclature des actes de biologie médicale
NF EN ISO	Norme internationale (ISO : International Standard Organisation), Européenne (EN : European Norme) et Française (NF : Norme Française)
OMS	Organisation mondiale de la santé
Pb	Paires de bases
PBP	Pôle de biologie et pathologie
PCR	Polymerase chain reaction
PHRC	Programme hospitalier de recherche clinique
PTBM	Plateau technique de biologie moléculaire
SA	Semaines d'aménorrhée
SMQ	Système de management de la qualité
TC	Toxoplasmose congénitale
T/mL	Toxoplasmes/mL
UI	Unité Internationale

LISTE DES FIGURES

figure 1 : Forme tachyzoïte de <i>T.gondii</i> colorée au MGG dans un LBA (8).....	20
figure 2 : Ultrastructure du tachyzoïte de <i>T. gondii</i> (9).....	21
figure 3 : Ultrastructure du bradyzoïte de <i>T. gondii</i> (10).....	22
figure 4 : Ultrastructure d'un kyste dans le cerveau d'une souris infectée (10).....	23
figure 5 : Oocyste non sporulé (C) et sporulé (D) (8)	24
figure 6 : Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie électronique (10).	24
figure 7 : Les différents stades parasitaires chez l'hôte définitif (11)	26
figure 8 : Le cycle biologique de <i>T. gondii</i> (8).....	27
figure 9 : Sources d'infections à <i>T. gondii</i> chez l'homme (8).....	30
figure 10 : Répartition des différents génotypes de <i>T.gondii</i> en France en 2012 (1)	32
figure 11 : Distribution géographique des génotypes de <i>T. gondii</i> (8).....	33
figure 12 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes selon la région d'habitation, standardisée sur l'âge (France 2003) (29).....	34
figure 13 : Evolution au cours du temps du taux d'incidence de la toxoplasmose pour 1000 femmes enceintes âgées de 20 et 40 ans, 1995-2003 (30).....	36
figure 14 : Cinétique des anticorps dans une infection toxoplasmique (8).....	41
figure 15 : Profil de Western blot positif en IgG (44).....	48
figure 16 : Absence d'IgG et d'IgM (37).....	49
figure 17 : Présence d'IgM et absence IgG (37)	50
figure 18 : Présence d'IgG et d'IgM (37)	51
figure 19 : Présence d'IgG et absence d'IgM (37).....	52
figure 20 : Présence d'IgG à un taux équivoque et absence d'IgM (37)	53
figure 21: Expertise d'une sérologie toxoplasmose effectuée en début de grossesse (1 ^{er} trimestre) en l'absence d'antécédents (37)	54
figure 22 : Distribution du nombre de cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France du 1er Janvier au 31 décembre 2012 selon le terme de la grossesse lors de l'infection maternelle en SA (52)	58
figure 23 : Cas de toxoplasmose congénitale notifié par année (2007-2012) par le réseau de surveillance « Toxosurv » (53)	59
figure 24 : Distribution régionale du nombre de cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France pour l'année 2012 (52).....	60

figure 25 : Nombre de cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France pour 1000 naissances selon l'âge des femmes en 2012 (52).....	61
figure 26 : Lésions de chorioretinite chez deux patients atteints de toxoplasmose congénitale (58)	63
figure 27 : Cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en 2012 en France (52).....	65
figure 28 : Toxoplasmose fœtale après séroconversion à 20 SA : présence à 28 SA d'une dilatation ventriculaire avec des nodules intracérébraux (61).....	67
figure 29 : Anomalies échographiques observées dans les 12 interruptions de grossesse survenues dans les cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France en 2012 (52).....	68
figure 30 : logigramme pour le DPN de la toxoplasmose congénitale (66).....	71
figure 31 : Comparaison des profils immunologiques par western blot sur sang maternel et sang de cordon	73
figure 32 : Effectif des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France en 2012 (52).....	75
figure 33 : Extracteur MagNA Pure 96 (96)	87
figure 34 : Amplificateur LightCycler 2.0 Roche® (96)	88
figure 35 : Technologie FRET (99)	89
figure 36 : Etapes de la réaction de PCR.....	90
figure 37 : Courbe d'amplification de PCR en temps réel (100).....	91
figure 38 : Courbes d'amplification obtenues sur le LightCycler 2.0 Roche® (CHU Bordeaux).....	92
figure 39 : Courbes d'amplification du contrôle interne (IC) TIB MOLBIOL sur le LightCycler 2.0 Roche® (CHU Bordeaux).....	93
figure 40 : Courbe de linéarité	102
figure 41 : Sens de circulation des échantillons dans le PTBM (CHU Bordeaux).....	106
figure 42 : Droite de linéarité selon la gamme du CNR	110
figure 43 : Logigramme de la prise en charge analytique d'un liquide amniotique au laboratoire	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Prévalence estimée de la toxoplasmose chez les femmes enceintes (1995-2003) en fonction de l'âge (30).....	35
Tableau 2 : Taux d'incidence estimé de la toxoplasmose pour 1000 femmes enceintes (1995-2003) en fonction de l'âge (30).....	35
Tableau 3 : Létalité liée à la toxoplasmose congénitale (1).....	76
Tableau 4 : Morbidité liée à la toxoplasmose congénitale (1).....	77
Tableau 5 : Répétabilité de l'extraction	96
Tableau 6 : Répétabilité de l'amplification	96
Tableau 7 : Fidélité intermédiaire de l'extraction et de l'amplification.....	97
Tableau 8 : Résultats EEQ 2012	98
Tableau 9 : Résultats EEQ 2013	99
Tableau 10 : Limite de détection.....	100
Tableau 11 : Limite de quantification basse	101
Tableau 12 : Limite de quantification haute	101
Tableau 13 : Linéarité.....	102
Tableau 14 : Résultats de la recherche d'ADN de <i>T. gondii</i> dans les 32 échantillons de liquide amniotique analysés au CHU de Bordeaux et dans le laboratoire autorisé au diagnostic prénatal.....	104
Tableau 15 : Stabilité des réactifs.....	107
Tableau 16 : Stabilité des échantillons.....	107
Tableau 17 : Résultats de la gamme de quantification du CNR.....	109

1. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii est le deuxième agent responsable d'infection congénitale avec 220 cas de toxoplasmose congénitale déclarés en France pour l'année 2012 (1).

Ce parasite de la famille des coccidies est un protozoaire ubiquitaire, infectant 10 à 60% des adultes dans les pays développés. La transmission transplacentaire du parasite survient dans environ 30% des cas de séroconversion maternelle lors de la grossesse, pouvant alors être responsable de mort fœtale in utero ou de lésions parfois sévères, principalement cérébrales ou oculaires.

Un programme de prévention a été mis en place en France reposant sur le dépistage sérologique de toutes les femmes enceintes et le suivi mensuel des femmes enceintes séronégatives, ainsi que sur le respect de certaines règles hygiéno-diététiques.

Le diagnostic de cette infection congénitale est envisagé dès lors qu'une séroconversion maternelle a été établie. Une amniocentèse avec une recherche directe de l'ADN parasitaire par PCR constitue l'examen de choix dans cette démarche diagnostique.

Le développement de la PCR en temps réel, simple d'utilisation et rapide a facilité la recherche d'ADN de *T. gondii* par biologie moléculaire et favorisé son implantation sur de nombreux plateaux techniques. Cet engouement a suscité l'intérêt des fournisseurs qui développent et mettent sur un marché toujours plus concurrentiel des kits commerciaux.

Après une mise en revue bibliographique des techniques de diagnostic de la toxoplasmose et des données actuelles sur l'infection congénitale, l'objectif de ce travail de thèse est la mise en place et la validation d'une technique commerciale de PCR en temps réel pour le diagnostic prénatal sur liquide amniotique au sein du laboratoire de parasitologie du CHU de Bordeaux. Le dossier de demande d'autorisation à la pratique du DPN a également été déposé auprès de l'ARS en vue d'obtenir l'agrément pour les 5 prochaines années.

2. GENERALITES SUR L'INFECTION A *TOXOPLASMA GONDII*

2.1. Historique

T. gondii a été découvert en 1908 par Nicolle et Manceaux à l'Institut Pasteur de Tunis chez un rongeur sauvage : le *gondii* (*Ctenodactylus gondii*) (2). Par la suite *T. gondii* a été retrouvé chez de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux mais ce n'est qu'en 1923 que le premier cas de toxoplasmose humaine a été décrit par Janku chez un enfant hydrocéphale présentant des kystes rétiniens (3). Le premier cas d'encéphalite néonatale toxoplasmique, de transmission intra-utérine a été décrit en 1937 par Wolf et Gowen (3). La mise au point du premier test diagnostique sérologique, le test de lyse, par Sabin et Feldmann dans les années 40 a permis de mettre en évidence la forte prévalence de la toxoplasmose chez l'homme. Le cycle biologique du parasite et son mode de transmission n'ont été établis qu'à partir des années 60 par Hutchison (4), Frenkel et Dubey (5). En 1972, la première souche de toxoplasme est isolée chez un nouveau-né atteint de toxoplasmose congénitale. Il faudra attendre 1989 pour voir apparaître les premières techniques de détection d'ADN toxoplasmique par PCR (6).

2.2. Agent pathogène : *Toxoplasma gondii*

2.2.1. Taxonomie

T. gondii est un protozoaire des mammifères à sang chaud à développement intracellulaire obligatoire, appartenant à la classe des Coccidies. Rattaché au phylum des Apicomplexa (présence « d'un complexe apical »), on doit sa classification actuelle à Barta en 2001 (7).

Règne : Protista

Phylum : Apicomplexa

Classe : Coccidia

Famille : Sarcocystidae

Sous-famille : Toxoplasmatinae

Genre : *Toxoplasma*

Espèce : *gondii*

2.2.2. morphologie et biologie

Au cours de son cycle, *T. gondii* existe sous trois formes évolutives et infectantes :

- le **tachyzoïte** : forme invasive à division rapide (figure 1),
- le **kyste** : forme de résistance à croissance lente contenant les bradyzoïtes,
- les **oocystes** : forme de résistance dans l'environnement contenant les sporozoïtes.

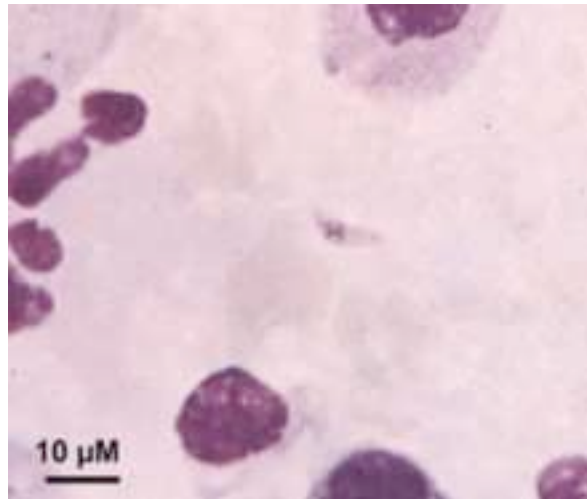


figure 1 : Forme tachyzoïte de *T.gondii* colorée au MGG dans un LBA (8)

2.2.2.1. Les tachyzoïtes (ou trophozoïtes)

Issue du grec tachus, évoquant la rapidité de division dans les cellules qui l'hébergent, il s'agit de la forme libre proliférative, infectieuse chez l'hôte intermédiaire (5) ; c'est la seule forme capable de traverser la barrière placentaire.

Cette forme végétative a l'aspect d'un croissant ou d'un arc (toxon en grec), mesure de 5 à 10 µm de long sur 1 à 3 µm de large. L'extrémité antérieure est effilée, l'extrémité postérieure près de laquelle est généralement située le noyau est plus large et plus arrondie.

Elle est entourée par un complexe membranaire tri laminaire (le plasmalemme à l'extérieur et deux membranes formant le complexe membranaire interne) étroitement associée à un cytosquelette qui assure son intégrité et sa mobilité.

A l'extrémité antérieure se trouve le complexe apical comprenant le conoïde, les rhoptries, les micronèmes et les granules denses (3), structure caractéristique des *Apicomplexa*, permettant au parasite de pénétrer dans la cellule hôte.

- ♦ le conoïde consiste en 6 à 8 microtubules en forme de ressort,

- ♦ les rhoptries au nombre d'une dizaine ont une forme de massue de 1 à 4 μm de long,
 - ♦ les micronèmes sont en forme de bâtonnets,
 - ♦ les granules denses sont des inclusions cytoplasmiques de forme arrondie.

Le conoïde joue le rôle d'organe de reconnaissance et peut également pivoter, s'incliner, se rétracter au contact de la cellule hôte. Les rhoptries secrètent des substances lysant la membrane de la cellule, en particulier le PEF (Penetration Enhancing Factor).

La représentation schématique du trophozoïte est illustrée dans la figure 2 :

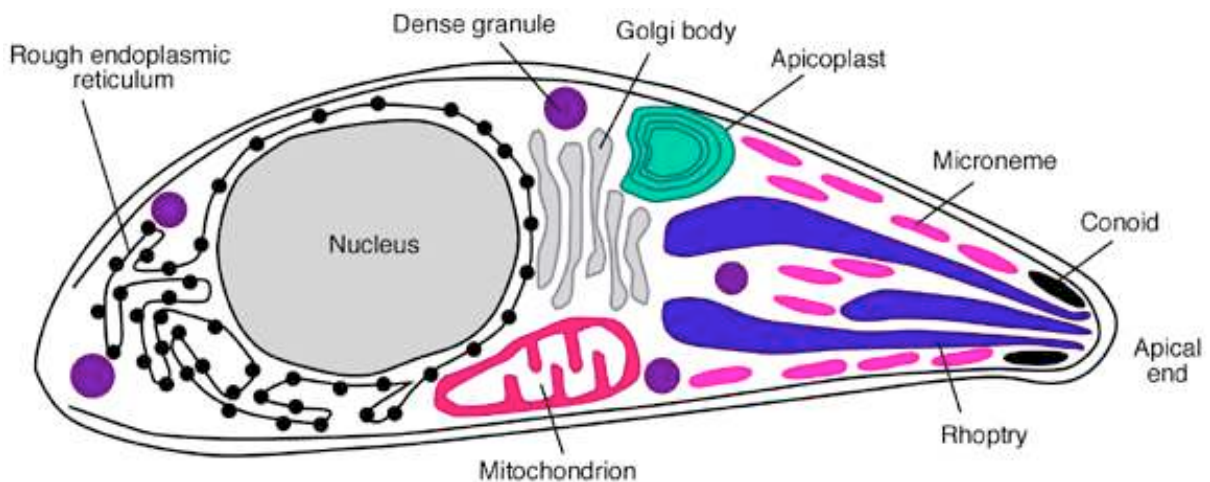


figure 2 : Ultrastructure du tachyzoïte de *T. gondii* (9)

On retrouve également des organites classiques comme un noyau, une mitochondrie unique, un appareil de golgi, un réticulum endoplasmique, de nombreux ribosomes et des grains d'amylopectine (3).

Le tachyzoïte pénètre dans la cellule hôte de façon active en 15 secondes environ ce qui lui permet d'échapper aux processus de lyse cellulaire.

Les tachyzoïtes se multiplient dans les cellules du système phagocytaire mononucléé (macrophages) de tous les animaux à sang chaud. Il s'agit d'un processus particulier de reproduction asexuée, l'endodyogénie, dans lequel deux cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère avec des parois totalement distinctes de celle de la cellule mère, qui éclate pour les libérer.

La cellule hôte peut contenir jusqu'à 32 tachyzoïtes, elle devient globuleuse et forme un pseudo-kyste. A l'intérieur de la cellule, le tachyzoïte devient ovoïde et s'entoure d'une vacuole parasitophore dans laquelle un important réseau tubulo-vésiculaire se développe au niveau de son extrémité postérieure.

Le tachyzoïte provoque des lésions nécrotiques dans les tissus où il se développe. Chez la femme enceinte, il peut atteindre le fœtus après une étape de multiplication au niveau du placenta.

2.2.2.2. *Le bradyzoïte*

Semblable au tachyzoïte, il se distingue par quelques détails ultra structuraux (figure 3) : plus petit, noyau plus postérieur, richesse en grains d'amylopectines et en micronèmes (5) (10) ainsi que par un métabolisme ralenti (3).

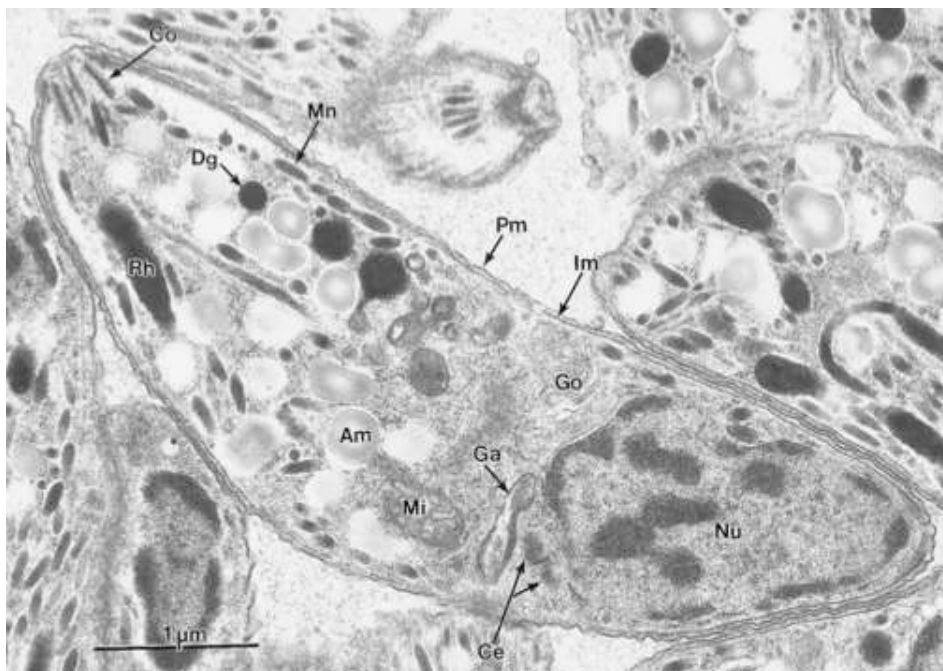


figure 3 : Ultrastructure du bradyzoïte de *T. gondii* : Am, granule d'amylopectine ; Ce, centrioles ; Co, conoïde ; Dg, granules denses ; Ga, apicoplaste ; Go, golgi ; Im, complexe membranaire interne ; Mi, mitochondrie ; Mn, micronème ; Nu, noyau ; Pm, plasmalemme ; Rh, rhoptrie (10)

Les bradyzoïtes se divisent lentement dans la cellule hôte. La membrane de la vacuole parasitophore les contenant se modifie et devient particulièrement résistante aux digestions enzymatiques par la pepsine. L'ensemble de cette structure constitue le kyste.

Les kystes ont un aspect sphérique dans le cerveau et ovoïde dans les tissus musculaires. Leur taille est variable allant de 10 μm pour les plus jeunes, contenant seulement 2 bradyzoïtes à plus de 100 μm pour les plus matures au sein desquels on peut retrouver des centaines à des milliers de bradyzoïtes (figure 4). Ils constituent la forme de résistance et de latence du parasite. Les kystes sont particulièrement abondants dans les tissus pauvres en anticorps, cerveau et muscles striés, mais on peut également les retrouver au niveau des autres viscères et de l'œil. Ils se développent à partir du cytoplasme de la cellule hôte et sont entourés d'une membrane d'origine parasitaire et cellulaire imperméable aux anticorps et aux médicaments. Ils persistent tout au long de la vie, sans causer de désordre cellulaire ou de réponse inflammatoire.

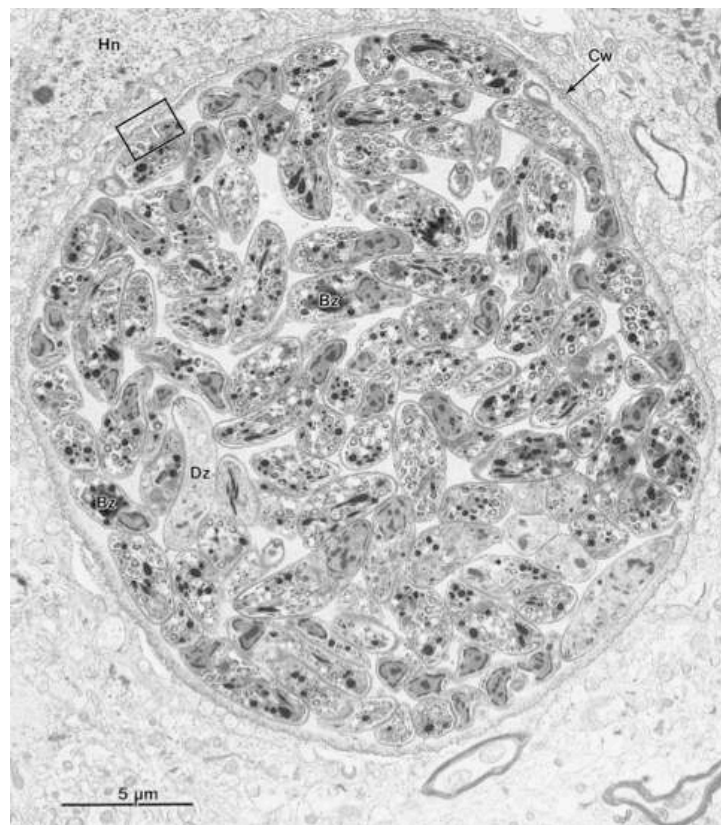


figure 4 : Ultrastructure d'un kyste dans le cerveau d'une souris infectée. Le kyste, entouré par une paroi mince (Cw), contient environ 110 bradyzoïtes (10)

2.2.2.3. *Le sporozoïte*

La structure du sporozoïte est proche de celle du tachyzoïte mais s'en distingue par des micronèmes et des rhoptries plus abondants (10).

Les sporozoïtes sont contenus dans des oocystes matures. Les oocystes sont des structures ovoïdes de 11 à 14 μm de long sur 9 à 11 μm de large et résultent d'une reproduction sexuée qui se déroule dans les cellules intestinales du chat.

Forme de résistance dans le milieu extérieur, l'oocyste est éliminé non sporulé avec les déjections du chat. Il doit subir une sporulation pour devenir infestant qui dure de 1 à 5 jours en fonction de la température, du degré d'oxygénation et de l'humidité.

A l'intérieur de l'oocyste s'individualisent deux sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes (futurs toxoplasmes) (figures 5 et 6).

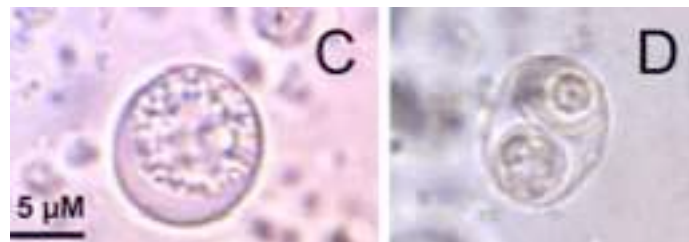


figure 5 : Oocyste non sporulé (C) et sporulé (D) (8)

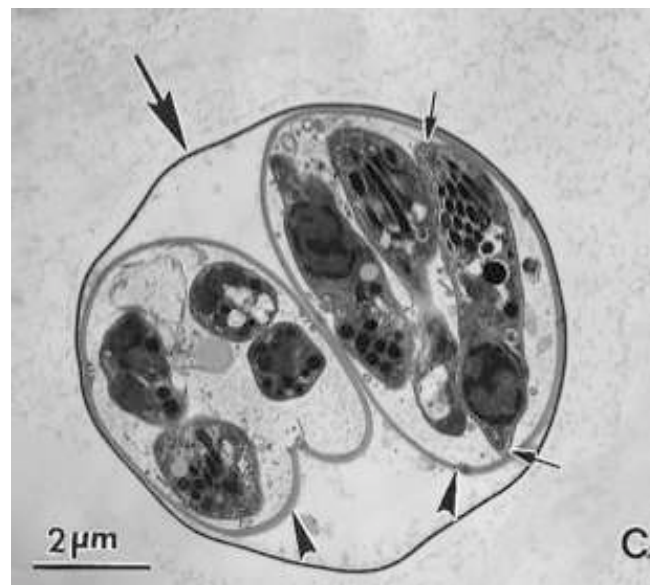


figure 6 : Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie électronique (10). Oocyste sporulé protégé par sa paroi (grande flèche) contenant deux sporocystes (têtes de flèches) renfermant chacun quatre sporozoïtes (petites flèches)

La grande résistance de la paroi de l'oocyste permet au parasite de demeurer infestant au moins un an dans un sol humide. Par contre, ils sont sensibles à la dessiccation, ce qui explique qu'il n'y a pas de toxoplasmose dans les régions arides.

2.2.3. Le cycle biologique du parasite

T. gondii se singularise par sa capacité à infecter tous les mammifères à sang chaud dont l'homme, hôte intermédiaire chez lequel se déroule le cycle asexué. Deux formes parasitaires sont décrites au cours de ce cycle, la forme végétative ou tachyzoïte et le kyste tissulaire. Chez l'hôte définitif, le chat et les félidés, *T. gondii* développe un cycle évolutif complet comprenant une phase asexuée et une phase sexuée dans lequel les 3 formes parasitaires sont retrouvées.

2.2.3.1. Le cycle sexué chez le chat

L'hôte définitif (le chat ou autres félidés) se contamine habituellement par carnivorisme en chassant ou en ingérant des kystes contenus dans la chair de leurs proies (petits rongeurs, oiseaux). Ils peuvent également s'infecter par ingestion d'oocystes matures souillant la terre, les végétaux ou l'eau douce. Les sporozoïtes (contenus dans les oocystes) ou les bradyzoïtes (contenus dans les kystes) évoluent rapidement en tachyzoïtes. Ces derniers se différencient ensuite en mérozoïtes dans l'épithélium de l'iléon du chat.

Les mérozoïtes se multiplient par schizogonie. La multiplication asexuée se déroule dans le tube digestif mais aussi dans les tissus extra-intestinaux avec circulation de tachyzoïtes et formation secondaire de kystes.

Après quelques schizogonies, les mérozoïtes présents dans le tube digestif se différencient en gamontes (microgamètes mâles et macrogamètes femelles) et initient le cycle sexué. La fécondation des macrogamètes femelles par les microgamètes mâles donne naissance à des oocystes immatures dans la lumière intestinale qui sont éliminés dans le milieu extérieur par millions avec les fèces du chat (figure 7).

Les oocystes rejetés subissent une maturation (sporulation) dans l'environnement par sporogonie (figure 8). Cela nécessite une réduction méiotique et des changements morphologiques aboutissant à la formation de deux sporocystes, chacun contenant quatre sporozoïtes infectieux.

L'élimination des oocystes débute 3 à 7 jours après l'ingestion de kystes ou d'oocystes et peut durer jusqu'à 20 jours. Les chats infectés et en particulier les jeunes chats peuvent libérer jusqu'à plus de 100 millions d'oocystes dans leurs fèces.

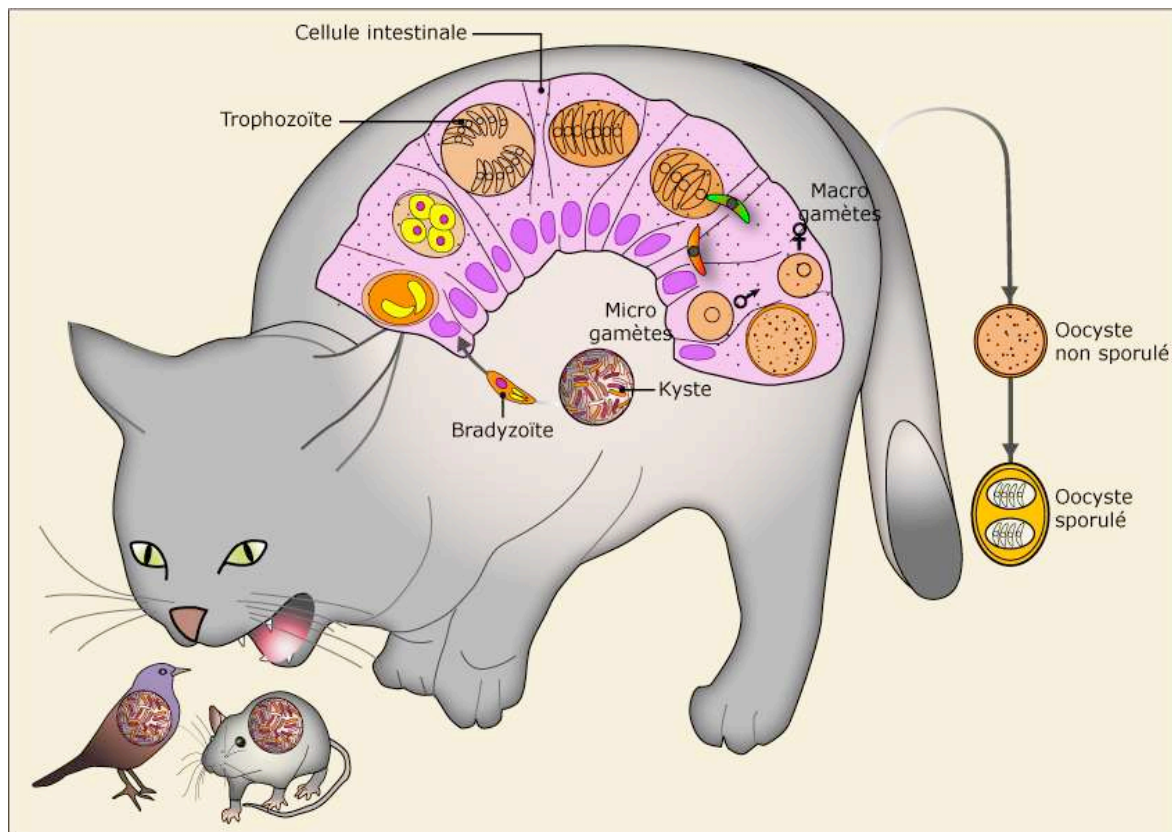


figure 7 : Les différents stades parasites chez l'hôte définitif (11)

2.2.3.2. Le cycle extraintestinal chez l'hôte intermédiaire

Chez les hôtes intermédiaires, la contamination se fait essentiellement par voie orale par ingestion de kystes vivants (contenus dans la chair d'animaux aussi bien carnivores qu'herbivores) ou d'oocystes sporulés (avec de l'eau ou des aliments souillés par les déjections du chat).

Après digestion de la paroi des kystes ou des oocystes dans l'estomac et le duodénum, les formes infectantes, bradyzoïtes ou sporozoïtes sont libérées dans le tube digestif et se différencient rapidement en tachyzoïtes à fort potentiel de multiplication intracellulaire (endodyogénèse).

Dans la phase aigüe de la maladie, les tachyzoïtes après pénétration dans les entérocytes de la lamina propria, disséminent par voie sanguine et lymphatique. Les tachyzoïtes se multiplient notamment dans les macrophages et les cellules dendritiques ce qui permet leur diffusion à l'ensemble de l'organisme. Si la phase aigüe de parasitémie a lieu durant la grossesse, les trophozoïtes peuvent passer à travers le placenta et infecter le fœtus.

La dissémination des tachyzoïtes suscite une réponse immunitaire humorale et cellulaire qui rapidement va contrôler la circulation des parasites et aboutir à la formation de kystes (muscles striés, cerveau). Observés dès 10 à 15 jours après l'ingestion d'oocystes ou de kystes tissulaires, la formation de kystes contenant les bradyzoïtes marque le début de la phase chronique de la maladie (figure 8).

Dans les tissus, les kystes produisent des antigènes qui traversent la membrane kystique et entretiennent l'immunité.

L'immunité acquise est sans effet sur les kystes qui vont persister indéfiniment dans certains tissus. On estime que la persistance des kystes permet le maintien d'une immunité durable notamment cellulaire, non stérilisante, mais protectrice contre toute nouvelle contamination à condition que le sujet soit immunocompétent.

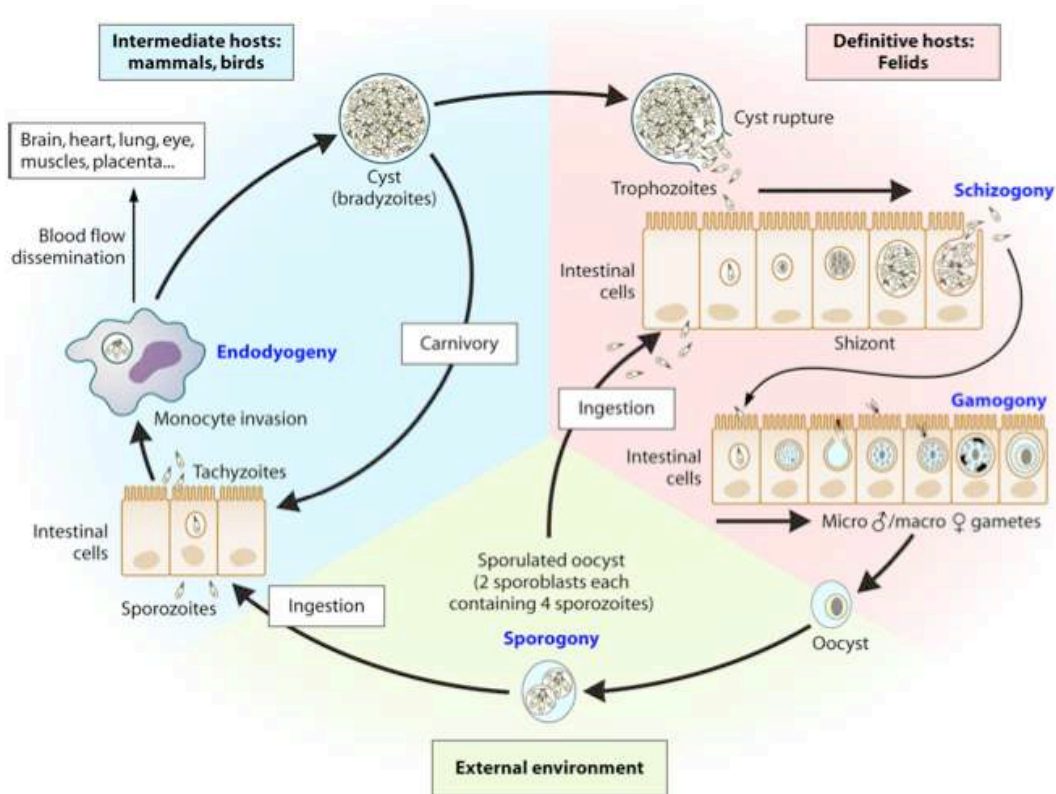


figure 8 : Le cycle biologique de *T. gondii* (8)

2.2.4. Résistance et sensibilité des différentes formes de *T. gondii*

♦ Les tachyzoïtes :

Les tachyzoïtes, présents uniquement pendant la phase aiguë de la maladie peuvent survivre à 4°C dans du lait pendant au moins une semaine (12) mais leur ingestion est rarement contaminante car ils sont sensibles aux sucs gastriques (13).

◆Les kystes :

Les kystes sont très résistants et notamment à l'acidité gastrique. Ils peuvent survivre plusieurs jours à température ambiante et plusieurs mois à 4°C mais sont thermosensibles. En effet, une température de 67°C au cœur de la viande permet d'obtenir une inactivation totale des kystes (10) (14). De même, ils sont détruits par une congélation à -20°C pendant 18 à 24h.

◆Les oocystes :

Les oocystes peuvent rester infectieux pendant 18 mois à l'abri de la lumière à une température moyenne d'environ 20°C (10). La résistance à la température a été testée pour différentes matrices, en conditions naturelles ou expérimentales : fèces, sol, baies, eau. Dans l'eau, ils restent infectieux pendant 54 mois à 4°C (10) ou 548 jours à 20-22°C (4). Très sensibles à la chaleur, ils sont rapidement inactivés à partir de 55°C. A l'inverse, une exposition à -20°C pendant 1 mois n'empêche pas l'infection (5). Leur résistance dans le sol ou les aliments est moins importante allant d'un mois à un an selon la température et les conditions d'expositions.

Les 3 formes parasitaires sont sensibles à la chaleur et notamment à la cuisson d'où son importance dans les mesures de prévention à appliquer contre l'infection toxoplasmique. Les autres modes de traitement (micro-ondes, salaison, fumaison) n'ont pas une efficacité certaine (15).

2.2.5. Modes de contamination de l'homme

2.2.5.1. A partir des kystes

En France, le principal mode de contamination est l'ingestion de kystes contenus dans des viandes crues ou insuffisamment cuites (figure 9). Ce risque varie selon la nature du réservoir (16).

-Mouton : 22 à 72 %

-Chèvre : 50%

-Porc : 10 à 38%

-Cheval : 10 à 29%

-Bœuf : très faible

-Volaille : 20%

Un problème de contamination humaine, consécutive à la consommation de viande de cheval importée de pays d'Amérique latine, semble émerger en France. Les souches de *T. gondii* impliquées sont particulièrement virulentes à l'origine de toxoplasmoses sévères, voire mortelles (17).

Les kystes sont également responsables de cas de contamination lors de la greffe d'un organe solide provenant d'un donneur immun chez un receveur séronégatif pour la toxoplasmosse. Les greffes cardiaques, dans cette situation sérologique défavorable, présentent un risque de transmission majeur et nécessitent une chimioprophylaxie.

2.2.5.2. A partir d'oocystes

L'homme s'infecte également par ingestion d'aliments (fruits, salades, crudités) ou de boissons souillés par des oocystes sporulés, provenant des déjections du chat (18) (figure 9) ou par une hygiène insuffisante des mains après contact avec le sol ou la litière souillée des chats (15).

2.2.5.3. A partir de tachyzoïtes

Il s'agit de la seule forme parasitaire capable de passer la barrière placentaire. Après contamination maternelle, le parasite diffuse par voie hématogène et peut contaminer le fœtus après colonisation placentaire. La dissémination du parasite chez le fœtus peut entraîner une atteinte multiviscérale (cerveau, œil, foie, poumon). Ce passage n'a lieu qu'au cours de la courte phase de parasitémie de la toxoplasmosse maternelle (8 à 10 jours) avant l'apparition des anticorps spécifiques (19).

Les transmissions par transfusion de produits sanguins contenant des tachyzoïtes sont très exceptionnelles.

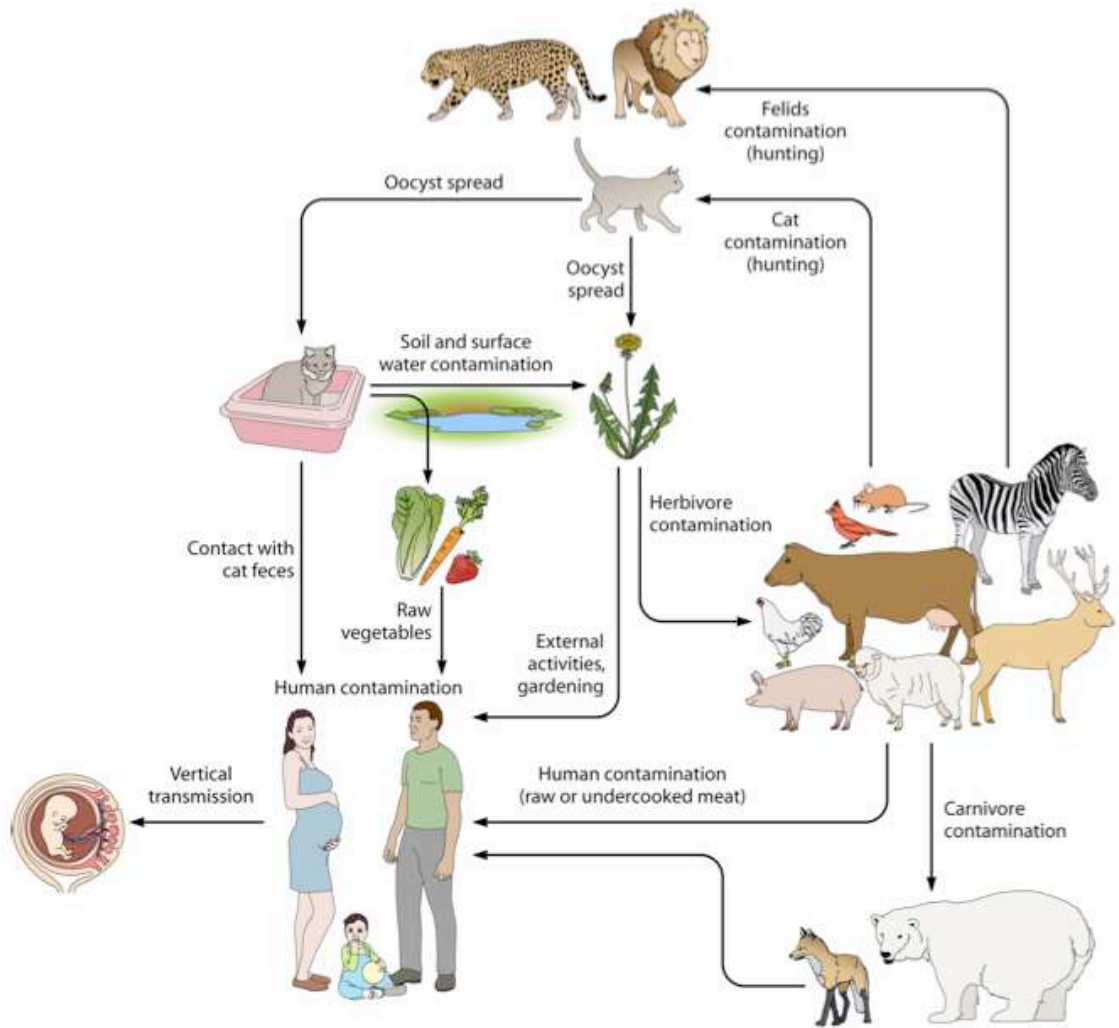


figure 9 : Sources d'infections à *T. gondii* chez l'homme : alimentation et environnement (8)

2.2.6. Principaux génotypes de *T. gondii*

Trois principaux génotypes de *T. gondii* (génotypes I, II et III) sont actuellement identifiés (20). Ces génotypes, équivalents à des lignées clonales, sont stables dans le temps et l'espace. Les différences entre les principaux génotypes concernent :

- la virulence de la souche : une souche est considérée comme virulente lorsqu'un tachyzoïte inoculé par voie intra péritonéale à une souris CD1 entraîne sa mort en moins de 10 jours (20),
- la vitesse de multiplication en culture cellulaire,
- la capacité de migration à travers les barrières biologiques.

Les principales caractéristiques biologiques des génotypes de *T. gondii* sont les suivantes :

Génotype I :

- rarement isolé,
- origine principalement humaine,
- comportement *in vivo* : virulence importante chez la souris,
- comportement *in vitro* : fort potentiel de multiplication en culture cellulaire.

Génotype II :

- 80% des isolats,
- origine humaine ou animale (domestique et sauvage),
- comportement *in vivo* : non virulent, infection chronique chez la souris avec persistance de kystes tissulaires,
- comportement *in vitro* : faible taux de multiplication, formation de kystes en culture cellulaire.

Génotype III :

- rarement isolé,
- origine humaine ou animale,
- comportement *in vivo* : virulence intermédiaire entre génotypes de type I et II,
- comportement *in vitro* : peu étudié.

La distribution géographique des génotypes est variable d'un continent à l'autre (figure 11). Tous les génotypes peuvent infecter l'homme, mais une large prédominance du génotype II et de ses variants est observée en Europe et, notamment en France métropolitaine (21) (figure 10).

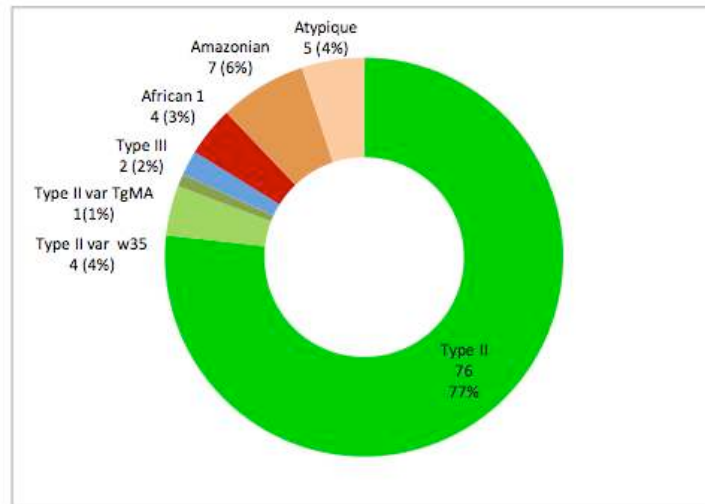


figure 10 : Répartition des différents génotypes de *T.gondii* en France pour l'année 2012 (1)

En 2012, le CNR a recueilli 115 souches de *T. gondii* provenant de 33 laboratoires de parasitologie de CHU et de quelques centres hospitaliers de métropole et des DOM-TOM. 66% des souches adressées au CNR étaient responsables de toxoplasmose congénitale. Seulement 99 de ces souches ont pu être génotypées.

Le type II et ses variants représentaient 82% des isolats et 92,6% des souches responsables génotypes de toxoplasmose congénitale. Ces pourcentages sont stables depuis 2006 (1).

Le génotype « Africa 1 » a été retrouvé dans 4 cas dont un cas de toxoplasmose congénitale sévère. Sept souches isolées en Guyane Française, correspondaient à des génotypes « Amazonian » (1)

Les génotypes recombinants (combinaison des allèles classiques : I/II, I/III, II/III, I/II/III) et les génotypes atypiques (combinaison partielle ou totale d'allèles non I, II ou III) représentaient 4% des isolats (1) (22).

Geographical area	Genotypes	Specific features of human disease in immunocompetent individuals and those with congenital toxoplasmosis
Europe	Type II (haplogroup 2), highly predominant; type III, more present in South Europe; other genotypes sporadically observed	Asymptomatic or benign disease in immunocompetent individuals associated with type II or III; lower rate of retinochoroiditis in immunocompetent patients and in those with congenital toxoplasmosis than in areas of South America
North America	Type II (haplogroup 2), haplogroup 12, type III (haplogroup 3), other genotypes	Asymptomatic or benign disease in immunocompetent individuals associated with type II or III; not enough data for other haplogroups
South and Central America	High genotypic diversity; some haplogroups shared with Africa (haplogroup 6); type II sporadically present; type I rarely encountered; highly atypical genotypes in the Amazonian forest	Higher rate and severity of retinochoroiditis in immunocompetent patients and in those with congenital toxoplasmosis; disseminated, potentially lethal, cases observed with the most atypical genotypes
Africa	African 1, 2, 3 (haplogroup 6); type III (haplogroup 3); type II	Data showed a higher rate of retinochoroiditis than in Europe
Asia	Less genotypic diversity than in South America; type III (haplogroup 3); a common haplogroup widespread across the continent	No comparative data

figure 11 : Distribution géographique des génotypes de *T. gondii* (8)

2.3. Epidémiologie

2.3.1. La séroprévalence

2.3.1.1. La prévalence dans le monde

Il est admis que 25 à 30% de la population mondiale est infectée par *T. gondii* (23). En réalité, la prévalence est très variable selon les pays de 10 à 80% et même selon les régions au sein d'un pays donné (24). De faibles prévalences (10 à 30%) sont observées en Amérique du nord, en Asie du sud-est, en Europe du Nord et dans les pays du sahel. Des prévalences modérées (30 à 50%) sont rapportées dans les pays d'Europe Centrale et d'Europe du Sud tandis que de fortes prévalences (50 à 80%) sont décrites en Amérique Latine et en Afrique tropicale.

La prévalence de la toxoplasmose varie essentiellement en fonction des habitudes alimentaires, des conditions d'hygiène, des conditions d'élevage des animaux domestiques et de la présence de félinés dans l'environnement.

Le climat joue également un rôle important, en effet, la prévalence est plus élevée dans les régions à climat chaud et humide et à basse altitude (25).

2.3.1.2. La prévalence en France

La toxoplasmose est l'une des infections les plus prévalentes en France avec des valeurs de séroprévalence chez l'adulte comprise entre 20 et 55%.

La séroprévalence chez les hommes n'est pas significativement différente de celle observée chez les femmes (26)(27).

La séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes en âge de procréer était de 82% en 1960, de 54,3% en 1995, de 43,8% en 2003 et seulement de 36,7% en 2010. Une baisse continue de la prévalence est attendue pour les années à venir. Une étude a estimée la séroprévalence chez la femme en âge de procréer à 27% en 2020 (28). Cette diminution de près de 50% peut s'expliquer par des changements de modes de vie (hygiène, alimentation, surgélation) et de conditions d'élevage ayant permis de limiter l'exposition de la population.

La séroprévalence augmente avec l'âge (tableau 1). En 2010, elle a été estimée à 26,5% chez les jeunes femmes enceintes de 20-25 ans et à 48,4% chez celles de 35-40 ans. Une hétérogénéité s'observe également en fonction des régions (figure 12) avec une prévalence élevée dans les DOM (54,8 %), en région parisienne (52,7%) et dans le sud-ouest (50%) (régions tempérées, chaudes et humides) et faible dans le nord-est (29,5%) (régions à climat hivernal, froid et sec).

Par ailleurs, en France, une corrélation positive a été mise en évidence entre la consommation régionale de viande de mouton et la prévalence de la toxoplasmose.

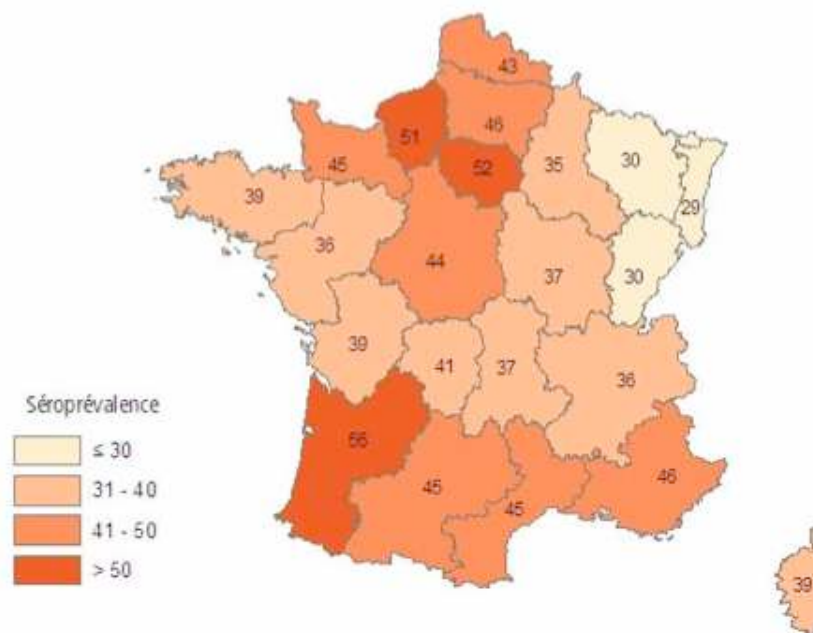


figure 12 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes selon la région d'habitation, standardisée sur l'âge (France 2003) (29)

Tableau 1 : Prévalence estimée de la toxoplasmose chez les femmes enceintes (1995-2003) en fonction de l'âge (30)

	20 ans	25 ans	30 ans	35 ans	40 ans
1995	37,6 %	44,7 %	51,7 %	58,6 %	65,4 %
1996	36,7 %	43,7 %	50,6 %	57,6 %	64,3 %
1997	35,8 %	42,7 %	49,6 %	56,5 %	63,2 %
1998	35,0 %	41,8 %	48,6 %	55,4 %	62,2 %
1999	34,2 %	40,8 %	47,6 %	54,4 %	61,1 %
2000	33,4 %	39,9 %	46,6 %	53,3 %	60,0 %
2001	32,6 %	39,0 %	45,6 %	52,3 %	58,9 %
2002	31,8 %	38,1 %	44,6 %	51,2 %	57,9 %
2003	31,0 %	37,3 %	43,7 %	50,2 %	56,8 %
Évolution 2003/1995	-17,4 %	-16,5 %	-15,5 %	-14,4 %	-13,1 %

2.3.2. Incidence de la toxoplasmose au cours de la grossesse

En 2003, Berger et al ont estimé le taux d'incidence de la toxoplasmose pour 1000 femmes enceintes à 7,2 pour les femmes âgées de 20 ans, 6,1 pour les femmes âgées de 30 ans et 6,3 pour les femmes âgées de 40 ans (30). Ce taux d'incidence varie également selon les régions géographiques, il est inférieur à 1/1000 en Alsace, Picardie et Corse ; entre 11 et 20/1000 en Aquitaine et entre 20 et 68 dans le Limousin (30).

Le taux d'incidence a diminué entre 1995 et 2003 de 17,6% chez les femmes âgées de 20 ans et de 8,3% chez les femmes âgées de 40 ans (tableau 2).

Tableau 2 : Taux d'incidence estimé de la toxoplasmose pour 1000 femmes enceintes (1995-2003) en fonction de l'âge (30)

	20 ans	25 ans	30 ans	35 ans	40 ans
1995	8,74	7,66	7,05	6,82	6,92
1996	8,52	7,49	6,92	6,72	6,84
1997	8,31	7,33	6,79	6,61	6,76
1998	8,11	7,17	6,67	6,52	6,68
1999	7,92	7,02	6,55	6,42	6,61
2000	7,73	6,88	6,43	6,33	6,54
2001	7,55	6,73	6,32	6,24	6,47
2002	7,37	6,60	6,21	6,16	6,41
2003	7,20	6,46	6,11	6,08	6,34
Évolution 2003/1995	-17,6 %	-15,7 %	-13,4 %	-10,9 %	-8,3 %

Sur cette même période, on constate que cette baisse du taux d'incidence est observée dans toutes les régions mais avec des variations entre 20 et 36% selon la région (figure 13).

L'incidence de la séroconversion toxoplasmique chez la femme de 30 ans est passée de 7,5 pour 1000 femmes enceintes en 1995 à 2,4 pour 1000 femmes enceintes en 2010.

Globalement, l'incidence de la séroconversion durant la grossesse a été estimée, en 2010, à 1,9 pour 1000 femmes enceintes d'après les données du réseau Toxosurv (28).

Elle est évaluée à 1,6 pour 1000 femmes enceintes en 2020 (28).

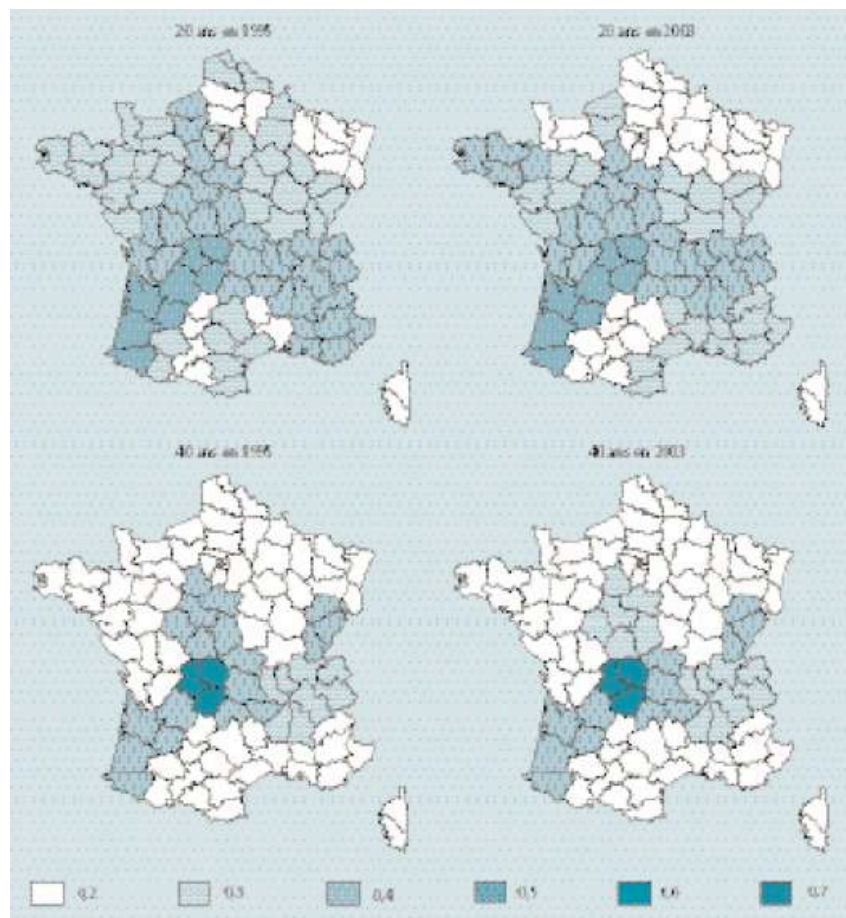


figure 13 : Evolution au cours du temps du taux d'incidence de la toxoplasmose pour 1000 femmes enceintes âgées de 20 et 40 ans, 1995-2003 (30)

2.4. L'infection à *Toxoplasma gondii* chez la femme enceinte

2.4.1. Aspects réglementaires

2.4.1.1. En France

La prévention de la toxoplasmose congénitale repose sur un programme de surveillance sérologique des femmes enceintes, obligatoires depuis 1978.

Les principaux objectifs sont :

- ✓ établir le statut immunologique de la patiente vis-à-vis de la toxoplasmose,
- ✓ identifier les femmes enceintes non immunes pour limiter le risque de contamination au cours de la grossesse,
- ✓ diagnostiquer le plus précocement possible une séroconversion maternelle en cours de grossesse.

La circulaire n° 605 du 27 septembre 1983 y adjoint la prescription de règles hygiéno-diététiques pour éviter la contamination.

Le décret d'application n° 92-144 du 14 février 1992 impose un dépistage sérologique de la toxoplasmose avant la fin du premier trimestre de la grossesse en l'absence de résultats prouvant l'immunité acquise, ainsi qu'une surveillance par un suivi sérologique mensuel des femmes enceintes séronégatives jusqu'à l'accouchement.

Actuellement, à défaut d'obligation légale, la détermination du statut immunitaire de la future mère vis-à-vis de la toxoplasmose avant la conception permettrait de limiter les difficultés d'interprétation des sérologies au cours de la grossesse. Ainsi pour les femmes en âge de procréer, il pourrait être utile de prévoir une sérologie lors de la prescription d'un moyen de contraception et à l'arrêt de celui-ci en cas de première sérologie négative (31).

De même, un dernier contrôle sérologique 3 semaines à 1 mois après l'accouchement est fortement conseillé pour détecter les séroconversions en fin de grossesse.

2.4.1.2. A l'étranger

Quatre pays européens ont également développé un système de dépistage obligatoire chez les femmes enceintes séronégatives avec de tests mensuels (Italie) ou trimestriel (Autriche, Lituanie, Slovaquie).

En Grande-Bretagne, Le National Institute for Clinical Excellence (NICE) recommande de ne pas effectuer de dépistage de la toxoplasmose (32).

En 1999, un programme de dépistage néonatal a été mis en place au Danemark puis abandonné en 2007 devant l'absence d'efficacité du traitement sur la fréquence de survenue des complications oculaires chez les enfants présentant ou non ce type de lésion à la naissance.

Un grand nombre de pays européens n'ont formulé aucune recommandation mais des programmes locaux de dépistage existent dans certains pays : dépistage prénatal en Belgique, République Tchèque, Chypre, Finlande, Allemagne, Grèce, Norvège et Portugal ou dépistage néonatal en Pologne (33).

2.4.2. Toxoplasmose acquise : aspects cliniques

L'infection toxoplasmique peut se présenter sous différentes formes :

-la forme latente

La primo-infection toxoplasmique est bénigne ou asymptomatique dans plus de 80% des cas (34).

-la forme lymphadénitique

Elle est caractérisée par des adénopathies apparaissant entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour. Les adénopathies qui peuvent être localisées au niveau de tous les territoires ganglionnaires sont de petites tailles, fermes, mobiles et peu sensibles à la palpation. Elles s'accompagnent souvent d'autres symptômes pouvant associer :

- une fièvre à 38,5-39°C pendant 4 à 5 jours,
- une asthénie,
- une angine érythémateuse,
- des troubles digestifs (anorexie, diarrhée, nausées),
- un ictère ou subictère,
- des arthralgies,
- un exanthème maculo-papuleux.

Un syndrome mononucléosique sanguin est fréquemment retrouvé.

-la forme oculaire

Il s'agit d'une chorioretinite souvent consécutive à une infection patente avec des signes cliniques assez marqués. Elle est unilatérale, ne comporte qu'un seul foyer et l'évolution se fait par poussées.

2.4.3. Le diagnostic de l'infection maternelle

Chez l'immunocompétent, la sérologie est la base du dépistage et du diagnostic de la toxoplasmose.

Le diagnostic d'une infection toxoplasmique aiguë repose sur la mise en évidence de :

- ✓ l'apparition d'anticorps spécifiques IgM, IgA puis IgG signant la séroconversion,
- ✓ l'ascension significative des IgG (avec ou sans IgM) sur deux prélèvements réalisés à trois semaines d'intervalles (le titre des anticorps doit être au moins multiplié par 2).

En cas de séroconversion, il faudra dater avec le maximum de précision l'infection maternelle en déterminant la cinétique d'apparition des anticorps spécifiques. La conduite à tenir diagnostique et thérapeutique dépend de la date de l'infection maternelle par rapport à la grossesse.

En France, selon la nomenclature des actes de biologie médicale, la législation impose de réaliser le diagnostic sérologique par au moins deux techniques différentes afin de rechercher deux isotypes différents dont les IgG et de pratiquer un titrage en Unités Internationales pour les IgG (UI/mL).

En pratique, la majorité des laboratoires non spécialisés utilisent une technique ELISA commerciale, seul 34% de ces laboratoires utilisent une seconde technique.

La seconde sérologie doit être effectuée trois semaines plus tard avec les mêmes techniques et dans le même laboratoire (35). Une reprise en parallèle des deux sérums est préconisée en cas de taux limite ou de suspicion d'une infection récente.

Le laboratoire doit mentionner sur son compte-rendu les techniques utilisées avec les valeurs seuils et le résultat doit être accompagné d'une conclusion argumentée avec interprétation du profil sérologique et des modalités du suivi. Il a également l'obligation de conserver à -20°C tous les sérums analysés pendant au moins 1 an.

2.4.3.1. cinétique d'apparition des anticorps

Parmi les antigènes du toxoplasme, certains sont ubiquitaires et reconnus par des anticorps présents même chez le sujet non infecté (36). D'autres lui sont propres et vont susciter l'apparition d'anticorps spécifiques appartenant aux différentes classes d'immunoglobulines IgM, IgA, IgE et IgG. L'organisme élabore en premier lieu les immunoglobulines spécifiques dirigées contre la membrane, puis contre les constituants cytoplasmiques du parasite.

Les anticorps IgM :

Les premiers anticorps synthétisés au cours de l'infection sont les IgM (figure 14). Ils apparaissent environ une semaine après la contamination, atteignent un plateau en 1 mois et persistent durant une période plus ou moins longue avec de grandes variations individuelles. La sensibilité des techniques sérologiques rend leur détection possible au-delà d'un an après la contamination.

Les anticorps IgA :

La sécrétion des anticorps IgA survient dans le premier mois de l'infection avec une cinétique comparable à celle des IgM. Leur production est maximale 2 à 3 mois après la contamination puis ils se négativent rapidement dans un délai de 6 à 9 mois dans la majorité des cas. Les anticorps IgA sont de bons marqueurs d'infection récente, toutefois ils ne sont pas synthétisés dans environ 5% des cas de séroconversion. Ils peuvent être détectés au cours des réactivations sérologiques. Il n'existe pas d'anticorps naturels de la classe des IgA.

Les anticorps IgG :

Les anticorps IgG de spécificité anti-membranaire apparaissent deux semaines environ après la contamination. Leur taux augmente rapidement, il est maximal 2 mois après la contamination. En l'absence de traitement spécifique, des titres élevés persistent pendant plusieurs mois (minimum 6 à 8 mois) puis diminuent lentement sans jamais disparaître. Les anticorps IgG de spécificité anti-cytoplasmique sont détectés moins précocement avec un décalage de 3 semaines à 1 mois et le plateau est atteint plus tardivement. En l'absence de détection d'anticorps IgM, les anticorps IgG sont le témoin d'une immunité.

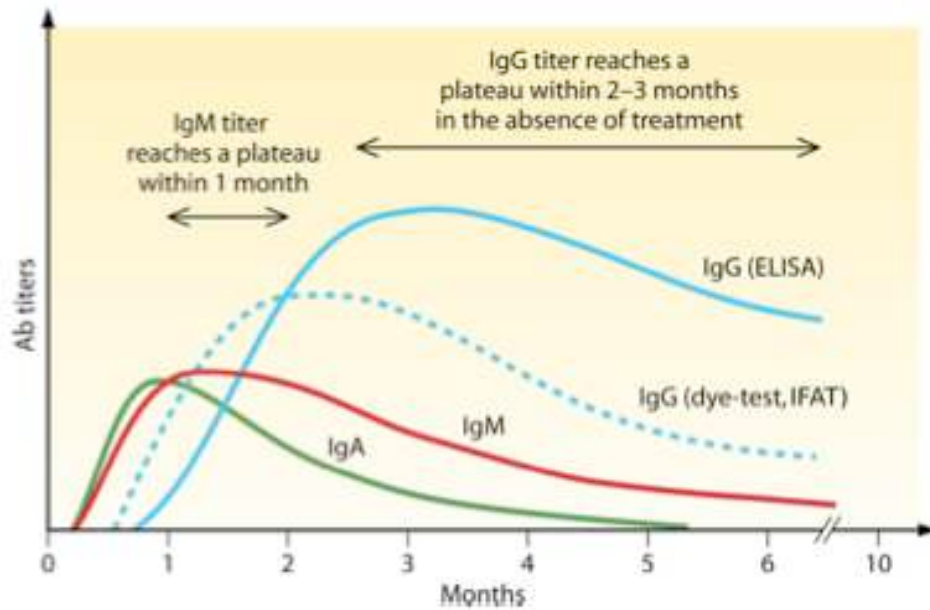


figure 14 : Cinétique des anticorps dans une infection toxoplasmique (8)

Au delà de cette cinétique classique, d'autres types de réponses humorales peuvent être observés (37):

- réactions majorées et prolongées avec un titre élevé d'IgG (+/- IgM) persistant pendant des années et souvent associées à des manifestations cliniques,

- réactions minimales, les IgG se positivent mais leur titre n'augmente pas. L'index des IgM est plus ou moins élevé. La présence d'IgM et d'IgG à des titres faibles peut se prolonger pendant plusieurs mois, voire des années. Cette cinétique s'observe très souvent lorsque le traitement est intervenu précocement mais parfois chez des sujets non traités, le plus souvent sans aucune manifestation clinique,

- réactions sans détection d'anticorps IgM, les IgG spécifiques se positivent et leur titre augmente fortement sans que l'on mette en évidence d'IgM. Cette cinétique suggère une réinfestation.

2.4.3.2. *techniques de mise en évidence des anticorps*

De nombreuses techniques basées sur des principes sérologiques différents sont disponibles.

Citons à titre d'exemple l'agglutination, l'immunofluorescence, l'immunoenzymologie et l'immunocapture.

La plupart des laboratoires utilisent en routine des trousse commercialisées pour des tests basés sur des réactions **immunoenzymatiques** ou d'**immunochemiluminescence** (ELISA ou EIA).

Les techniques disponibles mettent en œuvre différents types d'antigènes de *T. gondii* : **les antigènes de surface** ou antigènes figurés (tachyzoïtes entiers, vivants ou fixés) et **les antigènes solubles** composés d'extraits de tachyzoïtes.

Les techniques utilisant des antigènes solubles sont moins sensibles en début d'infection alors que celles utilisant des antigènes de surface sont les premières à se positiver.

2.4.3.3. Techniques utilisant des antigènes figurés

Il existe 3 techniques principales mettant en œuvre des antigènes de surface :

❖ **test de lyse des toxoplasmes vivants ou Dye test**

Mis au point en 1948 par Sabin et Feldmann, il n'est plus disponible que dans de rares centres spécialisés dont le CHU de Bordeaux vu la complexité de sa réalisation et la nécessité d'entretenir la souche de toxoplasme chez la souris.

Son principe est basé sur l'observation au microscope de la lyse des tachyzoïtes vivants par les anticorps spécifiques présents dans le sérum à tester. Les anticorps sensibilisent la paroi cellulaire du toxoplasme à l'action du complément, provenant de sérums de donneurs non immuns, ce qui entraîne une fuite du contenu du toxoplasme.

La réaction est positive lorsque 50% des toxoplasmes sont lysés. Le titre est exprimé en UI/mL en comparaison avec un sérum étalon de l'OMS. Le seuil de positivité est à 2 UI/mL.

Le test révèle principalement les IgG dirigés contre les antigènes membranaires.

Cette technique reste une technique de référence en raison de sa sensibilité, de la précocité de détection des anticorps en début d'infection (10 à 15 jours après contamination) et surtout de sa grande spécificité.

❖ L'immunofluorescence indirecte (IFI)

La technique utilise des tachyzoïtes formolés et fixés sur une lame à puits dans lesquels on ajoute différentes dilutions du sérum à tester. Les anticorps dirigés contre des antigènes membranaires sont révélés par addition d'antiglobulines anti-IgG ou anti-IgM marquées par un composant fluorescent, l'isothiocyanate de fluorescéine.

Sa sensibilité et sa spécificité sont proches de celles du Dye Test. Le titre correspond à la dernière dilution du sérum pour laquelle l'intégralité de la membrane des tachyzoïtes apparaît fluorescente et le résultat est exprimé en UI/mL.

Le seuil de positivité des IgG est à 8 UI/mL avec une détection précoce 10 à 15 jours après la contamination. Il existe un risque de faux positifs avec les anticorps anti-nucléaires.

La détection des IgM est également possible (test de Remington). Le seuil de positivité est défini à 1/40 mais il existe de nombreux faux positifs (facteur rhumatoïde) et faux négatifs.

❖ agglutination directe sensibilisée (*Toxoscreen DA bioMérieux*)

Cette technique utilise une suspension de tachyzoïtes traités par de la trypsine et du formol pour révéler un plus grand nombre de sites antigéniques et fixer les tachyzoïtes. La présence d'IgG anti-toxoplasmiques dans le sérum à tester provoque la formation d'un voile d'agglutination des toxoplasmes.

Le seuil de positivité est fixé à 4 UI/mL.

Cette réaction ne doit pas être utilisée pour révéler les anticorps IgM car elle manque de sensibilité et de spécificité.

Cette technique est utilisée pour le dépistage en routine devant son excellente sensibilité (100%), sa spécificité (99,2 %), sa VPN (100%) et sa VPP (99,2%) (38).

2.4.3.4. Techniques utilisant des antigènes solubles

Ces techniques utilisent des antigènes extraits de tachyzoïtes. L'antigène soluble fabriqué est constitué d'un mélange d'antigènes cytoplasmiques et d'antigènes membranaires en proportions variables.

❖ **Hémagglutination indirecte** (*Toxo-HAI Fumouze, Toxoplasmosis Cellognost*)

Le principe consiste à ajouter une suspension d'hématies de mouton sensibilisées avec un antigène toxoplasmique soluble dans des dilutions de sérum à tester. Cette technique permet la détection des IgG qui est d'autant plus tardive que l'antigène est à composant majeur cytoplasmique. Elle ne doit pas être utilisée pour la détection des IgM.

Le seuil de positivité correspond à une dilution du sérum au 1/40^{ème}.

Cette technique présente l'intérêt d'être un test de dépistage qualitatif ou semi-quantitatif peu coûteux, simple et rapide (31).

❖ **Agglutination de particules de latex sensibilisées** (*Toxolates Fumouze, pastorex Bio-rad, Toxocell latex Biokit*)

Il s'agit d'une technique d'agglutination utilisant des billes de latex ou de polystyrène sensibilisées par des antigènes toxoplasmiques.

Cette méthode détecte l'ensemble des Ig sériques mais il s'agit d'une méthode qualitative avec un risque de faux négatifs par phénomène de zone lorsque les titres en anticorps sont trop élevés.

❖ **Techniques immunoenzymatiques (EIA)**

Les antigènes fixés sur un support solide sont incubés avec l'échantillon sérique. Les anticorps spécifiques du sérum se fixent puis sont mis en évidence par une antiglobuline anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM humaine marquée par une enzyme. L'hydrolyse d'un substrat chromogène spécifique de l'enzyme aboutit à la formation d'un composé coloré ou fluorescent quantifiable grâce à un spectrophotomètre ou un fluorimètre.

Ces techniques sont actuellement les plus utilisées car elles ont l'avantage d'être automatisables (microplaques ou automates fermés), fiables, reproductibles avec une lecture objective. De nombreuses trousse sont actuellement commercialisées : ABBOTT (AxSYM, Architect), BECKMAN (Access, DXI), BIOMERIEUX (Vidas), BIORAD (Platelia), DIASORIN (Liaison), ORTHO (Vitros), ROCHE (Cobas 6000, Modular, Elecsys), SIEMENS (Advia Centaur, Immulite).

EIA IgG :

Le titrage s'effectue en UI/mL grâce à un étalonnage par rapport à un sérum international OMS. Le seuil de positivité est variable, de 3 à 30 UI/mL selon les trousse commercialisées. Cette technique présente une excellente spécificité (de 98,7 % (Modular) à 100%(Access)) mais une sensibilité moins bonne variable selon les trousse (de 89,7%(Access) à 98,3%(Modular)) (39).

La plupart des fabricants, pour une question de sécurité, proposent des seuils de positivité très élevés rendant la technique plus spécifique mais moins sensible. Par conséquent, il n'existe pratiquement pas de femmes enceintes faussement positives en IgG, et donc non suivies durant leur grossesse car considérées comme étant immunisées. Par contre, la baisse de la sensibilité a pour conséquence de retrouver des femmes enceintes immunisées avec des titres d'IgG trop bas pour pouvoir l'affirmer, obligeant un suivi sérologique mensuel. Ainsi, il est important pour les laboratoires de ne pas modifier à la hausse le seuil de positivité proposé par le fournisseur afin de ne pas induire des suivis inutiles.

Il est également nécessaire de rester prudent lorsque les taux d'IgG sont faibles c'est-à-dire inférieurs au seuil de positivité. Dans ces situations, il vaut mieux parler de titres trop faibles pour affirmer l'immunisation plutôt que d'affirmer que la patiente est non immunisée. L'utilisation d'une autre technique pourrait rendre un titre en IgG supérieur au seuil de positivité et permettre d'affirmer ainsi l'immunité de la patiente.

Le titre en UI/mL est très variable d'une technique à l'autre malgré l'utilisation de l'étalon international. La concordance globale entre les techniques reste satisfaisante, mais les discordances peuvent atteindre 18,5% pour les sérums avec un titre faible en anticorps (39) nécessitant le recours à des techniques de confirmation (Western Blot, dye test) afin d'éviter des suivis obstétricaux inutiles (37).

L'interprétation d'un suivi sérologique doit donc toujours être effectuée en utilisant la même technique dans le même laboratoire et dans la même série.

EIA IgM :

Ce sont les mêmes trousse que celles utilisées pour les IgG mais la recherche des IgM se faisant après une étape d'immunocapture préalable, il n'y a pas de compétition avec les IgG. Les résultats sont rendus sous forme d'un index calculé par rapport à la densité optique de la valeur seuil, en l'absence d'un sérum étalon.

La spécificité de ces techniques commercialisées n'étant pas excellente, elles détectent les IgM naturelles ou issues d'une réaction intercurrente non spécifique. Par contre, elles sont de plus en plus sensibles et précoces ce qui présente un intérêt pour une prise en charge plus rapide lors d'une séroconversion. Cependant, les IgM spécifiques sont fréquemment détectées plus d'un an après la contamination, parfois à des titres élevés, et des IgM résiduelles sont retrouvées dans 1/3 des infections chroniques (40).

2.4.3.5. *Techniques complémentaires*

Ces techniques sont proposées pour l'analyse qualitative ou quantitative des anticorps dans les cas d'interprétation sérologique difficile afin de dater l'infection toxoplasmique. On peut citer la détection des IgM et des IgA par immunocapture, le test d'avidité des IgG, le Western-blot.

❖ **ISAGA (Immuno-Sorbent Agglutination Assay)** *ISAGA bioMérieux*

La technique utilise des antigènes figurés et repose sur le principe d'immunocapture des anticorps IgM ou IgA et plus rarement IgE (38).

La réaction se fait en deux étapes : la première correspond à l'immunocapture des anticorps du sérum à tester par une antiglobuline anti-chaine μ humaine (IgM) ou α (IgA) fixée sur un support. Dans la 2^{ème} étape, l'antigène (suspension de tachyzoïtes formolés) est ajouté. Une réaction positive se traduit par une agglutination des anticorps spécifiques présents dans le sérum avec les toxoplasmes.

Il s'agit d'une **technique semi-quantitative** avec un résultat exprimé sous la forme d'un score de 0 à 12. Le résultat est considéré positif chez les adultes pour un score supérieur ou égal à 9.

Pour les IgM :

C'est la **technique de référence en France pour les IgM** devant la précocité de détection et une sensibilité de 100%. Chez 30% des patientes, les IgM sont détectées plus de 2 ans après la contamination (41). Cette technique est plus spécifique que l'ELISA mais le risque de faux positifs existe avec les anticorps naturels.

Pour les IgA :

La technique est spécifique et sensible avec une détection des IgA plus d'un an après la contamination. Il n'existe pas d'anticorps naturels IgA. Les IgA sont régulièrement détectées au cours des réactivations. Elle constitue la méthode de référence chez les bébés.

❖ Test d'avidité des IgG

La mesure de l'avidité est réalisée par adaptation des techniques EIA IgG automatisées et exprime l'intensité de la liaison des antigènes et des anticorps. L'avidité augmente avec le temps dans les semaines suivant l'infection puis se stabilise. L'utilisation d'un agent dissociant perturbant la liaison antigène-anticorps aura peu d'effet sur la liaison des anticorps de forte avidité alors qu'elle provoquera la dissociation des anticorps de faible avidité. Le rapport des densités optiques (DO) obtenues avec et sans agent dissociant permet de mesurer l'indice d'avidité des IgG.

Il existe quelques trousse commercialisées : Vidas (BioMérieux), liaison (Diasorin), Platelia (Biorad), Architect (Abbott), Elecsys (Roche).

Il s'agit d'un test d'exclusion permettant d'éliminer une infection récente.

L'index d'avidité des IgG est élevé dans les infections anciennes. Le délai d'exclusion varie de 3 à 5 mois selon la trousse commercialisée. En effet, la cinétique d'avidité est lente (0,002/mois) dans les premiers mois et le temps moyen pour atteindre le seuil est de 14 mois. Il est donc exceptionnel d'avoir une avidité forte associée à une infection récente. Par contre, il est fréquent d'avoir une avidité faible associée à une infection ancienne.

Le pourcentage de patientes avec une infection chronique ayant une avidité faible varie de 0% à 66% selon les études (42). Une avidité faible peut persister pendant plus de 6 ans après la contamination. Différents facteurs peuvent influencer la maturation des IgG : variation individuelle, système utilisé, immunodépression, traitement.

La mesure de l'avidité permet souvent de conclure sur le premier sérum ; celui-ci doit être prélevé le plus tôt possible au cours de la grossesse pour faciliter l'interprétation. L'avidité n'est pas interprétable si la patiente est traitée.

❖ Western blot

Dans le cadre de confirmation, le test de référence est le test de lyse des toxoplasmes. Une alternative de choix a été proposée par la société LD-Bio qui commercialise une technique Western blot (cf principe page 72), LD-Bio-Toxo II IgG, qui présente une excellente concordance avec le test de lyse (sensibilité 99,2%, spécificité de 100%) (43, 44). Son coût reste élevé mais simple d'utilisation, elle peut être réalisée dans des laboratoires non spécialisés.

Elle est intéressante pour confirmer précocement un diagnostic de séroconversion sur le 1^{er} sérum (figure 15) ou l'immunité d'une patiente présentant des titres d'IgG proches du seuil de positivité en EIA IgG (sensibilité : Cobas IgG 90,4%, Vidas IgG 58,6%, LD-Bio IgG 98,1%) En effet, dans la plupart des cas ces taux faibles correspondent à des IgG spécifiques et cela doit être affirmé de façon formelle par western blot ou test de lyse.

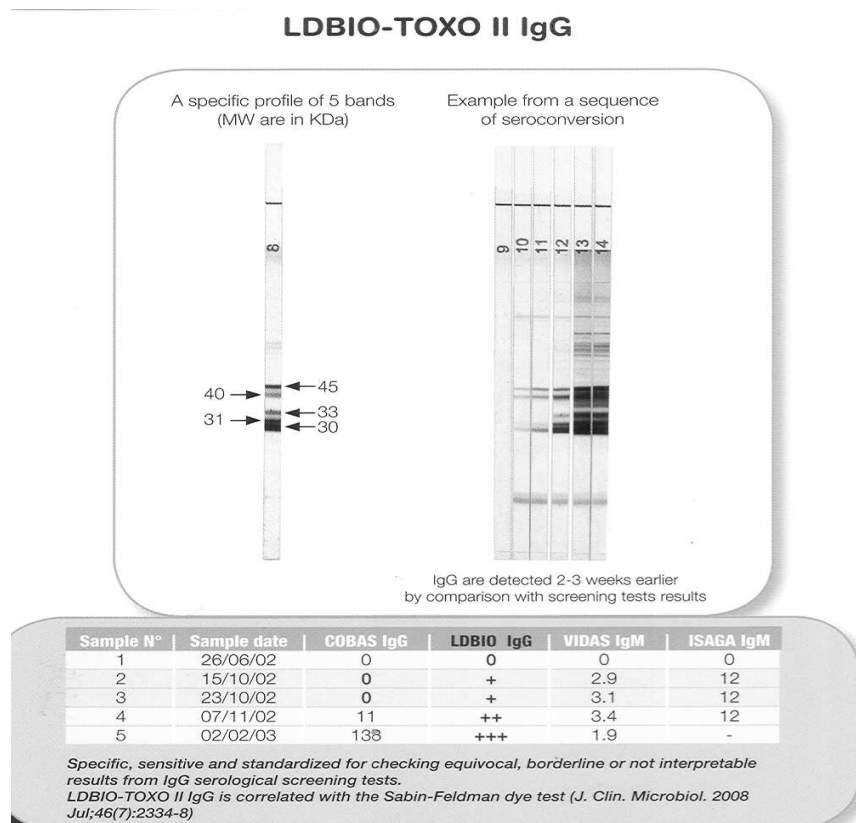


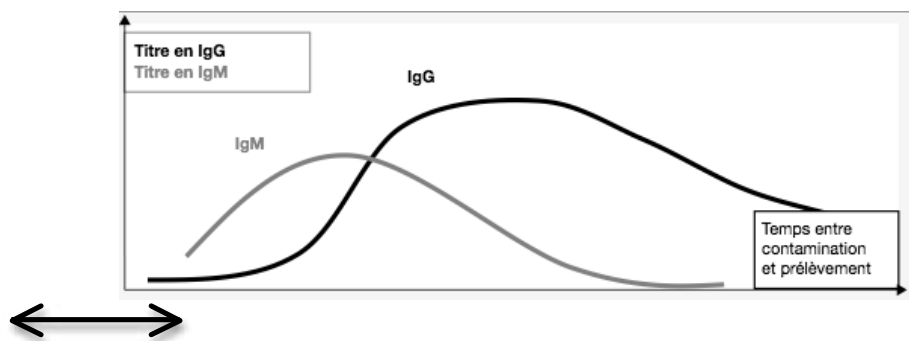
figure 15 : Profil de Western blot positif en IgG (44)

2.4.4. Interprétation des résultats sérologiques de la femme enceinte et conduite à tenir

L'interprétation d'une sérologie tient compte de la présence ou de l'absence d'IgM, d'IgA, d'IgG spécifique, de la cinétique d'évolution des anticorps et des techniques utilisées.

Pour les différents profils sérologiques qui vont suivre, on part du principe qu'il s'agit de la première sérologie réalisée en début de grossesse dans un LABM avec une technique EIA.

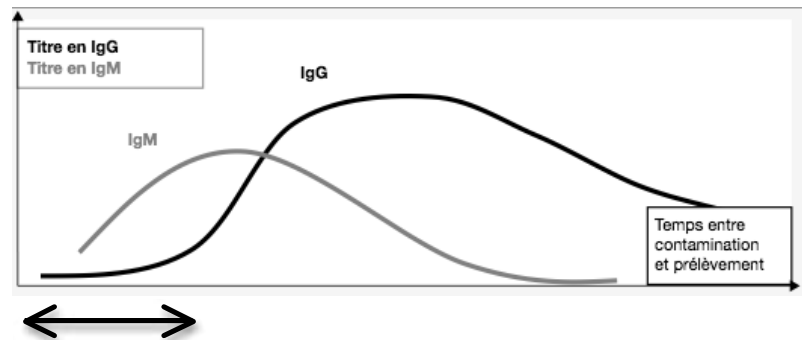
❖ Profil 1 : Absence d'IgG et d'IgM (37) (figure 16)



Interprétation : la patiente n'est pas immunisée, il convient de poursuivre une surveillance sérologique mensuelle jusqu'à l'accouchement avec un dernier contrôle 3 à 4 semaines après l'accouchement. Par ailleurs, on recommande le suivi strict des mesures hygiéno-diététiques.

Datation : la contamination a pu avoir lieu durant les 7 à 15 jours précédents

❖ **Profil 2 : Présence d'IgM et absence IgG (37) (figure 17)**



Interprétation : il peut s'agir d'un début de séroconversion ou de la présence de « fausses IgM ».

Datation : cette période s'étend du 7^{ème} au 15^{ème} jour après la contamination jusqu'à 3 à 6 semaines selon la technique utilisée.

La présence d'IgM doit être systématiquement confirmée par une seconde technique de principe différent. L'ISAGA est la technique de choix.

Deux situations peuvent ensuite se présenter :

1) *Technique de confirmation NEGATIVE*

Les IgM détectées en EIA correspondent à des IgM naturelles (détectant des antigènes ubiquitaires) ou issues d'une réaction intercurrente non spécifique (45). La patiente n'est pas immunisée et il faut poursuivre la surveillance sérologique mensuelle.

2) *Technique de confirmation POSITIVE*

Une infection toxoplasmique récente est très probable mais on ne peut exclure définitivement l'hypothèse de la présence d'IgM naturelles ou non spécifiques.

Un contrôle sérologique à 15 jours puis à 1 mois est demandé.

Si le résultat du second sérum est identique à celui du premier, la présence d'IgM naturelles ou non spécifiques est confirmée.

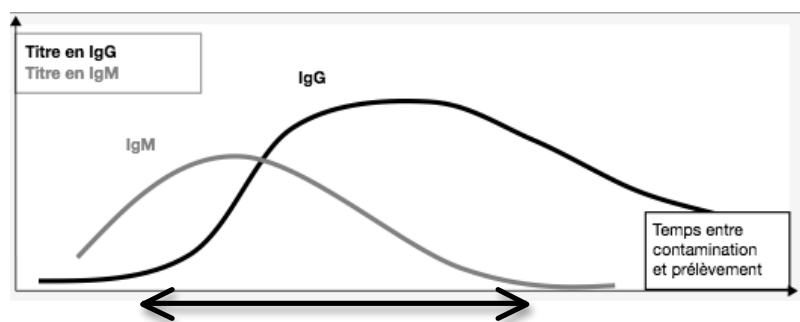
Une séroconversion toxoplasmique sera confirmée par l'apparition d'IgG spécifiques sur le second sérum. Des techniques complémentaires comme le Dye test, l'IFI ou le

western blot IgG peuvent permettre de diagnostiquer plus précocement la séroconversion sur le premier sérum.

Dans certains cas, l'apparition des IgG peut être retardée par un traitement spécifique précoce.

La mise en évidence d'IgA par ISAGA peut également aider au diagnostic d'une infection récente.

❖ Profil 3 : Présence d'IgG et d'IgM (37) (figure 18)



Interprétation : il peut s'agir soit d'une séroconversion, soit d'IgM résiduelles (ou non spécifiques).

Cette situation est de plus en plus fréquente, en raison surtout de l'augmentation de sensibilité des tests IgM automatisés.

Datation : cette période s'étend de 3 à 6 semaines après la contamination jusqu'à plus de 2 ans.

Pour la femme enceinte, il est alors très important de savoir si la contamination a eu lieu avant la conception ou pendant la grossesse. On peut rechercher des sérums antérieurs ou en l'absence d'antériorité, mesurer d'emblée l'avidité des IgG :

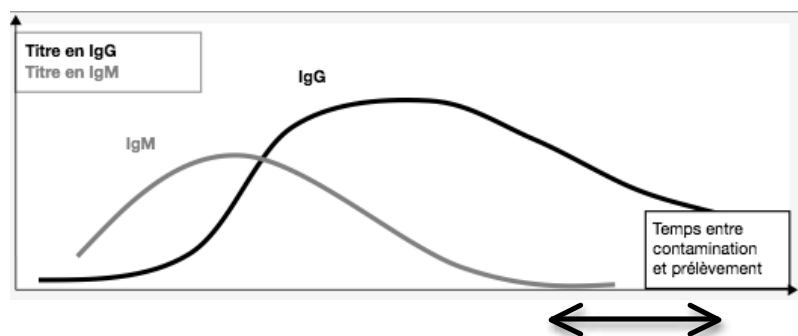
- si l'avidité des IgG est forte, on peut exclure à 100% une infection datant de moins de 4 mois (en fonction des réactifs utilisés) et donc antérieure à la grossesse si ce premier prélèvement a été réalisé en début de grossesse. On effectue quand même un contrôle sérologique à 3 semaines.

- si l'avidité des IgG est intermédiaire ou faible, on ne peut pas exclure une infection récente. Il faut alors réaliser une deuxième sérologie à 3 semaines d'intervalle afin de dater l'infection grâce à la cinétique des anticorps.

Si le taux d'IgG reste stable, on pourra conclure à une infection datant de plus de 2 ou 3 mois par rapport à la date du premier sérum (fonction de la trousse commercialisée utilisée). Si le taux d'IgG augmente significativement (doublement du titre) par rapport au premier sérum titré comparativement, l'infection est récente et date de moins de 2 à 3 mois.

La cinétique différentielle des IgG obtenue en réalisant en parallèle deux techniques utilisant des antigènes différents membranaires et cytoplasmiques, permet également de dater l'infection. Au CHU de Bordeaux, nous comparons les cinétiques des IgG avec le Dye test et l'EIA IgG DXi Beckman.

❖ Profil 4 : Présence d'IgG et absence d'IgM (37) (figure 19)



Interprétation : il s'agit d'une infection ancienne probable.

Datation : plus de 6 mois après la contamination.

En absence d'antécédents lors de la grossesse, un contrôle sérologique est effectué sur un deuxième sérum prélevé à 3 semaines d'intervalle.

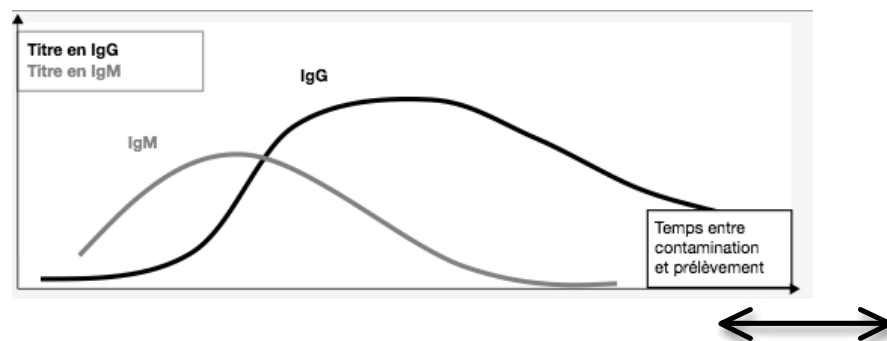
Si le titre des IgG est stable, on conclura à une infection ancienne.

Si le titre des IgG augmente significativement par rapport au premier sérum, il est recommandé de dater l'infection par la détermination de l'avidité des IgG sur le premier sérum.

-Si l'avidité est élevée, on conclura à une probable réactivation sérologique d'une infection ancienne sans risque pour le fœtus si la femme est immunocompétente.

-Si l'avidité est intermédiaire ou faible, on ne pourra pas exclure une infection récente sans IgM ou avec IgM fugaces. En effet, il existe de rares cas de séroconversion sans IgM ou avec des IgM transitoires. Le CNR en a répertorié 26 entre 2001 et 2011. Lorsque l'interprétation des résultats sérologiques est difficile, il est prudent d'initier le traitement chez les femmes enceintes, de les suivre et de suivre les nouveau-nés (46).

❖ Profil 5 : Présence d'IgG à un taux équivoque et absence d'IgM (37) (figure 20)



Un titre d'IgG équivoque c'est-à-dire dans la zone grise de la technique EIA utilisée pose le problème du statut immunitaire de la femme enceinte et donc de la poursuite ou non de la surveillance sérologique au cours de la grossesse.

En pratique, il est recommandé de réaliser une deuxième technique de détection des IgG de principe différent :

- 1) si la seconde technique est négative, on conclura à l'absence d'anticorps spécifiques
- 2) si la seconde technique est positive, on conclura à une infection ancienne probable. Ces résultats seront à confirmer sur un sérum prélevé à 3 semaines d'intervalle.
- 3) si la seconde technique est équivoque, il est conseillé d'envoyer le sérum à un laboratoire expert pour la réalisation de techniques complémentaires : Dye Test ou Western Blot.

La figure 21 récapitule l'expertise de la 1^{ère} sérologie réalisée au cours de la grossesse avec une technique EIA pour les IgG et les IgM.

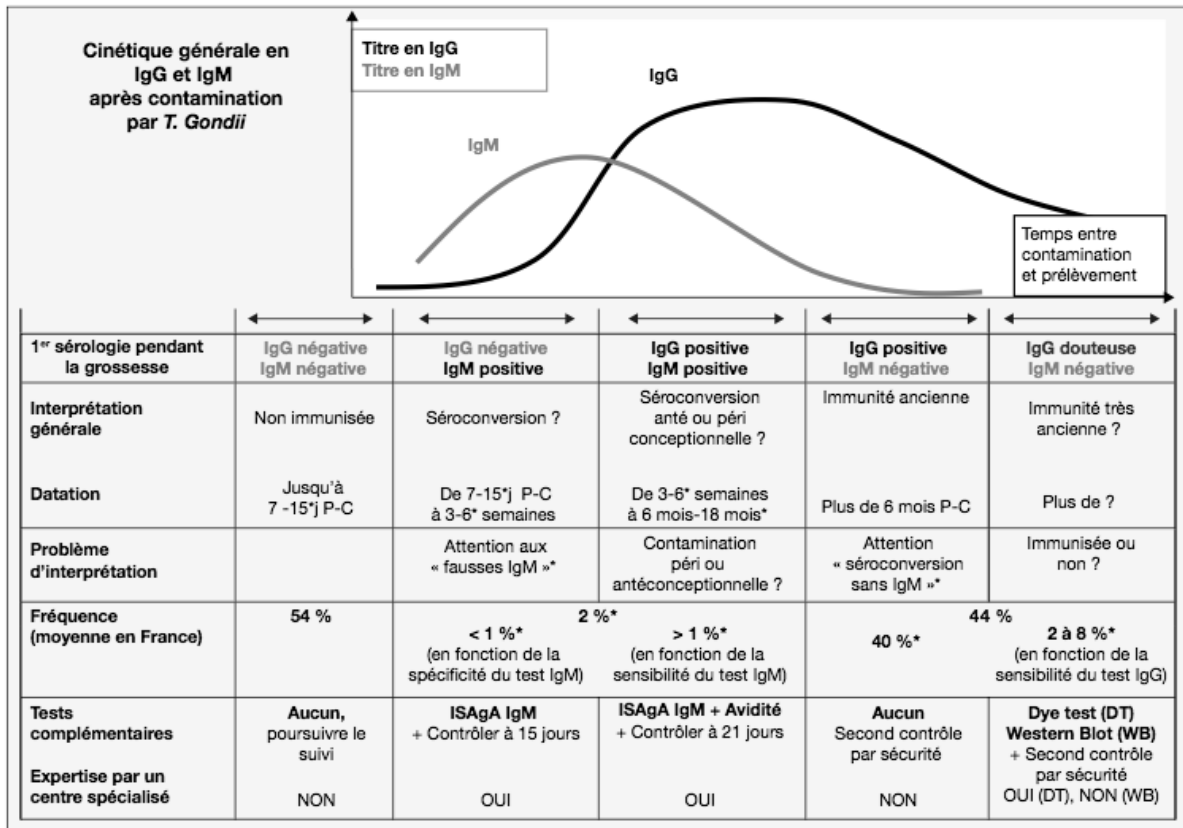


figure 21: Expertise d'une sérologie toxoplasmose effectuée en début de grossesse (1^{er} trimestre) en l'absence d'antécédent (37)

2.5. Coût du dépistage

D'après l'HAS, le coût du dépistage prénatal de la toxoplasmose s'élève à plus de 42 millions d'euros en 2007 avec un coût par femme enceinte infectée de 17555 euros et un coût par femme séronégative de 93,71 euros (33). En 2008, le coût du dépistage a été estimé à 43 millions d'euros, ce qui représente une augmentation de coût d'un million d'euros par an pour une augmentation du nombre de tests de 92000 unités/an (47).

Pour la HAS, même si le programme de dépistage n'a permis de diagnostiquer en 2007 que 272 cas de toxoplasmose congénitale sur les 800000 naissances, « il aura également permis de rassurer plus de 790000 femmes ». De plus, ces résultats sont à mettre en balance avec le coût de la prise en charge de la toxoplasmose congénitale.

A l'heure actuelle, une vraie réflexion médico-économique existe : doit-on abandonner le dépistage ? doit-on réviser la nomenclature ? doit-on trouver une nouvelle technique de dépistage moins onéreuse ? (47).

2.6. Prévention de l'infection toxoplasmique : prophylaxie

La circulaire ministérielle du 27 septembre 1983 recommande l'information des femmes enceintes non immunes sur les moyens de prévention contre la toxoplasmose. Aujourd'hui encore, les femmes enceintes ne connaissent pas toujours les modes de contamination dans la toxoplasmose (48).

Parmi les mesures préconisées par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (15) en 2005 et reprises dans le rapport de la HAS publié en octobre 2009 (33), on retrouve des mesures indispensables dont l'efficacité est prouvée :

❖ Bien cuire la viande (bœuf, mouton, porc, cheval) c'est-à-dire à une température d'au moins 65°C dans toute l'épaisseur de la viande (attention aux viandes cuites au barbecue, souvent crues à l'intérieur). Eviter la consommation de viande marinée, fumée ou grillée (ex : gibier). Les populations se nourrissant de viande crue ou saignante (France) ont des taux d'immunisation plus élevés que celles mangeant de la viande cuite (Angleterre, Allemagne).

❖ Lors de la préparation des repas : Laver soigneusement les ustensiles de cuisine ainsi que les plans de travail et surtout bien nettoyer les fruits et légumes consommés crus. Se laver les mains après contact avec des légumes, des fruits ou de la viande crue et avant de passer à table. Une bonne hygiène des mains et des ustensiles de cuisine est importante pendant la grossesse afin d'éviter la transmission de la toxoplasmose.

❖ Eviter les contacts directs avec les objets qui pourraient être contaminés par les excréments de chats comme les bacs de litière, la terre et porter des gants en cas de manipulation de ces objets.

Il n'a pas été prouvé de lien significatif entre le contact avec un chat domestique et la survenue d'une séroconversion.

❖ Éviter le contact direct avec la terre et porter des gants pour jardiner. Se laver les mains après les activités de jardinage, même si elles ont été protégées par des gants.

Les mesures complémentaires recommandées :

❖ congeler les denrées d'origine animale à des températures inférieures à -18°C (congélation pendant au moins 3 jours à -18°C)

❖ à titre de précaution, sont déconseillés les aliments suivants :

-lait de chèvre cru,

-viande marinée, saumurée ou fumée,

-huîtres, moules et autres mollusques consommés crus.

En l'absence de méthode normalisée développée pour la détection de *T. gondii* dans les denrées alimentaires ou l'environnement, il n'existe aucune surveillance réglementaire des aliments en France, en Europe ou aux Etats-Unis (49).

Un vaccin vivant a été développé pour les brebis car de nombreux cas d'avortements ou de morts fœtales étaient dénombrés entraînant des pertes économiques non négligeables pour les éleveurs. Ce vaccin leur confère une immunité protectrice de 18 mois. Mais ce vaccin vivant ne peut pas être utilisé chez l'homme et les essais réalisés à partir de préparations contenant des *T. gondii* morts ont été un échec.

La vaccination des chats contre la toxoplasmose a été également proposée mais s'est avérée être un échec à cause d'un coup de production trop important et d'une immunité protectrice courte.

3. LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE

3.1. Transmission materno-fœtale

L'infection du fœtus est la conséquence de plusieurs évènements : la primo-infection maternelle au cours de la grossesse avec une phase de parasitémie (précoce, transitoire, d'environ 10 à 15 jours) et le passage de tachyzoïtes dans le placenta, la colonisation du placenta puis leur passage vers la circulation fœtale .

Il faut également noter que des récurrences parasitémiques au cours de toxoplasmoses chroniques ont été observées chez des femmes immunocompétentes avec un risque de passage de tachyzoïtes dans le placenta en cas de grossesse suite à une réinfection par une souche différente (1). Certaines mères immunodéprimées ont présenté des réactivations de kystes quiescents également responsables de toxoplasmoses congénitales (50).

La contamination materno-fœtale est déterminée par le passage transplacentaire du parasite. Le placenta constitue une barrière au franchissement des tachyzoïtes et l'infection fœtale n'est pas obligatoire malgré la contamination maternelle ou la placentite. Le placenta retarde l'invasion fœtale par le parasite. Ce délai peut aller jusqu'à 3 mois au début de la grossesse mais la vascularisation du placenta augmentant au cours de la grossesse, le risque de passage du parasite du placenta vers la circulation fœtale devient plus grand et le délai de passage de plus en plus court.

Ainsi, dans le cas d'une infection maternelle proche de la conception, la transmission fœtale est faible, inférieure à 2% (36)(51) mais la gravité de l'atteinte est importante (avortement spontané, mort fœtale *in utero*). Lorsque l'infection a lieu au cours de la grossesse, la fréquence de transmission augmente avec l'âge gestationnel : 5 à 15% au premier trimestre, 30 à 40 % au second trimestre et 45 à 80% au troisième trimestre (figure 22).

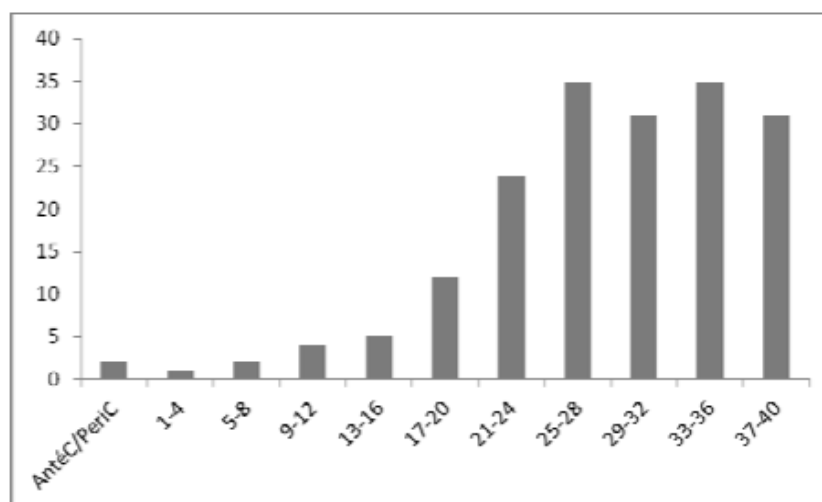


figure 22 : Distribution du nombre de cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France du 1er Janvier au 31 décembre 2012 selon le terme de la grossesse lors de l'infection maternelle en SA (n=204) (52)

A l'approche du terme, le placenta est plus volumineux et très vascularisé. Il est facilement colonisé par les parasites et la contamination fœtale est en général contemporaine de la contamination maternelle. Cependant, l'atteinte du fœtus est le plus souvent infra clinique car son système immunitaire mis en place à partir de la 10^{ème} semaine d'aménorrhée est efficace et sera secondairement renforcé par l'immunité passive de la mère. En effet, les IgG maternelles transmises sont des anticorps protecteurs, lytiques pour les parasites extracellulaires limitant ainsi leur dissémination. Cependant, ils n'agissent pas sur les formes intracellulaires. L'infection est alors ralentie, atténuée mais elle sera prolongée et laissera l'enfant porteur d'un grand nombre de kystes (36).

3.2. Epidémiologie

3.2.1. Mise en place d'un dispositif de surveillance en France

Afin d'estimer l'importance périnatale de la toxoplasmose congénitale et d'évaluer l'impact du programme de prévention instauré depuis 1978, le CNR de la toxoplasmose (créé en 2006) a mis en place en 2007, en collaboration avec l'InVS, un dispositif national de surveillance appelé « ToxoSurv », soit 48 laboratoires, basé sur une notification des cas de toxoplasmose congénitale (via le site Web du CNR) avec pour objectifs de :

- Constituer une base nationale afin d'estimer la prévalence de la toxoplasmose congénitale en France,
- Recenser au moins 80% des cas diagnostiqués en France,
- Estimer le nombre de toxoplasmoses cliniques sévères à la naissance ou au moment du diagnostic (lésions neurologiques et oculaires),
- Suivre les tendances de l'infection en pérennisant la notification des cas au cours du temps.

Le CNR de la Toxoplasmose en collaboration avec l'InVS a instauré un système national de surveillance basé sur une notification des cas de toxoplasmose congénitale (via le site Web du CNR). Celui-ci repose sur une collaboration de tous les acteurs du réseau « Toxosurv », soit 48 laboratoires, qui notifient les cas diagnostiqués depuis 2007. L'analyse des résultats permet de suivre les tendances de l'infection et notamment d'estimer la prévalence de la toxoplasmose congénitale en France. Cela permettra de contribuer dans les années à venir à la réévaluation de la politique de prévention instaurée en France depuis 1978 à la demande de l'HAS.

3.2.2. Prévalence et incidence

En 2012, ce système a permis de recenser 204 cas de toxoplasmose congénitale.

Le nombre de cas notifiés diminue avec le temps (figure 23)

Toxoplasmose congénitale					
cas 2007 272	cas 2008 268	cas 2009 266	cas 2010 244	cas 2011 186	cas 2012 204
Interruptions grossesse 11	Interruptions grossesse 16	Interruptions grossesse 23	Interruptions grossesse 12	Interruptions grossesse 5	Interruptions grossesse 12
Issues inconnues 27 (1 avec ano echo)	Issues inconnues 19 (1 avec ano echo)	Issues inconnues 15 (2 avec ano echo)	Issues inconnues 25 (3 avec ano echo dont 1 microcéphalie)	Issues inconnues 8 (0 avec ano echo)	Issues inconnues 16 (3 avec ano echo)
Naissances 234 (208 asymptomatiques)	Naissances 233 (206 asymptomatiques)	Naissances 228 (203 asymptomatiques)	Naissances 207 (189 asymptomatiques)	Naissances 173 (147 asymptomatiques)	Naissances 176 (161 asymptomatiques)

figure 23 : Cas de toxoplasmose congénitale notifié par année (2007-2012) par le réseau de surveillance « Toxosurv » (53)

La prévalence globale de la toxoplasmose congénitale a été estimée en 2007 entre 2,7 et 3,2 cas pour 10000 naissances vivantes (54). Elle diminue tous les ans, en 2012, elle a été estimée à 2,6 pour 10000 naissances (1).

La répartition du nombre de cas varie selon la région géographique (Figure 24).

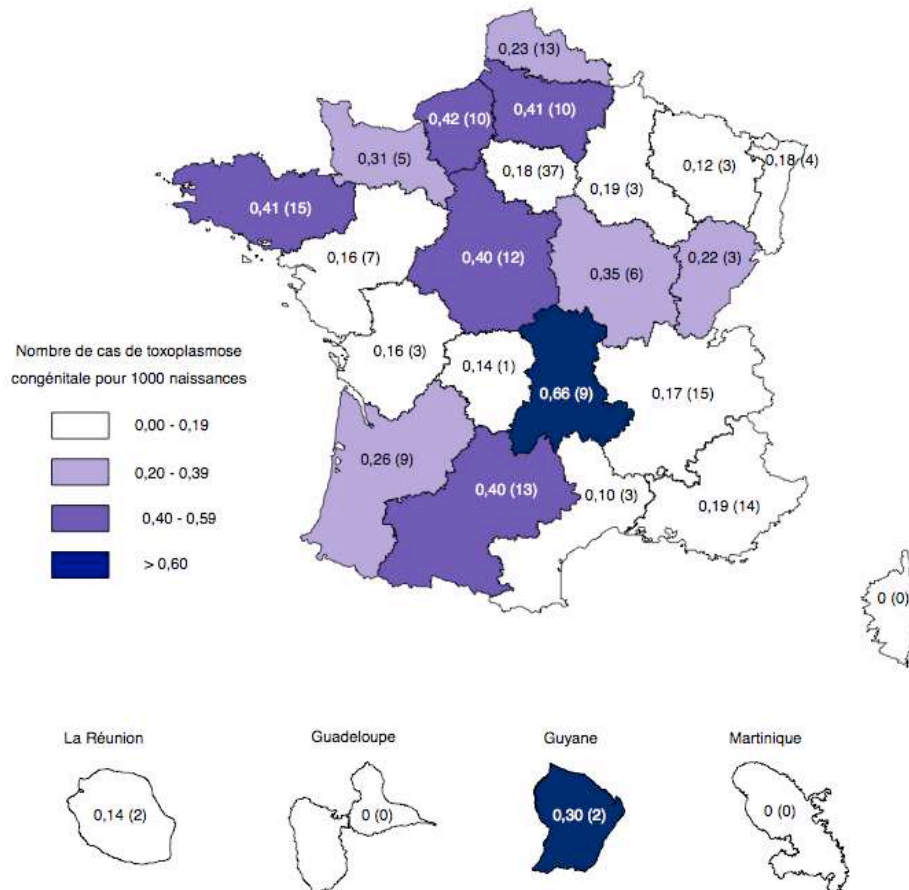


figure 24 : Distribution régionale du nombre de cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France pour l'année 2012 (52)

En 1995, une enquête nationale périnatale avait permis d'estimer l'incidence de la toxoplasmose congénitale entre 2,4 et 6,6 pour 1000 naissances en France (48). En 2007, elle a été évaluée à 0,34 pour 1000 naissances vivantes (54).

L'incidence annuelle globale de la toxoplasmose congénitale dans le monde a été estimée à 190100 cas (IC de 95% : 179300-206300). Des taux élevés d'incidence sont observés en Amérique du Sud et dans certains pays du Moyen-Orient et à faibles revenus (55).

La figure 25 rapporte le nombre de cas de toxoplasmoses congénitales diagnostiqués en fonction de l'âge des femmes et montre qu'il est plus important chez les femmes jeunes.

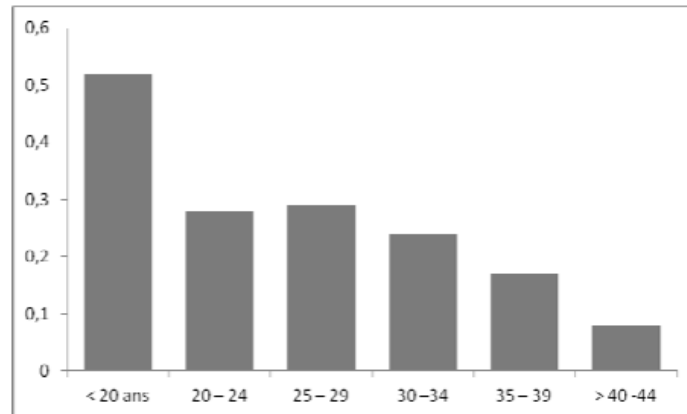


figure 25 : Nombre de cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France pour 1000 naissances selon l'âge des femmes en 2012 (52)

3.3. Aspects cliniques de la toxoplasmose congénitale

L'infection fœtale peut provoquer une interruption spontanée de la grossesse, une mort *in utero*, une forme clinique ou être asymptomatique (forme infra clinique).

Il est classique de décrire trois stades :

3.3.1. Premier stade

Si l'infection est tardive, survenant dans le dernier trimestre de la grossesse, le nouveau-né présente à la naissance une toxoplasmose à la phase primaire. À ce stade, les formes inapparentes sont les plus fréquentes. S'il y a une traduction clinique, un ictère néonatal accompagné d'hépatomégalie et même de splénomégalie peut être observé. Des lésions cardiaques (myocardites) peuvent être associées ainsi que des manifestations cutanées variées et non spécifiques. La chorioretinite est le plus souvent la seule manifestation clinique.

3.3.2. Deuxième stade

Si la mère a été contaminée au cours du deuxième trimestre de la grossesse, le tableau à la naissance peut être celui d'une encéphalite. La toxoplasmose congénitale est à la phase secondaire de la maladie. Le liquide céphalorachidien est anormal

(hyperalbuminorachie). Le diagnostic peut être étayé par l'existence au fond de l'œil de plages de chorioretinite évolutive. Si l'évolution n'est pas fatale, l'enfant est exposé à des lésions nerveuses irréductibles. Les formes infracliniques ou bénignes sont fréquentes.

3.3.3. Troisième stade

Lorsque la mère a été contaminée pendant les premiers mois de la gestation, la totalité de la maladie s'est développée in utero. Les formes les plus graves sont observées dans ce cas-là mais l'importance des séquelles est variable. Elles sont parfois considérables et réalisent le tableau clinique classique de la toxoplasmose congénitale associant hydrocéphalie ou microcéphalie, crises convulsives, retard psychomoteur et chorioretinite. Leur pronostic est redoutable.

D'autres manifestations neurologiques peuvent être observées : des troubles du tonus à type d'hypotonie généralisée ou au contraire localisée à la nuque, des paralysies plus rares, sous forme de monoplégie, d'hémiplégie ou de paraplégie.

Les lésions oculaires ont une existence parfois d'emblée évidente : microphthalmie, unie ou bilatérale, strabisme, le plus souvent convergent, nystagmus. La chorioretinite reste l'atteinte oculaire la plus fréquente.

3.3.4. Lésions chorioretiniennes

La rétine, siège de nécrose importante, est le lieu de prédilection des lésions toxoplasmiques, dans la région maculaire ou à la périphérie. La choroïde est le siège de lésions inflammatoires non spécifiques. Elles sont unilatérales ou bilatérales et plusieurs foyers rétinochoroïdiens peuvent coexister au niveau de l'œil. La chorioretinite est la forme clinique la plus fréquente.

La lésion récente est faite d'une zone d'œdème chorioretinien (figure 27) ; la lésion ancienne est en fait beaucoup plus caractéristique (56). Celle-ci est représentée par un placard blanchâtre centré par une zone grise surélevée qui est limitée par des bords festonnés mais taillés à l'emporte-pièce. À leur niveau, il existe une accumulation pigmentaire. Cet aspect de la chorioretinite pigmentaire est extrêmement évocateur de la toxoplasmose congénitale (figure 26).

Les foyers maculaires ou papillaires sont à l'origine d'une baisse d'acuité visuelle avec des conséquences fonctionnelles non négligeables : 23% d'amblyopie sévère pour un œil

atteint (57). La chorioretinite peut être d'évolution tardive plusieurs années après la naissance, due à la réactivation de kystes intra-rétiens.

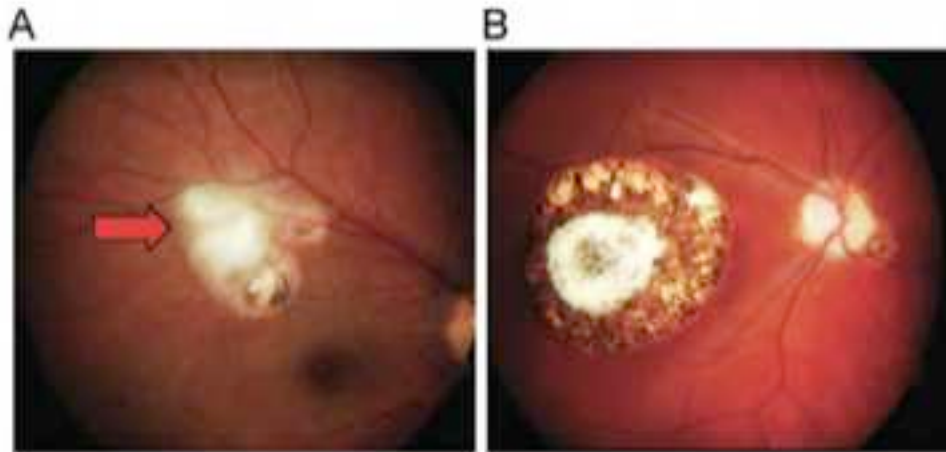


figure 26 : Lésions de chorioretinite chez deux patients atteints de toxoplasmose congénitale . A, inflammation active (flèche rouge) associée à des lésions anciennes pigmentées (cicatrices) ; B, cicatrice de chorioretinite (58)

3.3.5. Lésions neurologiques

Des calcifications intracrâniennes unies ou bilatérales, le plus souvent multiples sont fréquemment observées. Elles correspondent à des foyers de nécrose qui se calcifient secondairement. Elles peuvent siéger dans n'importe quelle région de l'encéphale, mais principalement dans les régions périventriculaires et au niveau des noyaux gris centraux. Elles se présentent radiologiquement sous 3 aspects : en coups d'angle de plusieurs millimètres de long au niveau des noyaux gris centraux et du thalamus, nettement curvilignes, en traînées continues ou discontinues dans les régions périventriculaires, nodulaires, en tête d'épingle, isolées ou groupées, en amas, dans l'ensemble de l'encéphale. Elles ont tendance à se densifier. Les crises convulsives constituent souvent le signe révélateur.

L'hydrocéphalie et la microcéphalie sont des signes cliniques rencontrés lorsque la contamination a eu lieu au cours du premier trimestre de grossesse. L'hydrocéphalie liée à l'obstruction de l'aqueduc de Sylvius est actuellement dépistée pendant la grossesse par l'échographie. Une dilatation ventriculaire, bilatérale et symétrique en est le signe. Le périmètre crânien est augmenté, les fontanelles tendues. La microcéphalie liée à l'absence de développement cérébral est d'observation plus rare.

3.3.6. Les tableaux cliniques

Il existe une classification des signes cliniques selon 4 types d'atteintes différentes (33) :

- *la toxoplasmose congénitale infra clinique*, la plus fréquemment rencontrée. En effet, on ne dénote aucun signe clinique chez 80% des enfants atteints à la naissance. Le diagnostic est alors strictement biologique. Cependant, le potentiel évolutif de cette forme est incertain avec un risque de lésion oculaire survenant ou récidivant pendant l'enfance, l'adolescence voire à l'âge adulte. En effet, plus de 40% des enfants non traités présenteront une chorioretinite avec diminution permanente de l'acuité visuelle.
- *La toxoplasmose congénitale modérée* : elle se traduit par une atteinte oculaire périphérique sans diminution de l'acuité visuelle avec association éventuelle à des calcifications intracrâniennes sans expression clinique.
- *La toxoplasmose congénitale sévère* : elle associe une atteinte oculaire avec baisse d'acuité visuelle, une hydrocéphalie d'intensité variable, plus rarement une microcéphalie avec calcifications intracrâniennes et une déficience intellectuelle plus ou moins sévère.
- *La toxoplasmose congénitale disséminée* : rarement observée, elle associe une atteinte multiviscérale et des lésions cutanées (exanthème maculopapuleux, purpura), un ictère avec hépatomégalie.

En 2012, sur les 176 enfants atteints de toxoplasmose congénitale, 8 ont présenté une atteinte modérée et 7 ont développé une forme sévère. Les anomalies viscérales retrouvées sont décrites dans la figure 27.

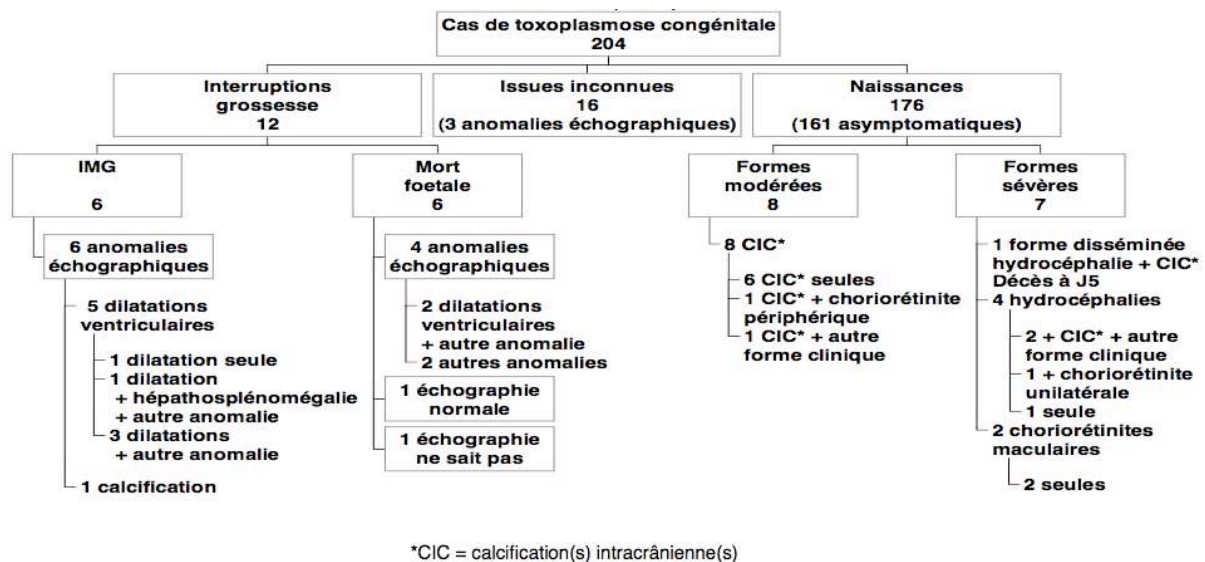


figure 27 : Cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en 2012 en France (52)

3.4. Définition d'un cas de toxoplasmose congénitale en France

Selon le CNR et l'InVS, les cas de toxoplasmoses congénitales sont issus de la population :

- Des fœtus vivants, en cours de développement,
- Des produits d'avortements (fausse couche ou IMG/IVG),
- Des nouveau-nés,
- Des nourrissons jusqu'à 12 mois.

dont la mère a présenté une infection toxoplasmique en cours de grossesse ou dans les semaines précédant la grossesse.

Un cas de toxoplasmose congénitale est défini comme un sujet (53) :

- ✓ faisant partie de la population ciblée,
- ✓ dont l'infection a été détectée en France (y compris les DOM)
- ✓ dont le diagnostic d'infection toxoplasmique a été confirmé :

♦ Détection de *T. gondii* dans les tissus (placenta, produits d'expulsion) ou un liquide biologique (liquide amniotique, LCR, sang du cordon ou du nouveau-né ou liquide d'ascite) par PCR, inoculation à la souris, culture cellulaire ou microscopie avec immunocytochimie

et/ou

- ♦ Réponse immunitaire spécifique contre la toxoplasmose :
 - présence d'anticorps spécifiques IgM ou IgA pendant la première semaine de vie,

- ou présence d'anticorps néosynthétisés de la classe des IgG, IgM ou d'IgA,
- ou augmentation des anticorps IgG spécifiques sur des prélèvements successifs au delà du premier mois de vie,
- ou persistance des anticorps IgG spécifiques à l'âge de 12 mois.

3.5. Diagnostic de la toxoplasmose congénitale

3.5.1. Diagnostic prénatal

Si l'infection maternelle est avérée pendant la grossesse, le diagnostic prénatal associe un dépistage échographique et biologique. Il a pour intérêt de dépister l'infection fœtale, d'éviter les avortements injustifiés et de traiter le fœtus *in utero*.

3.5.1.1. Diagnostic prénatal échographique

La surveillance échographique est mensuelle. Si la transmission de l'infection est démontrée par l'amniocentèse, les échographies sont rapprochées (tous les 15 jours) afin de déceler des signes sévères de foetopathie. L'IRM fœtale peut aider à mieux évaluer l'atteinte cérébrale. Aucun examen prénatal ne permet de diagnostiquer une atteinte oculaire mais le risque de chorioretinite paraît plus élevé en cas de lésion cérébrale (59).

On peut observer à l'échographie des signes en faveur d'une infection fœtale tels que des images placentaires de placentite (hyperéchogénicité et augmentation d'épaisseur), une dilatation ventriculaire (figure 28), une hydrocéphalie, des calcifications intracrâniennes ou périhépatiques, une hépatomégalie, un épanchement péritonéal, péricardique ou pleural ou un retard de croissance intra-utérin (60).

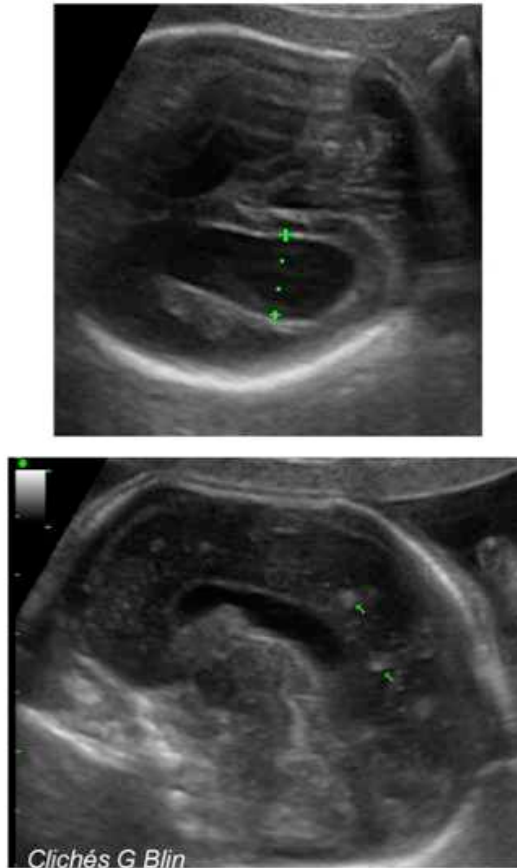


figure 28 : Toxoplasmose fœtale après séroconversion à 20 SA : présence à 28 SA d'une dilatation ventriculaire avec des nodules intracérébraux (61)

L'hydrocéphalie représente 78% des anomalies échographiques (62). L'hépatomégalie isolée est sans traduction clinique chez les enfants. L'interruption médicale de grossesse n'est proposée qu'en cas d'infection fœtale certaine associée à des anomalies échographiques sévères cérébrales et/ou viscérales.

L'échographie est un examen fiable et le seul capable de donner une notion de gravité. Sa normalité ne signe pas l'intégrité fœtale (elle ne dépiste pas les atteintes oculaires) et ne permet pas d'exclure le diagnostic.

En 2012, sur les 204 cas déclarés de toxoplasmose congénitale, 12 cas (dont les anomalies échographiques sont décrites dans la figure 29) ont donné lieu à une interruption de grossesse.

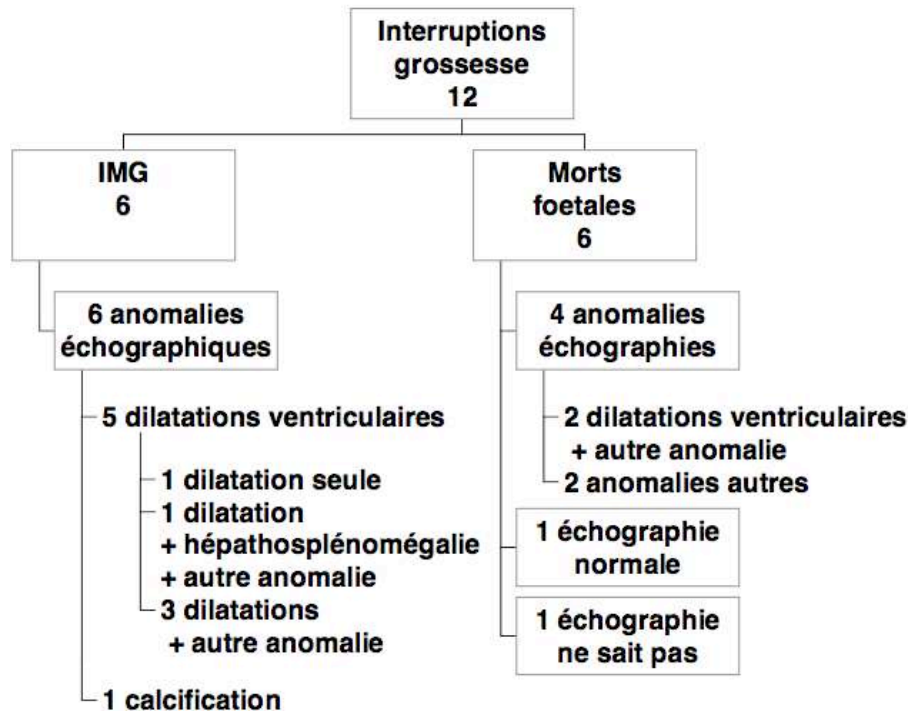


figure 29 : Anomalies échographiques observées dans les 12 interruptions de grossesse survenues dans les cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France en 2012 (52)

3.5.1.2. *Diagnostic prénatal (DPN) biologique*

Le DPN est réalisé par la recherche directe du parasite dans le liquide amniotique recueilli par amniocentèse. Seul un laboratoire autorisé par l'Agence Régionale de Santé peut pratiquer le DPN de la toxoplasmose. Le DPN est remboursé par la Sécurité Sociale et sa réalisation nécessite le consentement écrit de la patiente et une attestation d'information de cette dernière sur la procédure par le prescripteur.

➤ Indications et modalités du DPN

Il est licite de proposer un diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale après avoir comparé le risque de perte fœtale liée à l'amniocentèse au risque de survenue d'une toxoplasmose cérébrale.

Un intervalle minimum de 4 semaines devra être respecté après la date estimée de l'infection toxoplasmique maternelle. Ces 4 semaines correspondent au délai minimum théorique de transmission du parasite de la mère au fœtus.

L'HAS recommande de prélever le liquide amniotique à partir de la 18^{ème} semaine d'aménorrhée.

Il existe différents cas de figures :

1) **infection péri-conceptionnelle prouvée ou supposée**

Cette période va de 2 mois avant la conception et jusqu'à la 6^{ème} SA.

La position des gynécologues est variable ; certains réalisent l'amniocentèse alors que d'autres ne la propose pas. Tous préconisent un suivi échographique mensuel ainsi qu'un dépistage néonatal et le traitement par la spiramycine est poursuivi sans interruption jusqu'à la fin de la grossesse.

2) **infection survenant après la 6^{ème} SA et jusqu'à la 36^{ème} SA**

L'amniocentèse est toujours proposée à la patiente, le risque lié au geste est faible et inférieur au risque de survenue d'une toxoplasmose congénitale. Les principales complications sont : la fausse couche, l'infection du liquide amniotique, la prématurité. Le risque global de perte fœtale est évalué à 0,5% (63).

3) **Infection tardive après la 36^{ème} SA**

Il faut discuter la réalisation de l'amniocentèse ainsi que la mise en place d'un traitement curatif par l'association pyriméthamine et sulfamide, ou le déclenchement de l'accouchement.

La recherche directe du parasite dans le liquide amniotique peut être réalisé par 2 techniques :

❖ L' inoculation à la souris

Cette technique fut la première à être mise en œuvre et reste la technique de référence pour isoler les souches de toxoplasmes viables pour les études de virulence et de typage moléculaire.

L'inoculation à l'animal est réalisée par voie intrapéritonéale. Une sérologie toxoplasmique est effectuée 4 à 6 semaines après l'inoculation sur le sang recueilli par voie caudale. En cas de positivité, une recherche de kystes dans le cerveau, après sacrifice de la souris, est réalisée pour confirmer l'infection fœtale.

La sensibilité de cette technique de l'ordre de 60% est moins bonne que celle de la PCR en temps réel. Sa spécificité est de 100% (64).

L'inconvénient principal de cette technique réside dans le délai de réponse, en moyenne de 5 semaines, qui ne pourrait être réduit qu'au prix d'une perte de sensibilité importante.

De plus, il faut disposer d'une animalerie de type A2 conventionnée.

❖ détection d'ADN toxoplasmique par PCR

Pour le diagnostic moléculaire, il est conseillé d'effectuer la recherche d'ADN toxoplasmique sur 10 à 20 mL de liquide amniotique. Le volume minimum requis est de 4 mL avec un risque de réduction de la sensibilité de l'examen.

La sensibilité de la PCR varie de 65 à 90% selon la cible utilisée mais sa spécificité est de 100%. Il existe un risque de faux négatifs en cas de passage placentaire tardif en fin de grossesse ou lorsque la charge parasitaire est faible.

La technique de PCR sera détaillée dans la deuxième partie de ce travail de thèse.

L'association de la PCR et de l'inoculation à la souris permet d'augmenter la sensibilité du DPN avec une sensibilité cumulée supérieure à 80%. Cependant, il persiste toujours le risque de faux négatifs qui justifie la surveillance du fœtus jusqu'à la naissance et de l'enfant pendant sa première année de vie (65).

La figure 30 résume la démarche diagnostique dans le cadre du DPN de la toxoplasmose congénitale.

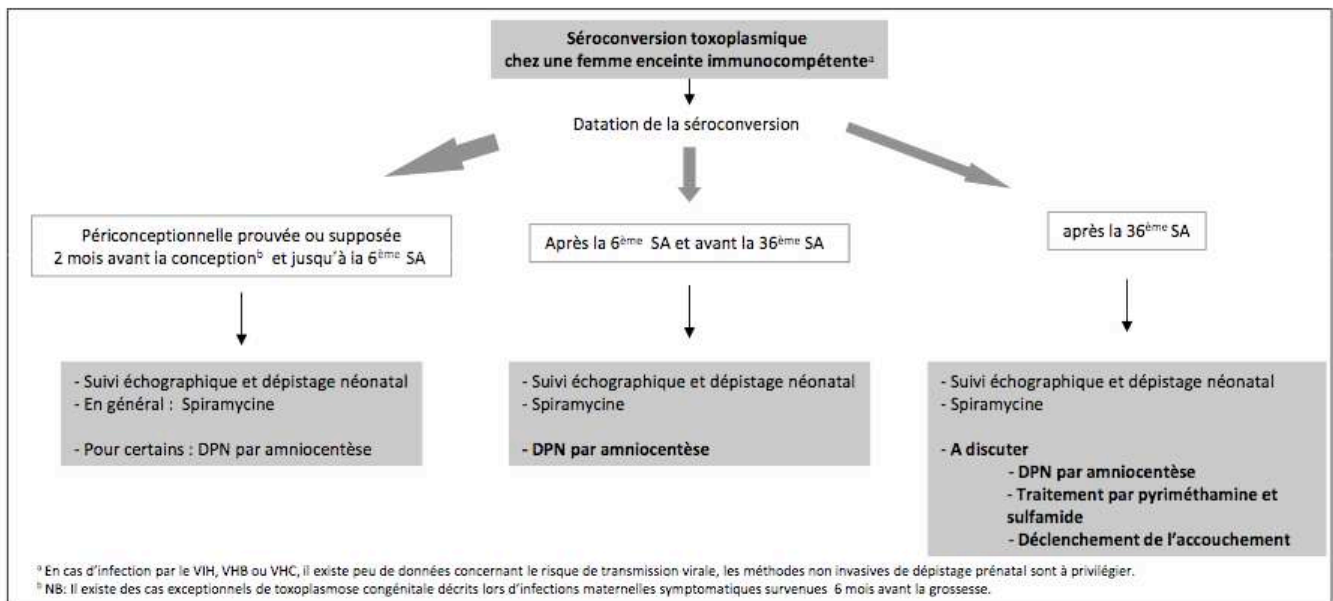


figure 30 : logigramme pour le DPN de la toxoplasmose congénitale (66)

➤ **Interprétation des résultats du DPN et conduite à tenir**

DPN POSITIF

Il signe une toxoplasmose congénitale et implique la mise en route d'un traitement qui, bien que partiellement curatif, pourrait limiter les séquelles fœtales (67). Ce traitement repose sur l'association de pyriméthamine et d'un sulfamide (sulfadiazine ou sulfadoxine) avec une prescription d'acide folinique pour limiter les effets secondaires hématologiques. Le traitement curatif doit être débuté le plus précocement possible afin de diminuer le risque de séquelles sévères la 1^{ère} année de vie.

En cas de signes échographiques anormaux, une interruption médicale de grossesse est proposée à la femme enceinte.

DPN NEGATIF

Il y a une forte probabilité d'absence d'infection fœtale au moment du prélèvement. Toutefois, un DPN négatif n'exclut pas la possibilité d'une toxoplasmose congénitale puisque 10 à 15% des diagnostics prénataux sont faussement négatifs. C'est la raison pour laquelle il est indiqué à l'heure actuelle de poursuivre le traitement préventif de la

mère par la spiramycine jusqu'à l'accouchement associé à une surveillance échographique spécialisée mensuelle.

Une mention dans le compte-rendu du résultat du DPN indiquant que « le résultat négatif du DPN n'exclut pas une transmission au fœtus et donc une possible toxoplasmose congénitale » est recommandée.

Quel que soit le résultat du DPN, il est également important d'informer la mère que l'enfant devra faire l'objet d'un bilan biologique et clinique néo-natal spécifique et devra être suivi cliniquement et biologiquement jusqu'à l'obtention formelle de la preuve qu'il a ou n'a pas été infecté.

3.5.2. Diagnostic néonatal (DNN)

3.5.2.1. Indication du DNN

Il doit être réalisé systématiquement chez tout nouveau-né dont la mère a été infectée au cours de la grossesse ou en période péri-conceptionnelle. L'intérêt est de détecter des faux négatifs du diagnostic anténatal, les cas de transmission tardive du toxoplasme de la mère au fœtus ou de diagnostiquer l'infection si le DPN n'a pas été fait.

3.5.2.2. Modalités du DNN

Le bilan néonatal comprend 3 éléments fondamentaux :

- ✓ un examen clinique à la recherche d'une hépatosplénomégalie, de troubles neurologiques, d'une macrocéphalie (68),
- ✓ une échographie transfontanellaire pour rechercher une hydrocéphalie, des calcifications intracrâniennes (68),
- ✓ un fond d'œil afin d'objectiver une chorioretinite.

Le diagnostic parasitologique repose sur la recherche du parasite dans le sang de cordon et/ou le placenta par PCR et éventuellement par inoculation à la souris.

Il est associé à un diagnostic sérologique sur le sang de cordon, avec la détection des anticorps IgA, IgM et IgG spécifiques. Seuls les tests par immunocapture des IgM et/ou des IgA (ISAGA, ELISA reverse) plus sensibles (69) et validés pour ce diagnostic doivent être pratiqués. La présence d'IgM, et/ou d'IgA doit être impérativement confirmée dans

le sang du nouveau-né prélevé à partir du 10^{ème} jour de vie, des anticorps maternels ayant pu être transmis accidentellement par effraction placentaire au moment de l'accouchement .

Les IgM sont plus fréquemment présentes à la naissance en cas d'infection maternelle au cours du troisième trimestre de grossesse et les IgA en cas d'infection au 1^{er} et 2^{ème} trimestre(70)

Certains nouveau-nés synthétisent déjà des IgG spécifiques dès la naissance, qui se superposent aux IgG maternelles transmises. Des techniques analytiques qualitatives complémentaires, comme le western blot, permettent de mettre en évidence la synthèse d'IgG et d'IgM par l'enfant. En effet, l'étude des profils immunologiques comparés mère-enfant permet de différencier les anticorps maternels transmis des anticorps néo-synthétisés par le nouveau-né. Leur mise en évidence confirme la contamination.

Après migration électrophorétique des protéines antigéniques de toxoplasme entier qui permet leur séparation sous forme de bandes et transfert sur nitrocellulose, les bandelettes sont incubées avec les sérums à étudier (sérum maternel, sang de cordon voire sérum du nouveau né). Les anticorps fixés sont alors révélés par des anti-IgG ou anti-IgM marqués par une enzyme. En comparant, les différentes bandes antigènes-anticorps obtenues, la mise en évidence de nouvelles bandes antigènes-anticorps chez le nouveau-né, confirme le diagnostic de toxoplasmose congénitale (figure 31).

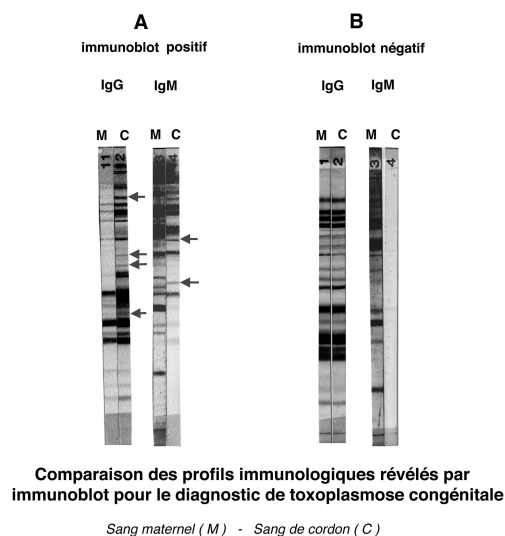


figure 31 : Comparaison des profils immunologiques par western blot sur sang maternel et sang de cordon

La détection précoce des IgG néosynthétisées par le fœtus infecté améliore la sensibilité du diagnostic néonatal en particulier en cas de négativité des IgM et/ou IgA spécifiques (71).

3.5.2.3. Interprétation des résultats du DNN biologique

La présence du parasite à la naissance dans le sang de cordon affirme le diagnostic de toxoplasmose congénitale alors que sa découverte dans le placenta ne signifie pas pour autant que l'enfant soit atteint de toxoplasmose congénitale. Des cas de placentite isolée sans transmission du parasite au fœtus ont été documentés (72) (73) (74).

La sensibilité de détection du toxoplasme dans le placenta (PCR, inoculation à la souris) est de l'ordre de 60% (75), avec une sensibilité supérieure de l'inoculation à la souris. Elle dépend de la date d'infection maternelle, augmentant avec le terme de la grossesse, ce qui peut être en lien avec une plus courte exposition du parasite au traitement antiparasitaire de la femme enceinte. L'intérêt d'analyser le placenta est surtout important en cas d'absence de DPN (1).

La présence d'anticorps IgM, IgA et/ou IgG néosynthétisés dans le sérum du nouveau-né est la preuve absolue de l'atteinte congénitale.

La sensibilité de la détection des IgM et/ou des IgA varie de 50 à 65 % selon les auteurs. La recherche couplée des IgM et des IgA augmente les performances avec une sensibilité supérieure à 70 % (75)(69). L'absence de détection de ces 2 isotypes n'exclut pas l'atteinte fœtale. Elle peut correspondre à une contamination maternelle en début de grossesse (Les IgM et Les IgA synthétisées très tôt *in utero* ne sont plus détectables) ou à une contamination du fœtus au dernier mois de grossesse (Les IgM et les IgA ne sont pas encore synthétisées).

Par ailleurs, la sensibilité de la détection des IgM à la naissance semble être liée au type de traitement maternel (sensibilité 43% spiramycine vs 75% association pyriméthamine/sulfamide) (72).

3.5.3. Diagnostic post-natal

Il s'impose si les diagnostics anténatal et néonatal sont négatifs ou n'ont pas été effectués. Il permet de confirmer une infection congénitale ou de l'exclure.

Le diagnostic postnatal est basé sur le dosage sérique des anticorps spécifiques IgG, IgM et IgA tous les mois pendant 3 mois puis tous les 2 à 3 mois pendant un an.

La détection des IgG se fait par le test de lyse, l'Immunofluorescence indirecte ou l'EIA. En l'absence d'infection, les anticorps IgG transmis passivement par la mère s'élimineront dans un délai plus ou moins long (5 à 8 mois en général) qui est fonction du taux initial des anticorps maternels transmis. La surveillance sérologique sera poursuivie jusqu'à la négativation sérologique complète, confirmée sur au moins 2 sérums à plusieurs mois d'intervalle.

Seule une sérologie négative avant l'âge d'un an, en l'absence de traitement, élimine le diagnostic de toxoplasmose congénitale.

Inversement, une augmentation ou une persistance des IgG spécifiques au cours de la première année de vie permet d'affirmer ou de confirmer l'infection congénitale.

Grâce à l'association du diagnostic prénatal et néonatal, environ 90% des toxoplasmoses congénitales sont diagnostiquées avant la fin du 1^{er} mois de vie, 95% avant la fin du 3^{ème} mois (71) et 5 % plus tardivement lors de la surveillance sérologique au cours de la première année de vie.

A l'heure actuelle, la proportion des toxoplasmoses congénitales diagnostiquées en période anténatale et postnatale est équivalente (figure 32).

<u>Effectif</u>	
Diagnostic en période anténatale	97
Diagnostic en période postnatale	107
Total	204

figure 32 : Effectif des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France en 2012 (52)

3.6. Pronostic

3.6.1. *Le devenir de la grossesse*

Entre 2007 et 2012, les données du réseau Toxosurv révèlent un taux de létalité annuel allant de 2,7 à 9,4% chez les fœtus atteints de toxoplasmose congénitale (tableau 3). Il englobe les IVG/IMG, les MFIU et les décès postnataux (1).

Tableau 3 : Létalité liée à la toxoplasmose congénitale (TC) (1)

Année	Nombre de TC	Létalité totale	Proportion pour 100 cas de TC
2007	272	11	4%
2008	268	16	5,9%
2009	266	25	9,4%
2010	244	12	4,9%
2011	186	5	2,7%
2012	204	13	6,4%

3.6.2. *Morbidité à la naissance*

Entre 2007 et 2012, les données du réseau Toxosurv rapportent de 8,5 à 15% de cas de toxoplasmose congénitale symptomatiques à la naissance dont 2,4 à 5,2% de formes sévères (tableau 4) (1).

Tableau 4 : Morbidité liée à la toxoplasmose congénitale (TC) (1)

Année	Nombre de TC à la naissance	Nombre de TC symptomatiques à la naissance (proportion pour 100 cas de TC à la naissance)	Nombre de TC symptomatiques avec formes sévères à la naissance (proportion pour 100 cas de TC à la naissance)
2007	234	27 (11,5%)	8 (3,4%)
2008	233	28 (11,6%)	8 (3,4%)
2009	228	25 (11%)	8 (3,5%)
2010	207	18 (8,7%)	5 (2,4%)
2011	173	26 (15%)	9 (5,2%)
2012	176	15 (8,5%)	7 (4%)

3.6.3. Le pronostic visuel

Le pronostic de la maladie est lié au risque de survenue ultérieure de poussées de chorioretinite susceptibles de récidiver et de perturber les performances cognitives. Les atteintes ophtalmologiques sont donc au premier plan des conséquences de cette affection et surviennent quelle que soit la date de l'infection maternelle sans que l'on puisse définir un risque individuel (76).

Chez l'enfant atteint de toxoplasmose congénitale et non traité, l'incidence à long terme de la chorioretinite a été évaluée à 80-90% avec un taux de cécité uni ou bilatérale de 20 à 50 %. Malgré un traitement précoce *in utero* ou dès la naissance du nouveau-né, des chorioretinites sont encore observées mais avec une fréquence moindre.

Les résultats obtenus dans les cohortes d'enfants traités dépendent de la durée du suivi et des traitements instaurés en période anténatale et postnatale. Deux études ont montré que 24% des enfants traités avaient au mois une lésion rétinienne (36) (77).

De même, dans l'étude européenne EMSCOT publiée en 2007, sur une durée de suivi moyenne de 5 ans, 20% des enfants traités avaient au moins une lésion oculaire (78).

Les études de Phan et al. (79) et de kodjikian et al.(80) montrent que sur un suivi de plus de 10 ans, 30% des enfants traités avaient au moins une lésion chorioretinienne.

Il semble néanmoins se dégager de ces études qu'environ 5 % des enfants ont une chorioretinite à la naissance, 20 % à 5 ans et 30% à 8 ans, quelle que soit la durée du traitement utilisé.

Les pics d'apparition de chorioretinite se situent d'une part entre la naissance et l'âge d'un an et, d'autre part entre 7 et 8 ans. La quasi totalité des atteintes visuelles sont observées avant l'âge de 10 ans (81).

Une surveillance régulière est donc nécessaire, reposant sur le fond d'œil dès le premier mois de vie, puis tous les trois mois jusqu'à un an, tous les six mois jusqu'à deux ans et une fois par an jusqu'à la puberté. Il est également important d'éduquer les parents sur les signes fonctionnels d'alarmes.

Si les lésions périphériques n'ont pas de conséquence fonctionnelle, les atteintes maculaires provoquent une diminution de l'acuité visuelle avec troubles de l'apprentissage lors d'atteinte bilatérale (82). Le pronostic visuel des chorioretinites est bon dans la plupart des études lorsque les enfants sont traités (81) (83).

Les facteurs de risque de développement d'une chorioretinite (77) sont la précocité de l'infection maternelle, la présence de manifestations cliniques non oculaires à la naissance, le retard au diagnostic de la toxoplasmose congénitale et la prématurité (< 32 SA).

Enfin, une étude récente a montré un lien entre le risque d'apparition de lésions rétiniennes et la présence d'ADN de *T. gondii* dans le sang du nouveau-né : 68% des enfants ayant une chorioretinite avaient une PCR positive pour *T. gondii* (84).

3.6.4. Le pronostic neurologique

L'évolution cognitive et le développement scolaire des enfants atteints de toxoplasmose congénitale traités sont favorables (81)(85)(86). Les facteurs de mauvais pronostic sont une contamination maternelle précoce (77)(86) l'absence de prise en charge anténatale (85), la présence d'une chorioretinite et l'existence de signes cliniques à la naissance (87).

3.7. Traitement

3.7.1. *Principaux médicaments antiparasitaires utilisés*

Peu de médicaments sont disponibles pour le traitement de la toxoplasmose. Ils sont actifs sur les tachyzoïtes et sans effet sur les kystes.

Les molécules sont regroupées en deux grandes familles :

❖ les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique :

L'inhibition des 2 enzymes impliquées dans la synthèse des folates provoque chez le parasite un blocage de la synthèse de l'acide folique. Il en résulte une carence en folates responsable secondairement d'altérations de la synthèse des bases puriques et de troubles de la division cellulaire.

-les inhibiteurs de la déhydrofolate réductase (DHFR) = pyriméthamine (Malocide®)

La pyriméthamine est un anti-métabolite qui inhibe la transformation de l'acide folique en acide folinique par inhibition de la dihydrofolate réductase. Cette action se répercute sur les lignées cellulaires sanguines et nécessite l'adjonction d'un traitement par l'acide folinique.

-les inhibiteurs de la déhydroptéroate synthétase (DHFS) = sulfamides

- sulfadiazine (Adiazine®) : action rapide nécessitant plusieurs prises quotidiennes, la plus active et la plus utilisée.
- cotrimoxazole (Bactrim®) : sulfamide semi-retard permettant l'espacement des prises
- sulfadoxine (Fansidar®)

-les associations

Parmi les associations les plus actives figurent :

- ✓ Pyriméthamine + sulfadiazine

C'est l'association la plus active contre le toxoplasme et la plus utilisée. Elle augmente de 6 fois l'efficacité de la pyriméthamine et possède une bonne tolérance.

- ✓ Pyriméthamine + sulfadoxine

Cette association est une alternative possible, présentant un intérêt dans les traitements au long cours ;

Ces associations permettent de diminuer les doses de chaque molécule et d'en réduire ainsi la toxicité.

❖ les macrolides : Spiramycine (Rovamycine®)

Les macrolides sont des antibiotiques avec un effet parasitostatique. La spiramycine utilisée depuis plus de 30 ans relève d'un mode d'action imprécis évoquant une action sur les ribosomes (50). Son effet parasitostatique ne s'observe qu'à concentration élevée, or ces concentrations ne sont atteintes que dans certains tissus de l'organisme (foie, poumon) excluant ainsi le cerveau et l'œil, ce qui limite son intérêt dans les formes graves. Bien tolérée avec peu d'effets secondaires, elle n'est ni embryotoxique, ni tératogène. Le traitement par la spiramycine diminue les contaminations fœtales en se concentrant dans le placenta limitant le passage transplacentaire du parasite et réduisant de plus de 50% le risque de transmission.

3.7.2. Prise en charge de la femme enceinte en France

3.7.2.1. Traitement prénatal de l'infection

Traitement préventif

Le traitement est instauré chez toute femme suspecte de toxoplasmose évolutive durant la grossesse pour diminuer le risque de transmission transplacentaire du parasite. Il comporte l'administration de spiramycine à la dose de 9 millions d'unités/jour en 3 prises, per os, sans interruption jusqu'à la fin de la grossesse.

Traitement curatif

L'administration de pyriméthamine et de sulfamide n'est indiquée qu'en cas de contamination fœtale prouvée par le diagnostic prénatal.

Selon les auteurs, 2 protocoles sont proposés : pyriméthamine (Malocide®) 1 comprimé à 50 mg/jour + sulfadiazine (Adiazine®) 3 g/jour en 2 ou 3 prises ou l'association pyriméthamine + sulfadoxine (Fansidar®) 1 comprimé/20 kg tous les 10 jours sans

dépasser 3 comprimés par prise. L'acide folinique (Lederfoline®) est associé à raison de 2 comprimés de 25 mg tous les 7 jours. Il faut traiter en continu jusqu'à l'accouchement. En cas de lésions sévères chez le fœtus et de pronostic péjoratif, une IMG est envisagée et proposée à la mère.

Traitement d'une infection maternelle tardive

Lorsque l'infection maternelle survient au-delà de 30 SA, certaines équipes considèrent qu'un traitement par pyriméthamine et sulfamide est d'emblée justifié, quel que soit le résultat de l'amniocentèse, en raison du taux élevé de transmission materno-foetale à cet âge gestationnel (plus de 70 %) et de l'évaluation insuffisante des performances de la PCR à ce terme (88).

D'autres recommandent la recherche d'ADN parasitaire dans le liquide amniotique avant de débiter ce traitement.

3.7.2.2. Perspectives

L'efficacité du traitement anténatal sur la transmission materno-foetale est actuellement discutée.

Il semblait acquis que la spiramycine réduisait la durée et la sévérité de l'infection placentaire (15). Toutefois plusieurs études ont montré que le taux de transmission n'était pas modifié par l'administration d'un tel traitement (67)(87). Les auteurs pensaient que cette absence d'efficacité pouvait être due à un passage très précoce du parasite précédant le début du traitement.

Dans leur étude, Gras et al (89), ont suggéré que seul un traitement par spiramycine débuté dans les deux semaines suivant la séroconversion maternelle pouvait être efficace. Or, un dépistage, même mensuel, ne permettrait pas d'instaurer un traitement suffisamment précocement pour prévenir la transmission materno-foetale.

De même, le choix de la molécule (spiramycine vs pyriméthamine-sulfadiazine) est également remis en question. Une méta-analyse réalisée par le groupe SYROCOT (*Systematic review on congenital toxoplasmosis*) en 2007 (90) ne retrouve pas un effet significatif du traitement curatif sur la diminution du risque de manifestations cliniques de la toxoplasmose congénitale (lésions oculaires et intracrâniennes).

De même, de nombreuses études n'ont pas pu conclure à une efficacité significative du traitement par spiramycine ou pyriméthamine-sulfadiazine sur le risque de lésions oculaires (89) (91) (90) (78).

Une réduction du risque de lésions intracrâniennes a été rapporté (89)(91) lorsque le traitement par spiramycine ou pyriméthamine-sulfadiazine est instauré dans les 4 semaines suivant l'infection maternelle. Pour Foulon et al (67), un traitement précoce par spiramycine ou pyriméthamine-sulfadiazine diminuerait de façon significative le taux de formes sévères et de séquelles.

La HAS a donc mis en place un PHRC TOXOGEST en 2010 afin d'apporter une réponse définitive à la question de l'efficacité du traitement prénatal de la toxoplasmose congénitale. Il s'agit d'un essai contrôlé, randomisé, multicentrique dont l'objectif est de comparer l'efficacité et la tolérance de la pyriméthamine + sulfadiazine vs la spiramycine après séroconversion maternelle pendant la grossesse pour réduire le taux de transmission au fœtus. L'étude devrait se poursuivre au moins jusqu'en 2015.

3.7.2.3. *Traitement postnatal*

Le diagnostic de toxoplasmose congénitale impose un traitement curatif d'au minimum un an, même si l'infection est infraclinique. Il a pour but de réduire la fréquence et la sévérité des séquelles à long terme, principalement les chorioretinites.

L'association pyriméthamine/sulfamide est le traitement de référence. La spiramycine ne diffusant pas dans le parenchyme cérébral, elle n'est plus utilisée. Le protocole de traitement préconisé dans la toxoplasmose congénitale par J. Couvreur (36) consiste à associer la pyriméthamine (0,5 à 1 mg/kg/j, per os tous les 2 ou 3 jours) à la sulfadiazine (50 à 80 mg/kg/j, per os tous les jours en 2 prises, matin et soir) et à l'acide folinique : 5 mg par voie orale ou intramusculaire tous les 3 jours, 50 mg chez le grand enfant et l'adulte. D'autres protocoles thérapeutiques associant pyriméthamine-sulfadoxine (Fansidar®) sont proposés et adoptés par plusieurs équipes (92)(85) à la dose d'un demi-comprimé pour 10 kg de poids et 50 mg d'acide folinique tous les 10 jours. Le traitement est institué ou poursuivi dès la naissance selon que la toxoplasmose congénitale a été diagnostiquée en période anténatale ou néonatale.

Les enfants traités, pendant la première année de vie, ne synthétisent pas ou en très faible quantité des anticorps. À l'arrêt du traitement, la production des anticorps redémarre et des rebonds sérologiques sont fréquemment observés sans répercussion clinique. Ils se traduisent par une augmentation du titre des IgG et/ou la détection d'IgM et/ou d'IgA spécifiques (93).

Chez les nouveau-nés pour lesquels il n'existe pas d'argument en faveur d'une infection, l'abstention thérapeutique est la règle. Si le diagnostic est établi lors du suivi sérologique mensuel, quel qu'en soit la date, ils seront traités selon les mêmes modalités.

3.7.2.4. Perspectives

Il n'existe pas de consensus sur la durée du traitement postnatal : 12 à 24 mois en France selon les équipes, 3 mois seulement au Danemark (selon les recommandations de l'Organisation mondiale de la santé).

L'efficacité du traitement postnatal a également fait l'objet d'évaluations récentes mais les protocoles de prise en charge pré et postnatale étant différents d'un pays à l'autre, il est difficile de conclure à une efficacité significative de la prise en charge thérapeutique postnatale.

Suite aux recommandations de la HAS, le PHRC national TOSCANE a débuté en janvier 2010. Il s'agit d'une étude multicentrique, randomisée visant à évaluer l'efficacité d'un traitement court (3 mois) versus un traitement long (12 mois). Un traitement par pyriméthamine-sulfamides de 3 mois est initié dès la naissance ou dès la confirmation de l'infection en cas de diagnostic postnatal. Il est alors suivi soit d'un traitement par Fansidar® pendant les 9 mois suivants, soit d'une abstention thérapeutique. L'objectif est de comparer deux stratégies thérapeutiques sur le risque de survenue de chorioretinite 2 ans après l'inclusion et d'évaluer l'efficacité du traitement chez les enfants présentant des lésions à la naissance. Cette étude est toujours en cours et devrait se poursuivre jusqu'en 2015.

4. VALIDATION D'UNE TECHNIQUE DE PCR EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION D'ADN DE *TOXOPLASMA GONDII* DANS LE LIQUIDE AMNIOTIQUE ET DEMANDE D'AUTORISATION AUPRES DE L'AGENCE REGIONALE DE SANTE POUR LE DIAGNOSTIC PRENATAL DE LA TOXOPLASMOSE CONGENITALE AU CHU DE BORDEAUX

4.1. Introduction

Le laboratoire de parasitologie du CHU de Bordeaux est un centre expert pour la sérologie toxoplasmique. Les laboratoires publics ou privés d'Aquitaine envoient régulièrement des sérums de femmes enceintes afin de confirmer la séroconversion et de dater avec précision l'infection. Le diagnostic postnatal de la toxoplasmose congénitale basé sur le suivi sérologique durant la première année de vie des enfants est également assuré par le laboratoire. La recherche d'ADN de *T. gondii* dans les prélèvements de LCR, sang total et LBA est réalisée en routine par PCR en temps réel. Cependant, actuellement les prélèvements de liquide amniotique ponctionnés au CHU sont adressés au laboratoire privé CERBA à Paris. Il était donc intéressant de compléter l'expertise du laboratoire en réalisant le DPN de la toxoplasmose congénitale.

Le fait de pouvoir réaliser cette analyse au CHU serait un point fort dans la prise en charge de la patiente avec un rendu de résultat plus rapide, une communication biologiste/clinicien facilitée, et l'assurance d'un suivi global de la mère et de l'enfant.

Par ailleurs, les cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en anténatal ne sont pas systématiquement déclarés par le laboratoire privé au CNR, ce qui sera fait puisque le laboratoire fait partie du réseau de surveillance « Toxosurv ».

L'ADN de *T. gondii* des échantillons positifs sera également envoyé au CNR pour le typage moléculaire de la souche afin d'obtenir des données épidémiologiques sur le génotype des souches responsables de toxoplasmose congénitale en Aquitaine.

Cependant pour pouvoir pratiquer le DPN, il faut au préalable obtenir une autorisation auprès de l'ARS.

Les objectifs de ce travail de thèse sont donc:

- la validation de la technique commerciale TIB MOLBIOL (société GmbH, Berlin, Allemagne) de PCR en temps réel pour la recherche de *T. gondii* dans le liquide amniotique, déjà utilisée en routine depuis 2012 sur d'autres prélèvements.

Il s'agit d'une validation de méthode en portée B selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2012. En effet, l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale a introduit de nouvelles dispositions législatives dans la 6^{ème} partie du code de la santé publique, soumettant en particulier les laboratoires à l'accréditation de leur activité selon les exigences de la norme NF ISO 15189. L'accréditation est une attestation délivrée par le Cofrac reconnaissant les compétences techniques du laboratoire, et permettant ainsi d'établir un niveau certain de confiance dans les résultats d'analyse.

- la constitution du dossier de demande d'autorisation à la pratique du DPN.

4.2. Validation de la technique de PCR pour la détection de l'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique

4.2.1. Matériels et méthodes

4.2.1.1. Les échantillons cliniques de liquide amniotique

Les échantillons de liquide amniotique utilisés dans cette étude ont été recueillis par amniocentèse par le Pr Saura (Unité de génétique moléculaire, Pôle de Biologie et Pathologie). Chaque fois que la quantité de liquide amniotique prélevée le permettait, une partie était envoyée au laboratoire de parasitologie. Ainsi, du 1^{er} février 2013 au 28 février 2014, 32 échantillons de liquide amniotique ont été adressés au laboratoire et conservés à -80°C avant d'être utilisés et analysés. 20 d'entre eux avaient été prélevés pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale.

Tous les échantillons étaient adressés au laboratoire privé autorisé pour le DPN travaillant actuellement avec le CHU de Bordeaux.

*4.2.1.2. Tachyzoïtes vivants de *T. gondii**

La souche de toxoplasme utilisée est une souche RH (génotype I) isolée pour la première fois par Sabin en 1941 à partir d'un cas d'encéphalite aigüe chez un enfant (94). La souche nous a été fournie par le CNR de la Toxoplasmose (CHU Limoges).

La souche de toxoplasme RH est entretenue chez la souris Swiss OF1, dans l'animalerie du Pr Vincendeau par passage continu chez des souris saines 3 fois par semaine. Le passage de la souche est réalisé par injection intrapéritonéale de 2×10^6 tachyzoïtes dans 100 μ L de sérum physiologique. 48 H après l'inoculation, les tachyzoïtes vivants sont recueillis dans le liquide de lavage péritonéal après sacrifice de la souris.

Après une centrifugation douce de 10 minutes à 1500 tours/minute du liquide de lavage péritonéal, le surnageant est éliminé et le culot est lavé 3 fois avec du tampon PBS afin de bien laver les tachyzoïtes.

Les tachyzoïtes sont ensuite comptés en cellule de Malassez et ajustés afin de constituer une suspension à la concentration de 10^5 tachyzoïtes/ mL de solution tampon PBS.

4.2.1.3. Suspensions de tachyzoïtes à différentes concentrations

Par dilution de la suspension initiale à 10^5 tachyzoïtes/mL dans du PBS, 10 suspensions à 0,1 ; 1 ; 2 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 100 ; 1000 ; 10000 ; 100000 tachyzoïtes/mL ont été obtenues afin d'établir une gamme de quantification.

Des liquides amniotiques artificiellement infectés à des concentrations de 1 et 100 toxoplasmes/mL ont été créés à partir de la suspension à 10^5 tachyzoïtes/mL.

4.2.1.4. La gamme du CNR

Le CNR a envoyé aux laboratoires pratiquant le DPN par recherche d'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique, une gamme de quantification en 2011. Il s'agit d'un échantillon de liquide amniotique lyophilisé, artificiellement infecté à une concentration de 10^5 toxoplasmes/ml (souche RH). Cet échantillon est reconstitué en ajoutant 3 ml d'eau pour préparation injectable. 2 mL sont centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes. Après élimination de 1,8 ml de surnageant, le culot est repris dans les 200 μ L restants pour réaliser l'extraction de l'ADN.

Pour la gamme de quantification du CNR les dilutions au 1/10^{ème} avec de l'eau distillée stérile ont été effectuées à partir de l'ADN extrait, pour obtenir 7 points de gamme à 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 et 0.1 toxoplasmes/mL.

4.2.1.5. Extraction de l'ADN

Après plusieurs essais de mise au point, le protocole suivant de prétraitement des échantillons a été validé :

- ✓ Volume total de l'échantillon à tester : 6 mL (3 X 2mL)
- ✓ Prétraitement : les 2 mL de l'échantillon sont centrifugés dans une ultracentrifugeuse, dédié au DPN, à 12000g pendant 10 minutes. Après élimination de 1760 µL de surnageant, le culot est remis délicatement en suspension dans les 240 µL restants. Le volume minimum nécessaire pour réaliser l'extraction de l'ADN est de 200 µL.

Ce prétraitement a été appliqué à la gamme du CNR, aux suspensions de tachyzoïtes dans le PBS et aux les liquides amniotiques artificiellement infectés à 1 et 100 toxoplasmes/mL.

Le PTBM du CHU de Bordeaux dispose d'un automate d'extraction le MagNAPure 96® (figure 33) (Roche Diagnostics GmbH, Allemagne). Le kit commercial Total Nucleic Acid Isolation (Roche) est utilisé en routine selon les recommandations du fournisseur. Le principe de l'extraction est basé sur la lyse cellulaire et la digestion des protéines par l'action de la protéinase K en tampon de lyse (95) puis la fixation des acides nucléiques à des billes magnétiques de silice. L'ADN extrait est ensuite élué dans 100 µL de tampon d'éluion.

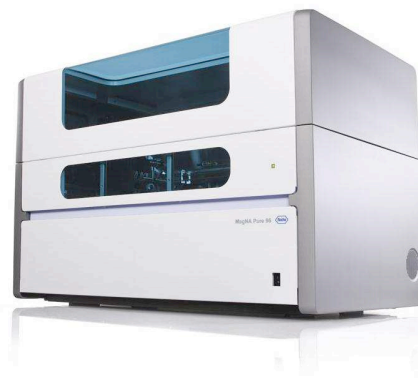


figure 33 : Extracteur MagNA Pure 96 (96)

4.2.1.6. Amplification de l'ADN

La PCR est réalisée dans un thermocycleur ou bloc thermique (figure 34) : le lightCycler 2.0 Roche®. Il possède un rotor qui permet d'analyser simultanément 32 échantillons déposés dans de fins capillaires en verre, pour optimiser les échanges thermiques.



figure 34 : Amplificateur LightCycler 2.0 Roche® (96)

Les réactifs de PCR utilisés sont issus d'une trousse commerciale LightMix® Kit *Toxoplasma gondii* de la société TIB MOLBIOL (Berlin, Allemagne). Les amorces ciblent un fragment d'ADN de 134 pb situé sur la séquence REP 529 de *T. gondii*. Le fragment amplifié est plus court que la séquence initialement décrite par Reischl et al (97) ou Homans et al (98).

La PCR utilisée étant une technique en temps réel, elle permet l'amplification de l'ADN et la détection simultanée des produits amplifiés en associant à chaque cycle d'amplification la mesure de la quantité d'ADN grâce à un marqueur fluorescent. Le signal fluorescent est obtenu grâce à l'utilisation de sondes marquées basée sur la technologie FRET. Le système FRET utilise deux sondes oligonucléotidiques complémentaires d'une région interne de la séquence à amplifier pour augmenter la spécificité de la technique. Le principe est illustré dans la figure 35.

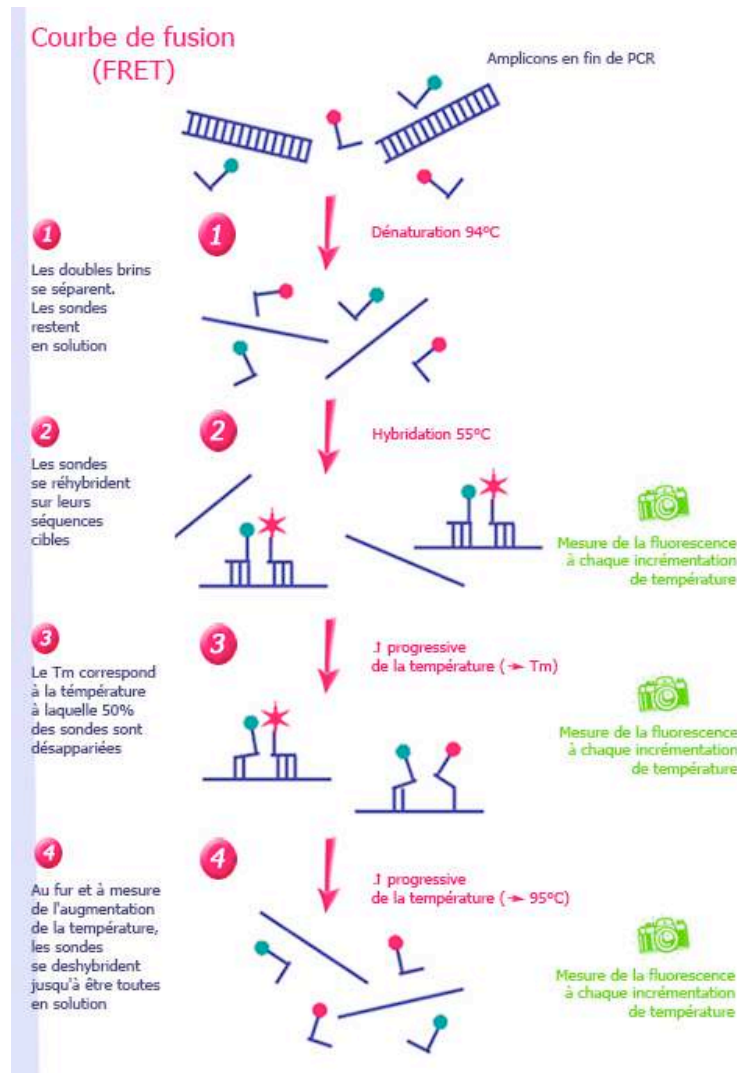


figure 35 : Technologie FRET (99)

La fluorescence émise lors de l'hybridation est détectée par le canal 640 nm pour l'ADN *T. gondii*.

Le volume réactionnel final est de 20 μL (5 μL d'éluat, 15 μL de mix fourni par le fabricant). Chaque échantillon est extrait 3 fois mais une seule réaction d'amplification est réalisée pour chaque éluat.

La réaction comporte 50 cycles d'amplification comprenant les 3 étapes suivantes (figure 36) :

- ✓ **Dénaturation** : Séparation des 2 brins d'ADN cible à 95°C pendant 5 secondes
- ✓ **Hybridation** : Appariement des amorces à 62°C pendant 10 secondes.
- ✓ **Elongation** : synthèse du brin complémentaire à partir des amorces par ajout successif des dNTPs dans le sens 5'-3' à 72°C pendant 15 secondes.

Le lightCycler 2.0 Roche® a un taux de croissance calorimétrique de 20°C/ seconde.

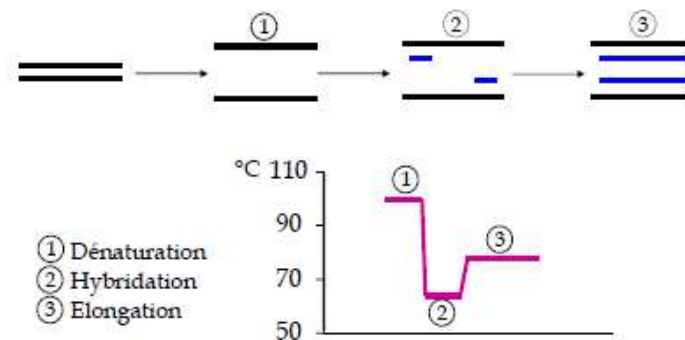


figure 36 : Etapes de la réaction de PCR

4.2.1.7. Contrôles de qualité

Différents contrôles de qualité doivent être testés dans chaque série de PCR afin de s'assurer du bon déroulement de la technique :

- ✓ Un contrôle ou témoin négatif sans ADN de *T. gondii* (15 µL de mix + 5 µL d'eau distillée stérile) pour objectiver l'absence de contamination.

- ✓ Un contrôle ou témoin positif faible équivalent à 10 toxoplasmes/mL obtenu à partir d'un lyophilisat d'ADN purifié de *T.gondii* (AmpliRun® Toxoplasma gondii DNA Control, société Vircell-Orgentec). Le lyophilisat d'ADN après reconstitution contient entre 1.10^4 et 2.10^4 copies d'ADN/µL. 2 dilutions successives dans du PBS au 1/100^{ème} et une dernière au 1/13^{ème} dans du liquide amniotique dépourvu d'ADN de *T. gondii* permettent d'obtenir un témoin positif à une concentration de l'ordre de 10 toxoplasmes/mL qui devra être détectée entre 32 et 34 CT (d'après la gamme du CNR, une charge parasitaire à 10 toxoplasmes/mL est détectée par le lightCycler 2.0 Roche® à 33 CT). Ce témoin positif faible sera appelé CQI pour la suite.

- ✓ Un contrôle positif TIB MOLBIOL correspondant à un calibrant qui permet à l'automate de se calibrer par rapport à la courbe d'étalonnage.

- ✓ Un contrôle interne (IC) TIB MOLBIOL présent dans le mix réactionnel. Le fragment amplifié de 300 pb (ADN non parasite) émet une fluorescence détectée avec le lightCycler 2.0 Roche® à 705 nm. Son amplification témoigne de l'absence d'inhibiteur de PCR dans l'échantillon testé.

4.2.1.8. *résultats*

La cinétique de la réaction de PCR en temps réel peut être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde (figure 37).

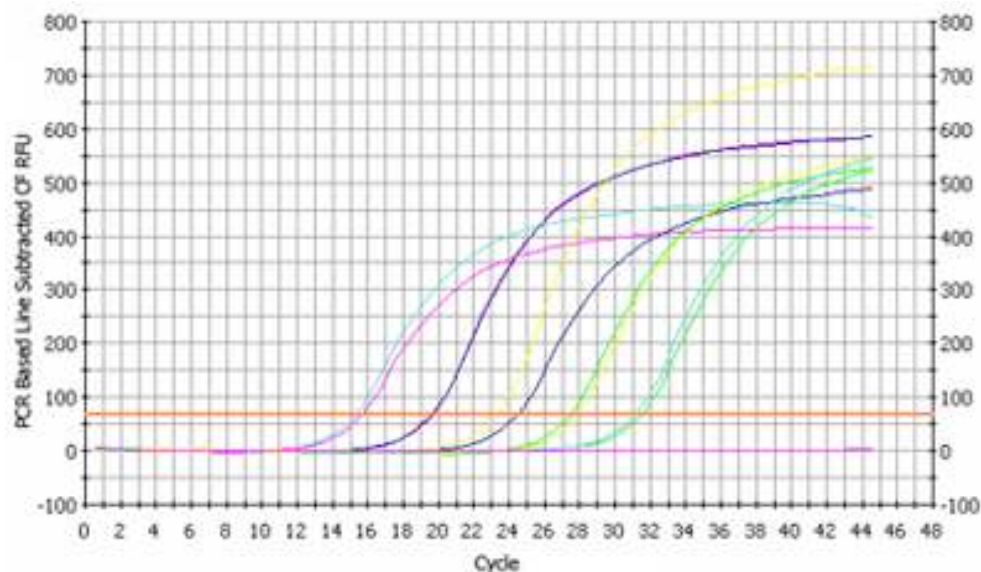


figure 37 : Courbe d'amplification de PCR en temps réel

abscisse : nombre de cycles ; ordonnée : fluorescence mesurée en RLU (Unité relatives de lumière) (100)

Cette courbe peut être divisée en 3 phases :

- *Phase 1* : la fluorescence ne se démarque pas du bruit de fond.
- *Phase 2* : augmentation de la fluorescence avec une phase exponentielle pendant laquelle la quantité de produit de PCR obtenue est directement proportionnelle au nombre de copies initiales du fragment d'ADN amplifié.
- *Phase 3* : phase en plateau avec un ralentissement de l'amplification du le plus souvent à l'épuisement d'un des différents réactifs de la PCR comme les amorces

La positivité de la réaction de PCR et la quantification de la charge parasitaire en copies d'ADN/ mL dans le prélèvement sont déterminées par la mesure du nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition de ce signal seuil dénommé cycle seuil ou CT (Cycle Threshold) est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le CT calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. En d'autres termes, plus la quantité d'ADN cible est élevée, plus le CT est faible. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR.

La figure 38 montre les résultats bruts obtenus sur le LightCycler 2.0 Roche® pour une série de PCR *T. gondii* faite en routine au laboratoire de parasitologie. Il est important de s'assurer que l'amplification du contrôle positif TIB MOLBIOL et du contrôle positif faible équivalent à 10 toxoplasmes/mL est correcte en vérifiant l'aspect de la courbe exponentielle et en contrôlant la valeur du CT. De même, la courbe du témoin négatif doit être plate.

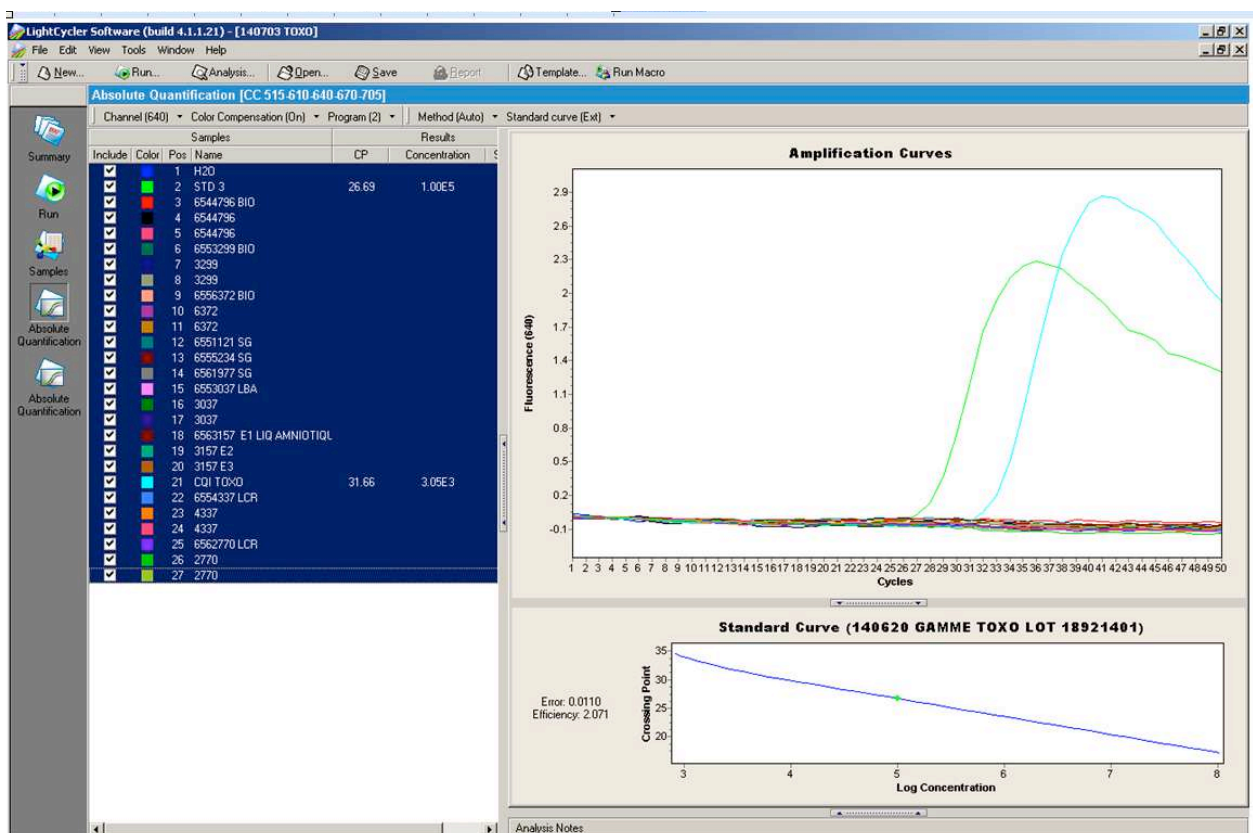


figure 38 : Courbes d'amplification obtenues sur le LightCycler 2.0 Roche® avec en abscisse le nombre de cycles et en ordonnées la fluorescence mesurée

Le contrôle interne (IC) TIB MOLBIOL doit également être amplifié dans chaque échantillon à tester (figure 39). La valeur du CT ne varie pas ou très peu pour l'IC, d'une série de PCR à l'autre.

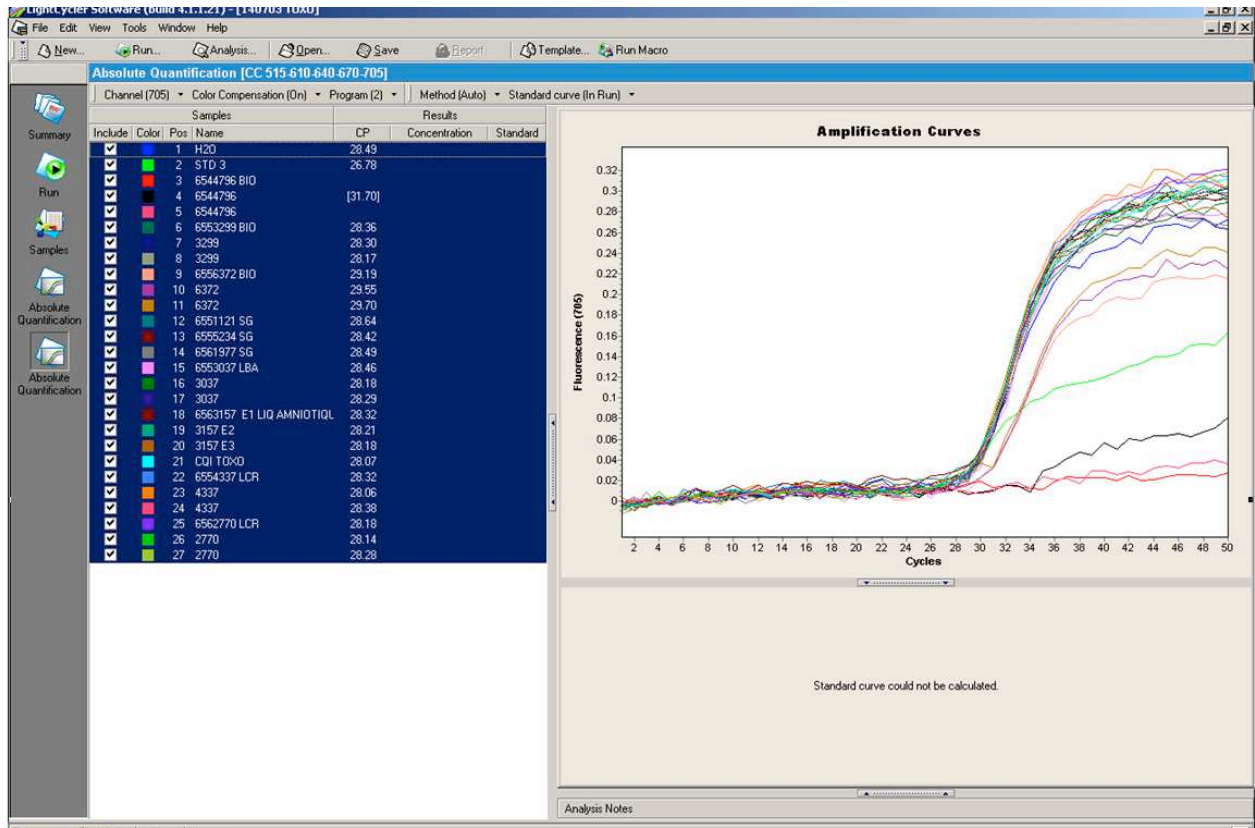


figure 39 : Courbes d'amplification du contrôle interne (IC) TIB MOLBIOL sur le LightCycler 2.0 Roche® avec en abscisse le nombre de cycles et en ordonnées la fluorescence mesurée (CHU Bordeaux)

4.2.1.9. *Analyse de risque*

Une analyse de risque a été réalisée selon la méthode des 5M (Matériel, Milieu, Méthode, Main d'œuvre et Matière) afin d'identifier de manière exhaustive les paramètres pouvant influencer sur le résultat. Cette analyse a permis de prioriser les actions à mettre en place afin de rendre un résultat fiable. Elle figure en annexe 1 de ce travail.

4.2.1.10. Paramètres de la technique à valider

Les performances annoncées par le fournisseur pour la technique de PCR sont les suivantes :

- ✓ Limite de détection : 10 copies pour 5µl d'extrait, soit 200 copies/mL d'échantillon primaire,
- ✓ Limites de quantification : 10^2 à 10^6 copies/mL,
- ✓ Sensibilité analytique : 96,93%,
- ✓ Spécificité analytique : 97,93%,
- ✓ Résultat en 50 minutes pour 50 cycles après extraction.

De part la nature du prélèvement (précieux +++) et l'importance du résultat, le biologiste engage sa responsabilité et attend de la méthode des critères de performance bien établis : fiabilité des automates d'extraction et d'amplification, **excellente sensibilité** de la technique pour éviter les faux négatifs, **spécificité de 100%** (101) (97), **seuil de détection de 0,75 à 2,5 toxoplasmes / mL** fixé en 2012 par le CNR en attendant les recommandations internationales (101). Il doit également s'assurer de la **stabilité de l'échantillon** jusqu'à réalisation de l'analyse.

Les différents paramètres de performances à vérifier et à valider étaient donc :

- La répétabilité
- La reproductibilité
- La fidélité intermédiaire
- La limite de détection
- La limite de quantification
- L'absence de contamination
- La stabilité des réactifs et des échantillons

Pour chaque paramètre de performance validé, les tests ont été effectués sur la méthode dans sa globalité, c'est-à-dire du prétraitement de l'échantillon, à l'analyse en elle-même et jusqu'au rendu du résultat quantitatif. Chaque échantillon a donc subi les étapes de prétraitement, d'extraction et d'amplification avec quantification.

4.2.2. Résultats

4.2.2.1. Pré-analytique

Les premiers essais d'amplification, à partir d'ADN extrait de liquides amniotiques non centrifugés, concentrés artificiellement à 1000, 100, 10, 5 et 1 toxoplasmes/mL n'ont permis de détecter l'ADN de *T. gondii* que pour les fortes concentrations à 1000 et 100 T/mL.

L'efficacité de la PCR pour diagnostiquer une infection toxoplasmique à partir du culot cellulaire a été prouvée dès 1990 par l'équipe de Grover et al (102). Afin d'augmenter la sensibilité de la technique, une centrifugation préalable du liquide amniotique est indispensable.

Il n'existe actuellement aucune recommandation sur le prétraitement des échantillons de liquide amniotique. Après plusieurs essais avec différents volumes de liquide amniotique et d'après les données publiées, nous avons choisi de centrifuger 2 mL de liquide amniotique par prise d'essai à grande vitesse (12000 g) pendant 10 minutes ce qui permet de détecter des concentrations faibles à 1 toxoplasme/mL.

Pour chaque prélèvement de liquide amniotique à tester, 3 X 2 mL seront prétraités pour pouvoir réaliser l'analyse en triplicate. En effet, d'après la loi statistique de Poisson, on ne peut pas exclure formellement l'absence de toxoplasme dans 1% des tubes lorsque la concentration est inférieure à 10 toxoplasmes / mL.

4.2.2.2. Validation des performances de la technique de PCR en temps réel

REPETABILITE DE L'EXTRACTION AUTOMATISEE EN MAGNA PURE 96®

Principe : analyser un même échantillon par un même opérateur avec le même lot de réactifs, le même instrument, le même étalonnage dans un délai le plus court afin de caractériser la meilleure performance possible dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (NF EN ISO 15189, Cofrac 2012).

Le coefficient de variation (CV) permet d'évaluer la répétabilité de la méthode.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Répétabilité de l'extraction

Test effectué	Réalisation de 7 extractions au cours d'une même série de PCR par le même opérateur, à partir du même liquide amniotique à 2 concentrations différentes de 1 et 100 tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> / mL* (T/mL)				
Méthode de calcul	CV (%) = 100 x écartype / moyenne				
Critères d'acceptation	CV < 5%				
Résultats	Valeur cible (unité)	Moyenne CT (CT = Cycle Threshold)	CV (%)	CV (%) Acceptation	Acceptation
100 T/mL	Non applicable	27,74	0,55	5	Oui
1 T/mL	Non applicable	34,20	3,03	5	Oui

*les différentes concentrations sont obtenues en enrichissant un liquide amniotique négatif avec des tachyzoïtes vivants de *Toxoplasma gondii* (souche RH entretenue chez la souris OF1)

Conclusion : acceptable

REPETABILITE DE L'AMPLIFICATION SUR LE LIGHTCYCLER 2.0 ROCHE®

Tableau 6 : Répétabilité de l'amplification

Test effectué	Réalisation de 18 amplifications au cours d'une même série de PCR par le même opérateur, à partir du même liquide amniotique à 2 concentrations différentes de 1 et 100 tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> / mL* (T/mL). Cette démarche est similaire à celle adoptée par Jauregui et al (103).				
Méthode de calcul	CV (%) = 100 x écartype / moyenne				
Critères d'acceptation	CV < 5%				
Résultats	Valeur cible (unité)	Moyenne CT	CV (%)	CV (%) Acceptation	Acceptation
100 T/mL	Non applicable	27,85	0,86	5	Oui
1 T/mL	Non applicable	34,92	1,96	5	Oui

Conclusion : acceptable ; le coefficient de variation est faible et tout à fait conforme aux données de la littérature qui rapporte un CV de 1,6% pour des concentrations en parasites comparables (104).

Les 2 concentrations testées correspondent aux valeurs hautes et basses des concentrations en toxoplasme rapportées dans les cas de toxoplasmose congénitale. En

effet, la concentration moyenne d'un liquide amniotique en tachyzoïtes lors d'une infection congénitale est de 10.

Les valeurs de CT ont été privilégiées aux données quantitatives pour la validation de la technique de PCR. En effet, la quantification en toxoplasmes/mL ou en copies/mL n'étant pas standardisée, elle peut varier pour un même échantillon de façon +/- importante d'une série à l'autre. Les coefficients de variation sont plutôt de l'ordre de 50% en utilisant les données quantitatives, ce qui trop élevé par rapport aux recommandations actuelles pour les techniques de biologie moléculaire.

Cliniquement ce qui est primordial c'est la présence (quelle que soit la concentration en toxoplasme/mL) ou l'absence d'ADN de *T. gondii* dans le LA.

FIDELITE INTERMEDIAIRE DE L'EXTRACTION ET DE L'AMPLIFICATION

Tableau 7 : Fidélité intermédiaire de l'extraction et de l'amplification

Test effectué	Sur 6 jours différents, réalisation par un opérateur d'une série PCR (extraction + amplification), à partir de 2 liquides amniotiques à 2 concentrations différentes de 1 et 100 tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> / mL* (T/mL). Cette démarche est semblable à celle adoptée par Costa (104).				
Méthode de calcul	CV (%) = 100 x écartype / moyenne				
Critères d'acceptation	CV < 5%				
Résultats	Valeur cible (unité)	Moyenne CT	CV (%)	CV (%) fournisseur	Acceptation
100 T/mL	Non applicable	27,3	1,88	Non indiqué	Oui
1 T/mL	Non applicable	34,7	1,92	Non indiqué	Oui

Conclusion : acceptable ; le coefficient de variation est inférieur au CV de 12,3 % publié dans la littérature pour des concentrations en parasites comparables (104).

APPROCHE DE LA JUSTESSE

Depuis 2010, le CNR de la toxoplasmose organise gratuitement 2 à 3 fois par an des contrôles nationaux de qualité (CNQ) pour la détection d'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique par PCR dans le but d'harmoniser et d'améliorer le diagnostic moléculaire dans les centres pratiquant le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale.

Tableau 8 : Résultats EEQ 2012

EEQ 2012	Etude de 4 points de contrôle qualité externe (12 ^{ème} CNQ PCR- <i>Toxoplasma</i> en diagnostic prénatal) Après une seule extraction pour chaque échantillon à tester (volume limité à 2 mL), amplification de l'éluat en triplicate dans la même série de PCR				
Critères d'acceptation	Le calcul du biais utilisé dans l'approche de la justesse n'est pas applicable par manque de standardisation de la quantification. Le CNR juge correct tout résultat respectant l'ordre de grandeur des valeurs attendues.				
Résultats	Valeur attendue (toxoplasme/mL)	Valeur CT TIB MOLBIOL	Valeur gamme TIB MOLBIOL (toxoplasme/mL)	Valeur gamme CNR (toxoplasme/mL)	Acceptation CNR
	7 (+/- 4)	33,21	16	8	OUI
	7 (+/- 4)	31,91	40	17	OUI
	7 (+/- 4)	31,43	56	24	OUI
	20 (+/- 10)	30,7	93	34	OUI

Quatre échantillons de liquide amniotique positifs, 3 à une concentration de 7 (+/-4) toxoplasmes/mL et 1 à une concentration plus élevée de 20(+/-10) toxoplasmes/mL ont été analysés en aveugle. L'ordre de grandeur de quantification était correct et a été validé par le CNR.

Tableau 9 : Résultats EEQ 2013

EEQ 2013	Etude de 8 points de contrôle qualité externe (13 ^{ème} et 14 ^{ème} CNQ PCR- <i>Toxoplasma</i> en diagnostic prénatal) Après une seule extraction pour chaque échantillon à tester (volume limité à 2 mL), amplification de l'éluat en triplicate dans la même série de PCR				
Critères d'acceptation	Le calcul du biais utilisé dans l'approche de la justesse n'est pas applicable par manque de standardisation de la quantification. Le CNR juge correct tout résultat respectant l'ordre de grandeur des valeurs attendues.				
Résultats	Valeur attendue (toxoplasme/mL)	Valeur CT TIB MOLBIOL	Valeur gamme TIB MOLBIOL (toxoplasme/mL)	Valeur gamme CNR (toxoplasme/mL)	Acceptation CNR
Avril et septembre	5 (+/- 4)	Non détecté	Non détecté	Non détecté	OUI*
	5 (+/- 4)	31,4	8	16	OUI
	5 (+/- 4)	31,71	11	19	OUI
Décembre	Négatif	Non détecté	Non détecté	Non détecté	OUI
	9 (+/- 5)	30,38	19	31	OUI
	9 (+/- 5)	30,46	18	30	OUI
	35 (+/- 23)	28,87	68	90	OUI

Nous avons répondu de façon en partie incorrecte au 13^{ème} CNQ PCR-*Toxoplasma*. En effet, l'ADN de *T. gondii* n'a pas été détecté dans un des 3 prélèvements de liquide amniotique à 5 toxoplasmes/mL (il s'agissait en fait du même échantillon de liquide amniotique envoyé en 3 exemplaires par le CNR). Ce résultat pourrait être dû à la loi de Poisson. Le CNR attend d'un laboratoire expert ayant l'autorisation de pratiquer le DPN de la toxoplasmose congénitale qu'il détecte, pour un échantillon faiblement concentré, l'ADN dans au moins 2 des 3 extraits analysés.

C'est la raison pour laquelle, chaque échantillon de liquide amniotique sera analysé en triplicate afin d'augmenter la sensibilité de la technique et éviter ce risque.

Comme l'ADN a été détecté dans les 2 autres échantillons à tester, le liquide amniotique aurait été rendu positif.

Nos résultats du 13^{ème} CNQ PCR-*Toxoplasma* DPN ont donc ainsi été validés par le CNR.

14^{ème} CNQ PCR-Toxoplasma :

Nous avons répondu de façon parfaitement correcte au contrôle de qualité de décembre 2013.

Conclusion : acceptable

INTERVALLE DE MESURE

Limite de détection

La limite de détection a été définie comme la plus petite quantité d'ADN de *T. gondii* détectée avec une probabilité supérieure ou égale à 95%. Elle a été déterminée à partir de liquide amniotique à des concentrations faibles de 1 et 0,5 toxoplasmes/mL.

Tableau 10 : Limite de détection

Données fournisseurs	Limite de détection du kit donnée par le fournisseur = 1000 copies /mL soit l'équivalent de 4 T/mL pour le LightCycler® 2.0 avec le mix FastStart DNA Master HybProbe (Mix du fournisseur)
Test effectué	Réalisation de 20 PCR à partir de 2 liquides amniotiques à 0,5 et 1 toxoplasme/mL
Méthode de calcul	Quantité d'ADN de <i>T. gondii</i> détectée avec une probabilité supérieure ou égale à 95%
Résultats	Echantillons à 0,5 toxoplasme/mL = 60% Echantillons à 1 toxoplasme/mL = 100%

Conclusion : la limite de détection déterminée à 1 toxoplasme/mL pour la PCR réalisée sur le LightCycler 2.0 Roche® avec le mix FastStart DNA Master HybProbe est donc plus basse que celle annoncée par le fournisseur.

Limite de quantification basse

Tableau 11 : Limite de quantification basse

Données fournisseurs	Limite de détection du kit donnée par le fournisseur = 1000 copies /mL soit l'équivalent de 4 toxoplasme/mL pour le LightCycler 2.0 Roche® avec le mix FastStart DNA Master HybProbe
Test effectué	Réalisation de 18 PCR (extraction + amplification) dans une même série, à partir d'un même échantillon de liquide amniotique à 1 toxoplasme/mL
Méthode de calcul	Concentration à 1 toxoplasme/mL mesurée dans 100% des cas

Conclusion : La limite de quantification basse de la technique est de 1 toxoplasme/mL et se trouve dans la fenêtre des concentrations basses à détecter d'après les recommandations du CNR (0,75 – 2,5 toxoplasme/mL).

Limite de quantification haute

Tableau 12 : Limite de quantification haute

Test effectué	Non applicable : Tenir compte de la valeur donnée par le fournisseur car lors d'une toxoplasmose congénitale, la concentration en tachyzoïtes de <i>T. gondii</i> dans le liquide amniotique est généralement faible, de l'ordre de 10 toxoplasmes/mL en moyenne. Les concentrations élevées dépassent rarement 100 toxoplasmes/mL de liquide amniotique (soit $2,5 \cdot 10^4$ copies /mL)
Résultat	Limite de quantification haute du kit donnée par le fournisseur = 10^8 copies/mL (soit environ 400 000 toxoplasmes/mL)

Conclusion : la limite de quantification haute de la technique est de 10^8 copies/mL.

LINEARITE

Tableau 13 : Linéarité

Données fournisseurs	L'intervalle linéaire s'étend de 10^3 à 10^8 copies d'ADN de <i>T. gondii</i> avec le LightCycler 2.0 Roche®
Test effectué	6 calibrants ou « standards » fournis dans le kit à des concentrations allant de 10^3 à 10^8 copies/mL sont utilisés pour la réalisation de la courbe d'étalonnage. Chaque calibrant est amplifié en triplicate. Une nouvelle gamme d'étalonnage est réalisée à chaque changement de lot de réactifs.
Méthode d'analyse	Mesure de la linéarité à partir de la courbe d'étalonnage
Critère d'acceptation	3,33 CT d'écart entre deux dilutions de 10 en 10

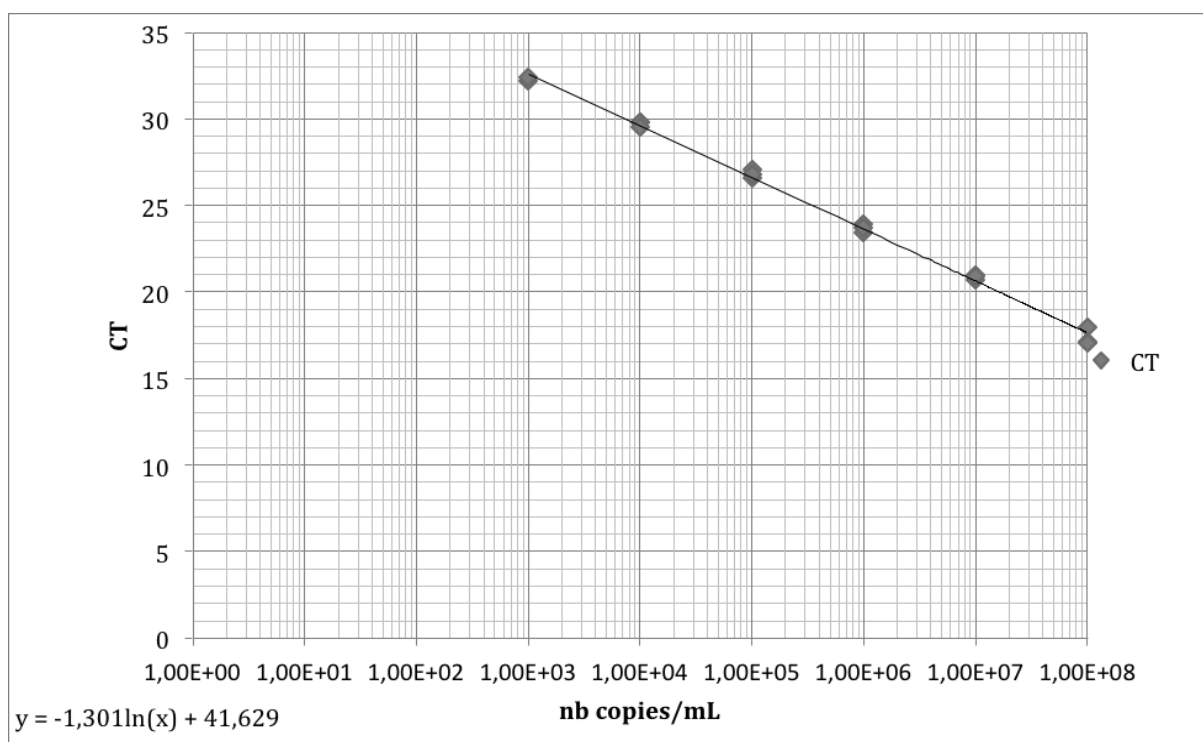


figure 40 : Courbe de linéarité

Conclusion : la linéarité s'étend de 10^3 à 10^8 copies /mL.

COMPARAISON A UNE AUTRE METHODE

Entre 1 février 2013 et le 28 février 2014, les 32 liquides amniotiques envoyés par le Pr Saura ont été analysés en aveugle dans le laboratoire avec la technique de PCR et les résultats obtenus ont été comparés avec ceux du LBM privé autorisé qui pratique habituellement l'analyse pour le CHU.

Pour les 21 liquides amniotiques adressés pour la recherche d'ADN de *T. gondii*, les résultats étaient identiques à ceux du laboratoire autorisé : la recherche était négative pour 20 liquides amniotiques et positive pour 1 (tableau 14). Par ailleurs, de l'ADN de *T.gondii* n'a pas été détecté dans les 11 autres échantillons analysés et non susceptibles d'en contenir démontrant l'absence de faux positif durant la période d'essai.

Tableau 14 : Résultats de la recherche d'ADN de *T. gondii* dans les 32 échantillons de liquide amniotique analysés au CHU de Bordeaux et dans le laboratoire autorisé au diagnostic prénatal

	Date ponction	CHU Bordeaux (copies/mL)	Laboratoire privé autorisé
1	21/03/13	négative	négative
2	04/04/13	négative	non adressée
3	10/04/13	négative	Parvovirus B19 négatif
4	11/04/13	négative	*
5	11/04/13	négative	*
6	26/04/13	négative	*
7	30/04/13	négative	négative
8	15/05/13	négative	négative
9	15/05/13	négative	négative
10	25/06/13	négative	*
11	25/06/13	négative	négative
12	23/07/13	négative	*
13	23/07/13	4100	POSITIF
14	02/08/13	négative	non adressée
15	07/08/13	négative	négative
16	20/08/13	négative	négative
17	27/08/13	négative	négative
18	27/08/13	négative	négative
19	04/09/13	négative	*
20	27/11/13	négative	*
21	10/12/13	négative	négative
22	11/12/13	négative	négative
23	03/01/14	négative	négative
24	07/01/14	négative	négative
25	08/01/14	négative	négative
26	14/01/14	négative	négative
27	14/01/14	négative	négative
28	23/01/14	négative	négative
29	23/01/14	négative	négative
30	23/01/14	négative	négative
31	14/02/14	négative	non adressée
32	19/02/14	négative	négative

* les liquides amniotiques ponctionnés ont été adressés au laboratoire privé pour une recherche de CMV congénital, la recherche de *T.gondii* n'a pas été effectuée.

Conclusion : Les résultats obtenus avec la technique de PCR à valider sont comparables à ceux obtenus avec la technique utilisée dans le LBM privé autorisé pour le diagnostic prénatal.

CONTAMINATION

Recherche d'une possible contamination lors de l'extraction

Test effectué	Extraction en alternance de 12 échantillons de liquide amniotique à 100 toxoplasmes/mL (positifs forts) et d'un témoin négatif puis extraction en alternance de 12 échantillons à 1 toxoplasme /mL (positifs faibles) et d'un témoin négatif
Critères d'acceptation	Absence de contamination
Résultats	Aucune contamination du témoin négatif par les échantillons positifs n'a été détectée lors de l'extraction sur MagNA Pure 96

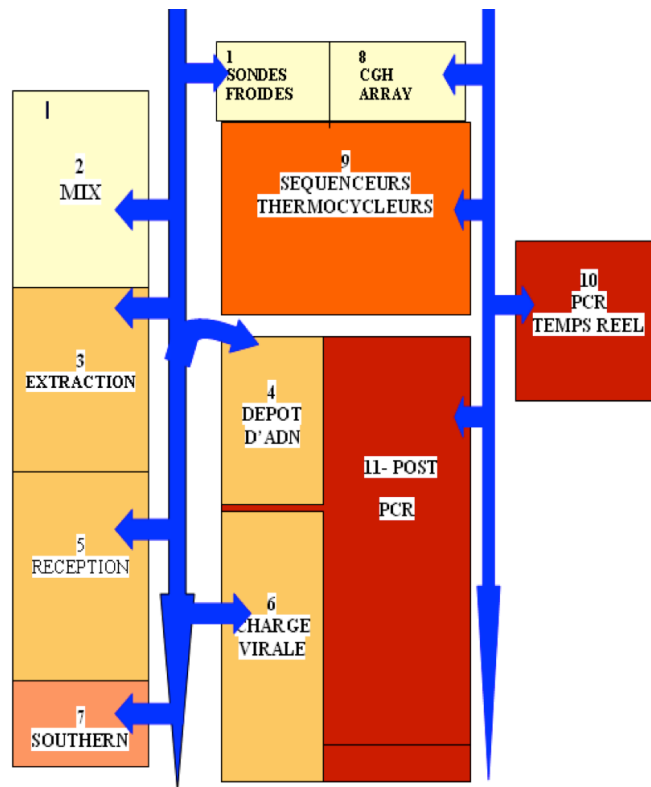
Conclusion : acceptable

Recherche d'une possible contamination lors du dépôt des éluats et du CQI dans les capillaires du LightCycler 2.0 Roche®

Test effectué	Amplification en alternance de 12 échantillons de liquide amniotique à 100 toxoplasmes/mL (positifs forts) et d'un témoin négatif puis amplification en alternance de 12 échantillons à 1 toxoplasme /mL (positifs faibles) et d'un témoin négatif
Critères d'acceptation	Absence de contamination
Résultats	Aucune contamination du témoin négatif par les échantillons positifs n'a été détectée lors du dépôt dans les capillaires

Conclusion : acceptable

La séparation des pièces de réception des prélèvements, d'extraction des acides nucléiques, de préparation des mix, de dépôts des ADN et d'amplification sur les automates de PCR en temps réel sur le PTBM permet d'assurer un sens unique de circulation des échantillons, du personnel et des déchets (figure 40) afin de maîtriser le risque de contamination.



Un circuit en sens unique !!!

figure 41 : Sens de circulation des échantillons dans le PTBM (CHU Bordeaux)

STABILITE DES REACTIFS

Données fournisseurs :

- Les réactifs lyophilisés (mix, IC) sont stables au moins 3 mois après réception s'ils sont conservés à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 18 et 25°C.
- Les réactifs lyophilisés ne doivent pas être congelés.
- Les réactifs une fois régénérés sont stables au moins 5 jours s'ils sont conservés à l'abri de la lumière et à une température de -20°C.

Tableau 15 : stabilité des réactifs

Réactifs testés	Mélange réactionnel (mix) de PCR			
ADN utilisés	- gamme de standards du kit LightMix® Kit <i>T. gondii</i> à 10 ⁸ , 10 ⁷ , 10 ⁶ , 10 ⁵ , 10 ⁴ et 10 ³ copies/mL - liquides amniotiques enrichis à 1 et 100 toxoplasmes/mL			
Méthode de calcul	Biais (%) = 100 x (moyenne délai – moyenne T0) / moyenne T0			
Critère d'acceptation	5 %			
Résultats	Conditions testées	Moyenne T0 (CT)	Moyenne délai (CT)	Biais
	1 : mix régénéré testé à T0 et à J7 après conservation d'une semaine à -20°C (liquide amniotique à 10 toxoplasmes/mL)	30,01	29,60	1,36%
	2 : mix régénéré testé à T0 et mix du même lot conservé lyophilisé pendant 2 mois à température ambiante (M2) puis régénérés (liquide amniotique à 100 toxoplasmes/mL)	26,60	27,07	1,7%
	3 : mix régénéré testé à T0 et même mix régénéré et testé après 3h à température ambiante (liquide amniotique à 1 toxoplasme/mL)	35,420	35,423	0,008%
	4 : mix régénéré testé à T0 et même mix régénéré et testé après 3h à température ambiante (liquide amniotique à 100 toxoplasmes/mL)	26,22	26,19	0,11%

Conclusion : acceptable

STABILITE DES ECHANTILLONS

Tableau 16 : stabilité des échantillons

Données bibliographiques	Absence de données bibliographiques Le CNR préconise d'analyser les liquides amniotiques dans les 72 H suivant le prélèvement, de les conserver à + 4°C dans l'attente de l'extraction de l'ADN et de ne pas les congeler avant l'extraction.
Tests de vérification	- Vérification de la stabilité d'un échantillon de liquide amniotique à 5 toxoplasmes/mL* par réalisation de la PCR à T0 et à J3 après une conservation à +4°C pendant 72 H - Vérification de la stabilité de 2 échantillons de liquide amniotique à 1 toxoplasme/mL et 100 toxoplasmes/mL par réalisation de la PCR à T0 et à J3

	après une conservation à température ambiante pendant 72 H Après extraction, chaque éluat est amplifié en triplicata dans la même série de PCR			
Méthode de calcul	Biais (%) = 100 x (moyenne délai – moyenne T0) / moyenne T0			
Critères d'acceptation	Biais acceptable si inférieur à 2%			
Résultats	Conditions	Moyenne (CT) T0	Moyenne (CT) 72H	Biais (%)
	1 : échantillon à 5 toxoplasmes/mL (+4°C, 72 H)	32,22	32,65	1,24%
	2 : échantillon à 1 toxoplasme/mL (température ambiante, 72 H)	34,16	36,14	5,7%
	3 : échantillon à 100 toxoplasmes/mL (température ambiante, 72 H)	27,76	31,13	12,1%

*les différentes concentrations sont obtenues en enrichissant un liquide amniotique négatif avec des tachyzoïtes vivants de *Toxoplasma gondii* (souche RH entretenue chez la souris OF1)

Conclusion : Un délai de 72 H avant l'extraction est acceptable à condition que le prélèvement soit conservé à +4°C.

4.2.2.3. Quantification

quantification selon la gamme TIB MOLBIOL®

La quantification de la charge parasitaire en copies d'ADN par mL dans le prélèvement est possible grâce à la mesure du CT comparée à une gamme d'étalonnage.

Par amplification des standards contenant des concentrations connues d'ADN (de 10² à 10⁶ copies/mL) et mesure des CT correspondants, une courbe d'étalonnage CT = f(copies/ml) peut ainsi être tracée.

A chaque cycle de PCR, en considérant une efficacité de PCR égale à 2, la concentration en ADN dans le milieu réactionnel est multipliée par 2.

Soient :

- C₀ la concentration en ADN à t₀
- C la concentration en ADN après n cycles de PCR
- n le nombre de cycles de PCR

$$C = C_0 \cdot 2^n$$

$$\text{Log}(C / C_0) = n \text{Log}2$$

Quand la quantité d'ADN est multipliée par 10 (1 log), on a :

$$n = \text{Log}10/\text{Log}2 = 3,3$$

Comme précisé précédemment, le CT mesuré est inversement proportionnel au logarithme décimal de la charge parasitaire. La courbe d'étalonnage $CT=f(\text{Log copies})$ correspond à une droite de pente -3,3 (en considérant une efficacité de la PCR égale à 2). La détermination du CT pour un échantillon donné permet donc de quantifier la charge parasitaire dans cet échantillon.

Un calcul simple peut alors être appliqué par le clinicien pour la quantification en toxoplasme/mL. En effet, la séquence cible de la PCR correspondant à une séquence répétée 200 à 300 fois dans le génome du toxoplasme, la **charge parasitaire moyenne en T/mL = nb copies / 250**.

quantification selon la gamme du CNR

Les valeurs de CT obtenues avec la technique de PCR TIB MOLBIOL® pour les points de la gamme de quantification du CNR sont résumées dans le tableau 17.

Tableau 17 : Résultats de la gamme de quantification du CNR

Concentrations en toxoplasmes/mL	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1	0,1
Valeurs CT CNR	16,55 +/- 0,35	19,87 +/- 0,27	23,42 +/- 0,34	26,92 +/- 0,33	30,81 +/- 0,46	33,65 +/- 0,6	36,55 +/- 2,05
Valeur moyenne* CT CHU Bordeaux	17,1	21,01	24,86	28,41	33,31	Non détecté	Non détecté

* la valeur moyenne CT correspond à la moyenne des valeurs de CT obtenues pour 5 amplifications pour chaque point de la gamme

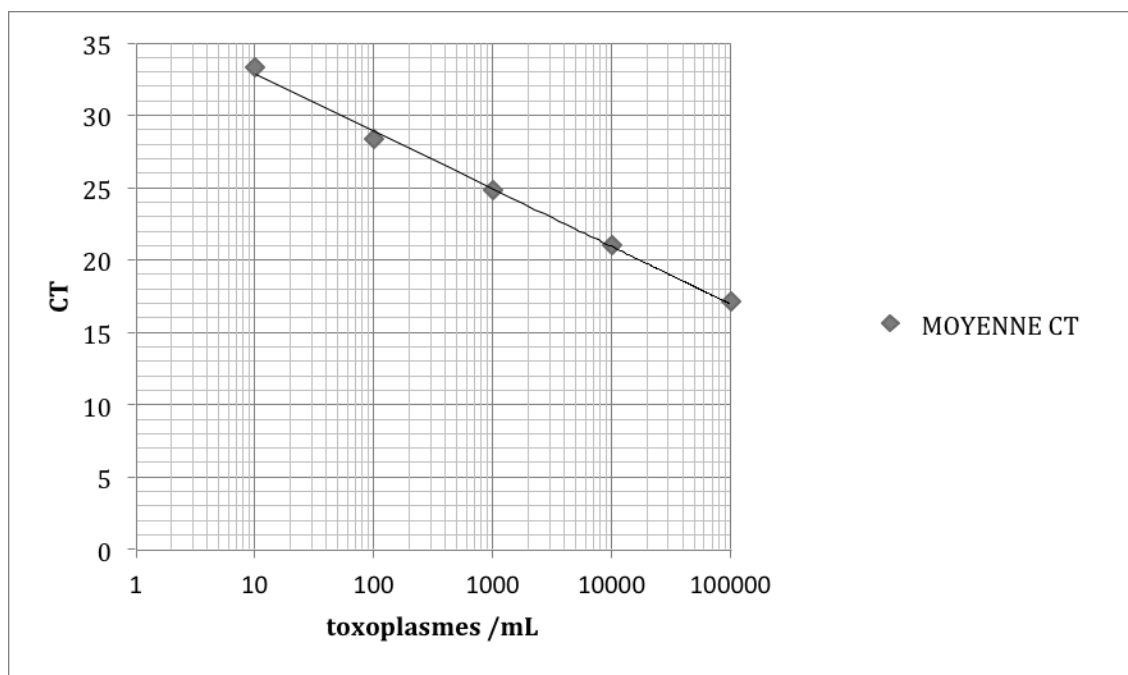


figure 42 : Droite de linéarité selon la gamme du CNR

L'ADN de *T. gondii* n'a pas été détecté pour les points de la gamme du CNR correspondants à des concentrations inférieures à 10 T/mL, bien que la limite de détection de la technique de PCR lors de sa validation ait été fixée à 1 T/mL (figure 42).

Par ailleurs, alors que 3,33 CT d'écart entre 2 points de la gamme devrait être retrouvés, la détection de l'ADN de *T. gondii* est plus tardive pour les faibles concentrations. En effet, plus les concentrations sont faibles, plus le CT sort tardivement et plus l'écart en CT entre 2 points de la gamme augmente (tableau 17).

La gamme fournie par le CNR, date de 2011 et a été stockée 2 ans à +4°C avant d'être utilisée et il se peut qu'elle se soit dégradée avec le temps.

Des ajustements sont nécessaires pour améliorer la sensibilité de la technique TIB MOLBIOL® pour les faibles concentrations afin de pouvoir utiliser la gamme de quantification du CNR pour rendre directement le résultat en toxoplasmes/mL à partir des valeurs de CT obtenues.

4.2.2.4. Conclusion sur l'aptitude de la méthode

Les résultats obtenus démontrent que la méthode de PCR utilisée en routine au laboratoire de parasitologie du CHU de Bordeaux possède des performances satisfaisantes en terme de sensibilité, de spécificité, de stabilité, de répétabilité, de reproductibilité. Les performances de quantification (limite de détection, limite de

quantification) sont également satisfaisantes même si le résultat quantitatif rendu reste encore approximatif. Cette méthode est validée pour la détection de l'ADN de *T. gondii* dans le LA.

4.3. Constitution et dépôt du dossier de demande d'autorisation d'activités de DPN de la toxoplasmose congénitale auprès de l'ARS

4.3.1. Constitution du dossier

La pratique du diagnostic prénatal est réglementée par le code de la santé publique, modifié par la Loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (articles L2131-1 à 5, L2161-1 à 2, R2131-1 à 9).

« Le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales, y compris l'échographie obstétricale et fœtale, ayant pour but de détecter in vitro chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité. » L2131-1

« Les examens de biologie médicale destinés à établir un diagnostic prénatal sont pratiqués dans des laboratoires de biologie médicale faisant appel à des praticiens en mesure de prouver leur compétences, autorisés [...] et accrédités [...]. » L2131-1

« Le fait de procéder au diagnostic prénatal sans avoir reçu l'autorisation mentionnée à l'article L2131-1 du code de la santé publique est puni de deux ans d'emprisonnement et de 30 000 euros d'amende » L2161-1

L'autorisation est délivrée par l'ARS pour une durée de 5ans, renouvelable. Pour obtenir cette autorisation, un dossier est constitué et doit comporter :

- ✓ Activité prévisionnelle (L2131-2),
- ✓ Infrastructure du laboratoire, avec équipement et matériel,
- ✓ Système informatique et sécurité des données,
- ✓ Système de gestion de la qualité,
- ✓ Liste des praticiens affectés au DPN (R2131-4),

- ✓ Personnel technique habilité,
- ✓ Prise en charge du prélèvement,
- ✓ Technique de PCR utilisée,
- ✓ Validation et rendu des résultats,
- ✓ Conservation des échantillons et archivage des dossiers,
- ✓ Modalités d'information des patientes et de suivi de la grossesse.

4.3.1.1. *Activité prévisionnelle (L3131-2)*

Il s'agit d'une première demande d'autorisation en vue de pratiquer au CHU de Bordeaux le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale. Le nombre d'actes prévisionnels annuels a été évalué à une cinquantaine de cas. Actuellement, 4 établissements sont intéressés par la mise en place de ce diagnostic : le CHU de Bordeaux, la maternité de l'hôpital Bagatelle ainsi que les CHRs de Bayonne et de Marmande. Les établissements extérieurs attendent que le laboratoire de Parasitologie obtienne l'autorisation pour formaliser les conventions.

4.3.1.2. *Infrastructure du laboratoire, équipement et matériel affectés à l'activité DPN*

Au CHU de Bordeaux, pour les différentes disciplines de biologie médicale, l'outil diagnostique de biologie moléculaire est mutualisé au sein d'un même plateau technique. De ce fait, les pièces de réception des prélèvements, d'extraction, de préparation des mix, de dépôts des ADN et de PCR en temps réel sont utilisées par toutes les disciplines. Le laboratoire doit être organisé, conformément au GBEA, en 3 zones distinctes, avec un matériel dédié à chaque zone et un sens de circulation monodirectionnelle :

- Zone d'extraction des acides nucléiques,
- Zone pré-PCR (pièce des Mix),
- Zone post-PCR (analyse des produits de PCR).

Plusieurs documents étaient demandés par l'ARS :

- Plans cotés des locaux dans lesquels sont réalisées l'activité, décrivant notamment la surface totale du laboratoire, les différentes pièces ou zones

affectées au DPN, l'usage des différentes pièces et la localisation de l'équipement et du gros matériel et la présentation des flux des prélèvements, du personnel, du matériel et consommables et des circuits d'élimination des déchets.

- Un document décrivant l'équipement et le matériel utilisés et leur maintenance,
- Un document relatif à l'entretien et la sécurité des locaux.

4.3.1.1. Le système informatique du laboratoire (SIL)

L'accès SIL Synergy est soumis à des accès contrôlés. Il existe des documents qualité informatiques, formalisés et validés décrivant l'accès aux logiciels :

IN-INF-033 - synergie - se connecter au logiciel,

IN-INF-059 – synergie - paramétrage des rôles et propriétés utilisateurs,

IN-INF-060 - synergie - paramétrage des utilisateurs

Le circuit des compte-rendus papier est sécurisé et dédié au diagnostic prénatal. Le biologiste du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie en charge de l'activité DPN valide, réalise une édition papier et adresse sous enveloppe le compte-rendu signé au prescripteur.

La politique générale de sauvegarde du système d'information du CHU de Bordeaux est disponible sur le site SHAREPOINT de la DSI : document EN-INF-241.

La base de données Synergy est sauvegardée quotidiennement, et une copie sécurisée est disponible sur le disque réseau.

4.3.1.2. Le système de management de la qualité

Un système de management de la qualité a été mis en place au CHU de Bordeaux. Le manuel qualité du Pôle Biologie et Pathologie du CHU (MQ-MAN-100), décrivant la gestion de la qualité formalisée et validée, a été joint au dossier de demande. La réactovigilance est gérée par le correspondant de réactovigilance, le Dr E Chauzit, en collaboration avec la coordination des vigilances du CHU, selon la procédure PR-VIG-101 pour les alertes descendantes de l'Ansm. Les signalements sont effectués via le logiciel Kaliweb accessible depuis le portail intranet du CHU, qui permet aussi de suivre leur traitement.

L'activité de diagnostic prénatal est considérée comme un secteur pilote par le laboratoire de parasitologie.

C'est dans le cadre de cette demande d'autorisation d'activités de diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale que nous avons réalisé, pour la technique de PCR en temps réel utilisant le kit commercial TIB MOLBIOL, une validation de méthode de portée B selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2012, sur les prélèvements de liquide amniotique. Il s'agit de la première validation de méthode nécessaire à l'entrée dans la démarche d'accréditation.

Des améliorations constantes seront proposées, développées et évaluées. Pour cela, il est indispensable de mettre en place des éléments de suivi de validation continue, afin de repérer des dérives et des tendances.

Sont prévus :

1) Suivi de l'IC et des standards de la gamme de quantification

2) EEQ

Chaque année, 2 à 3 séries d'EEQ sont analysées « en aveugle » comme des échantillons patients. Le laboratoire évalue ainsi la justesse de ses résultats en se comparant à ses pairs.

3) Suivi des indicateurs qualité

Deux indicateurs qualité seront suivis afin de détecter des tendances dans l'efficacité du processus diagnostique :

- Les délais de rendu des résultats,
- Les non conformités : pré-analytiques, analytiques et post-analytiques (non conformité de l'échantillon primaire, échec de la PCR objectivé par la négativité du contrôle interne, suivi des réactifs, non conformités dans le rendu du résultat au prescripteur...)

En fonction des résultats, des actions correctives et préventives pourront être mises en place.

4.3.1.3. Praticiens en charge de l'activité du DPN

Compte tenu de la suppression récente du régime d'agrément individuel des praticiens, les biologistes n'ont plus à justifier de la pratique du diagnostic prénatal, d'une durée de 6 mois, dans un laboratoire autorisé. Désormais, l'autorisation est délivrée par le

directeur général de l'ARS pour l'établissement qui pratique cette activité pour une durée de 5 ans.

La recherche d'ADN de *T. gondii* par PCR est réalisée par le laboratoire de parasitologie depuis 1997 ; les biologistes bénéficient d'une expertise suffisante pour réaliser ce type d'analyse sur du liquide amniotique.

4.3.1.4. Personnel du laboratoire affecté à l'activité du DPN

Le personnel technique affecté à l'activité du DPN devra être habilité : 9 techniciens de parasitologie peuvent assurer le pré-analytique et 5 techniciens du PTBM peuvent prendre en charge la partie analytique. Chaque technicien doit être habilité pour son secteur d'affectation.

4.3.1.5. Prise en charge de l'échantillon de liquide amniotique au laboratoire

Le circuit d'un échantillon de liquide amniotique depuis l'enregistrement du prélèvement à l'ABC jusqu'au rendu de résultat par le biologiste est détaillé dans la figure 43.

Une note d'information disponible sur le portail du CHU dans le catalogue des actes du laboratoire de Parasitologie-Mycologie a été écrite pour rappeler les conditions de prélèvement et d'acheminement des échantillons de liquide amniotique au laboratoire (IN-LAB-3000, annexe 2).

L'échantillon est d'abord réceptionné et enregistré par le personnel de l'ABC (centre d'enregistrement) puis adressé au laboratoire de parasitologie.

A l'arrivée du prélèvement au laboratoire, le biologiste vérifie la conformité du prélèvement. Il vérifie en particulier que l'attestation de consultation du médecin prescripteur, la fiche de consentement de la patiente (EN-LAB-3006) et la fiche de demande de renseignements (EN-LAB-3001, annexe 3) également disponibles sur le portail du CHU sont bien joints au prélèvement. C'est la condition pour que l'analyse soit réalisée par le laboratoire.

Si le prélèvement est conforme (EN-LAB-3002), le biologiste renvoie un accusé de réception signé (EN-LAB-3001) au médecin prescripteur. S'il n'est pas conforme, une fiche de non conformité est créée afin de signaler le problème rencontré. Le prélèvement est ensuite pris en charge par une technicienne habilitée de parasitologie pour être prétraité (centrifugation). Il est stocké à +4°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

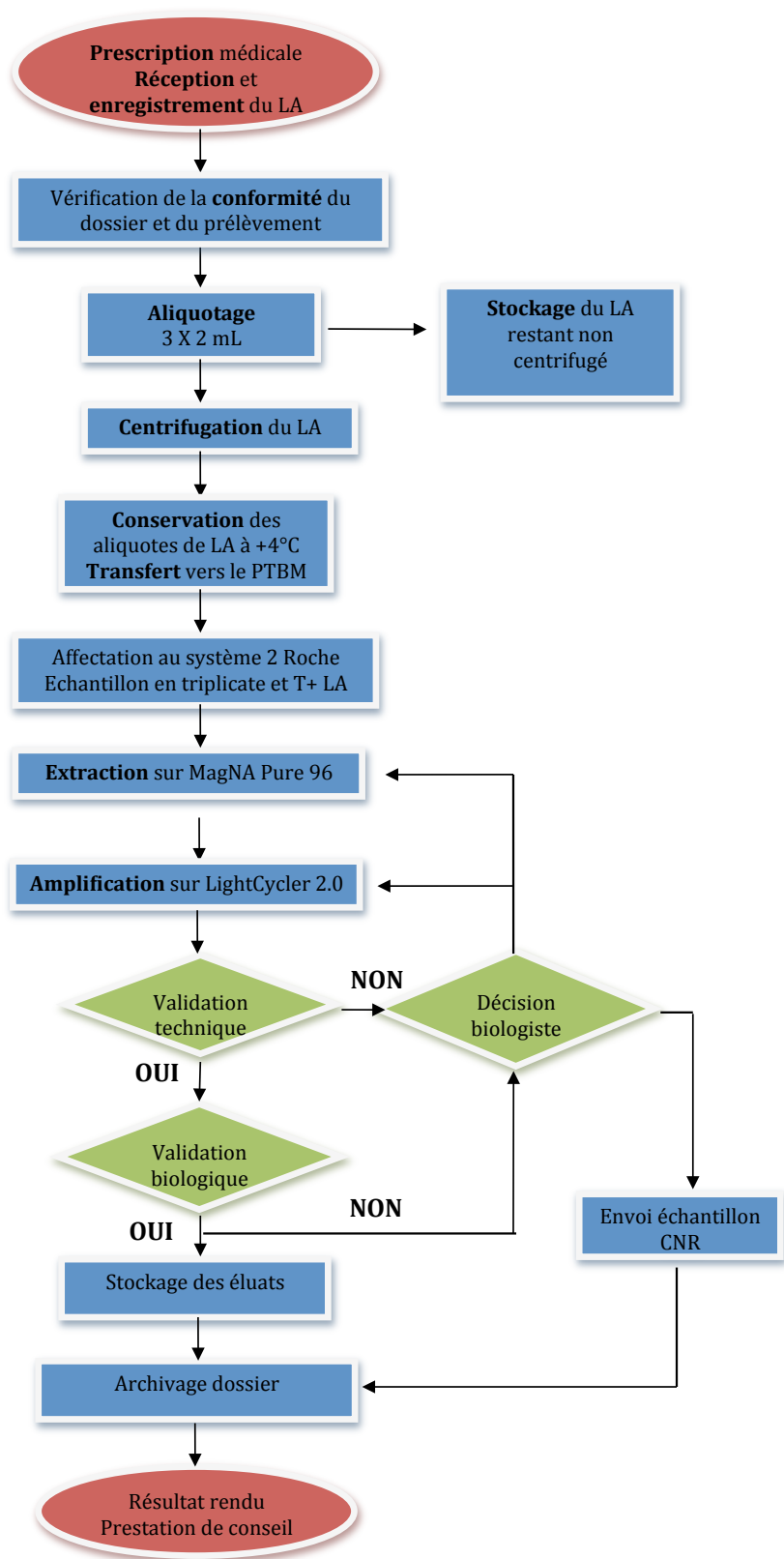


figure 43 : Logigramme de la prise en charge analytique d'un liquide amniotique au laboratoire

4.3.1.6. Technique de PCR

Le prélèvement est transféré sur le PTBM pour la réalisation de la PCR.

Des documents d'assurance qualité (procédures et modes opératoires) ont été rédigés.

Ils complètent le dossier de demande d'autorisation et concernent :

- Procédure de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose congénitale par PCR en temps réel sur liquide amniotique (PR-LAB-3000),
- Lancement d'un run d'extraction sur MP96 (MO-LAB-016),
- Mode opératoire de la PCR *T. gondii* sur le système 2 Roche (MO-LAB-3000),
- Gestion du CQI PCR *T. gondii* (IN-LAB-3004),
- Préparation du Mix TIB système 2 Roche (IN-LAB-069),
- Gamme TIB système 2 Roche (IN-LAB-085),
- Réalisation d'une compensation de couleur TIB système 2 Roche (IN-LAB-179),
- Dispositions particulières de la phase analytique (IN-LAB-3006),
- Recommandations pour la validation biologique DPN *T. gondii* sur LA (IN-LAB-3002),
- Phase post-analytique (IN-LAB-3003),
- Rapport de validation PCR *T. gondii* sur LA (EN-LAB-001).

4.3.1.7. Rendu des résultats

Les résultats du diagnostic prénatal avec la conclusion rédigée du biologiste seront transmis au médecin prescripteur par voie informatique, à partir du logiciel des laboratoires (Synergy) vers le logiciel du dossier patient (DxCare) et sous forme d'un compte rendu papier signé.

Pour les demandes extérieures, le compte rendu signé sera envoyé par courrier postal au prescripteur et au laboratoire transmetteur.

Une fiche de suivi de grossesse sera adressée avec le compte rendu papier. Celle-ci devra être complétée et renvoyée au biologiste en charge du diagnostic prénatal afin de connaître l'issue de chaque grossesse. Le laboratoire est tenu de fournir à l'ARS un rapport d'activité annuel.

4.3.1.8. Archivage

Pour chaque prescription de diagnostic prénatal de toxoplasmose congénitale, un dossier regroupant l'ensemble des documents (bon de prescription, consentement de la patiente, fiche d'information remplie, rapport technique de PCR, compte rendu de résultat) sera créé et archivé dans le bureau du biologiste référent.

4.3.1.9. Suivi des enfants

Dans le cadre du DPN, avant l'accouchement, le laboratoire enverra un courrier à la mère, soulignant l'importance du suivi de l'enfant dès la naissance (EN-LAB-3008, annexe 5). Il lui sera demandé de communiquer le nom du pédiatre en charge de la surveillance de l'enfant.

L'envoi d'une lettre de relance au médecin prescripteur (EN-LAB-3009, annexe 6) s'avérera peut être nécessaire pour obtenir les informations sur l'enfant après la naissance en particulier si le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale est négatif.

Le diagnostic néonatal de la toxoplasmose congénitale, basé sur la détection du parasite dans le sang de cordon par PCR et le diagnostic sérologique pourra être réalisé par le laboratoire de parasitologie.

Le suivi sérologique de l'enfant pendant la première de vie, afin de confirmer ou d'infirmer le diagnostic de l'infection fœtale est déjà assuré par le laboratoire en lien avec le pédiatre référent en toxoplasmose au CHU (Dr Castella) ou le pédiatre assurant le suivi de l'enfant ayant fait l'objet d'un DPN pour les demandes extérieures.

4.3.2. Dépôt du dossier

Le dossier de demande d'autorisation pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale au CHU de Bordeaux ainsi constitué a été déposé auprès de l'Agence Régionale de Santé le 30 avril 2014.

5. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La loi 2013-442 du 30 mai 2013 rend obligatoire l'accréditation de 50 % des examens de biologie médicale au 1^{er} Novembre 2016, 70% au 1^{er} Novembre 2018, et 100% au 1^{er} Novembre 2020. Au 1^{er} Novembre 2013, les laboratoires de Biologie médicale ont dû prouver au Cofrac leur entrée dans la démarche d'accréditation en leur soumettant 3 validations de méthodes.

La validation, dans ce travail de thèse, d'une technique de PCR pour la détection d'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique constitue la première des 3 soumises par le laboratoire de Parasitologie du CHU de Bordeaux au Cofrac.

Des progrès considérables en matière de diagnostic parasitologique de la toxoplasmose ont été faits grâce à la PCR. Ses applications concernent le diagnostic anténatal et néonatal de la toxoplasmose congénitale et le diagnostic de la toxoplasmose chez les patients immunodéprimés. Néanmoins ce diagnostic moléculaire est encore très dépendant de la technique utilisée, souvent propre à chaque laboratoire et souffre d'un manque de standardisation. Cela se traduit par de grandes différences en terme de performances entre les centres. Le souhait commun des autorités de santé et des parasitologues est une plus grande homogénéisation des techniques et des pratiques. L'accréditation prochaine des laboratoires d'analyses avec sa politique qualité, donne du poids à cette requête et le recours à l'utilisation de kits commerciaux apparaît comme une alternative attractive pour la standardisation.

Différents couples d'amorces et de sondes ont été décrits dans la littérature pour détecter l'ADN de *T. gondii*. Les couples sondes/amorces utilisés ont d'abord ciblé le **gène P30** (105), gène d'une seule copie codant pour un antigène de surface de *T. gondii*. En 1989, le **gène B1**, répété 35 fois, a été découvert et utilisé comme cible (6) (106). Le gène codant pour la sous unité 18S de l'ADN ribosomal, répété 110 fois, a également fait l'objet de plusieurs études (107). En 2000, l'équipe d'Homans et al a découvert la **séquence REP 529** (séquence AF146527), répétée 200 à 300 fois (98). Plusieurs études ont montré qu'elle pouvait être utilisée à des fins diagnostiques et de suivi thérapeutique (97) (108).

La grande majorité des laboratoires français autorisés à pratiquer le diagnostic prénatal utilisent comme cible la séquence REP 529, seuls 2 laboratoires utilisent encore le gène B1 et 1 laboratoire, l'ARN ribosomal.

Plusieurs études réalisées à partir de liquides amniotiques artificiellement infectés (109)(110)(108)(111) ou provenant de femmes enceintes ayant fait une séroconversion (112) ont montré, que le seuil de détection était significativement plus sensible en prenant comme cible la séquence REP 529 versus le gène B1. Une étude n'a pas mis en évidence de différence entre les deux cibles (111). Cependant, seulement 8 échantillons de liquides amniotiques de fœtus atteints de toxoplasmose congénitale avaient été analysés.

Delhaes et al ont évalué les performances de 3 techniques de PCR en temps réel sur 73 échantillons provenant de mère et d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale (LA, sang de cordon). La sensibilité de la PCR est significativement plus élevée pour les prélèvements réalisés en période prénatale que pour ceux prélevés à la naissance, avec la séquence REP 529 (81% versus 36%) ou le gène B1 (64,6% versus 20%) utilisés comme cible (112).

Wahab et al ont également évalué 3 techniques de PCR en temps réel (2 ciblant le gène B1 et une la séquence REP 529) pour détecter l'ADN de *T. gondii* dans des échantillons de sang total provenant de patients HIV positifs d'Afrique de l'Est. La technique ciblant la séquence REP 529 n'a pas permis de détecter l'ADN parasitaire dans 3/63 prélèvements testés. Celles ciblant le gène B1 étaient positives pour 100% des prélèvements (113).

L'impossibilité de cloner et de séquencer la séquence REP 529 dans les 3 échantillons par les méthodes habituellement décrites suggère qu'il existe des souches de *T. gondii* chez lesquelles la totalité ou une partie de la séquence est mutée ou déletée, ou chez lesquelles le nombre de copies de la séquence varie.

Le développement de la PCR en temps réel, simple d'utilisation et rapide a facilité la recherche d'ADN de *T. gondii* par biologie moléculaire et favorisé son implantation sur de nombreux plateaux techniques. Cet engouement a suscité l'intérêt des fournisseurs qui ont développé et mis sur le marché des kits commerciaux. Ils ciblent le gène B1 ou la séquence REP 529. En France, ceux ciblant la séquence REP 529 sont les plus largement utilisés du fait de leur plus grande sensibilité (114).

Les principaux fournisseurs de kits commerciaux actuellement sur le marché sont :

- ✓ BioEvolution®
- ✓ TIB MOLBIOL®
- ✓ Liferiver™
- ✓ ELITechGroup

En 2014, sur les 26 laboratoires français qui participent au CNQ PCR-*Toxoplasma* organisé par le CNR, 19 utilisent des techniques de PCR « maison » et 7 des kits commerciaux dont 6 le kit BioEvolution®. Nous sommes les seuls au CHU de Bordeaux à utiliser le kit TIB MOLBIOL® depuis 2012 et à l'avoir validé pour le DPN de la toxoplasmose congénitale.

Les trousse commerciales ne présentent pas toutes des performances supérieures à celles des techniques dites « maison » et souvent leur valeur diagnostique n'a pas été suffisamment éprouvée. Une étude publiée en 2012 comparant une technique de PCR commerciale à 2 techniques « maison » (1 conventionnelle, 1 en temps réel) pour la détection de l'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique a montré que le principal inconvénient de la trousse commerciale était son manque de sensibilité en partie lié à la présence d'inhibiteurs. Sur les 12 cas de toxoplasmose congénitale prouvée, 92% ont été diagnostiqués avec les 2 techniques de PCR « maison » et seulement 50% avec le kit commercial (101).

Une des missions du pôle de biologie moléculaire du CNR de la toxoplasmose est d'inventorier les nouvelles trousse diagnostiques commerciales mises sur le marché et d'évaluer leurs performances par rapport aux méthodes de références afin de pouvoir donner un avis expert aux différents laboratoires pratiquant ce diagnostic.

Pour l'instant le CNR évalue le kit BioEvolution® actuellement le plus utilisé dans le cadre du diagnostic anténatal. Une étude multicentrique est en cours et les premiers résultats montrent de bonnes performances analytiques mais des problèmes de fiabilité dans la production (52).

Ce kit présente les caractéristiques suivantes :

- détection qualitative ou quantitative de l'ADN parasite pour tout type d'échantillon humain,

- présence d'un contrôle interne,
- certification CE autorisant sa vente pour un usage clinique dans l'Union européenne et les pays reconnaissant la certification CE,
- Coût : 10€ par test.

Le kit TIB MOLBIOL® n'a pas de marquage CE et son coût de revient est compris entre 6 et 8€ par test. Ses bonnes performances analytiques nous ont permis de le valider pour la détection qualitative et quantitative de l'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique.

Il est essentiel de minimiser le risque de faux négatifs en PCR en temps réel. Ils peuvent résulter d'un problème d'extraction de l'ADN ou être liés à un défaut de sensibilité de la technique ou à la présence d'inhibiteurs.

L'extraction est une étape limitante dans la détection de l'ADN parasitaire. Ces dernières années, de nombreux systèmes d'extraction ont été développés. Leur efficacité est variable. L'objectif de l'étude de Yera et al (115) était d'évaluer la pertinence de ces méthodes pour isoler *T. gondii* du liquide amniotique. Trois procédures automatisées ont été comparées à deux méthodes d'extraction manuelle commercialisées. L'évaluation a été réalisée avec 2 PCR spécifiques de *T. gondii* ciblant la séquence REP 529. Les échantillons étaient constitués de 4 mL de liquide amniotique artificiellement infectés par une souche RH de *T. gondii* à des concentrations de 0, 1, 2,5, 5 et 25 toxoplasmes/mL. Les procédés automatisés et manuels sont similaires en terme de sensibilité d'extraction d'ADN de *T. gondii* pour la concentration la plus élevée à 25 toxoplasmes/mL. L'efficacité est très variable d'une technique à l'autre pour les faibles concentrations (< 5 toxoplasmes/mL), ce qui peut avoir des conséquences non négligeables car en cas de toxoplasmose congénitale, la concentration en tachyzoïtes dans le liquide amniotique peut être très faible. Dans cette étude, à ces faibles concentrations, le MagNA Pure 96® et le BioRobot EZI associés à la technologie FRET étaient significativement les plus performants.

Un des inconvénients de notre PCR *T. gondii* est l'absence de témoin d'extraction. En effet le contrôle interne (IC) fourni avec le kit est ajouté après l'extraction de l'ADN et le le CQI « maison » utilisé est un lyophilisat d'ADN purifié de *T. gondii* (AmpliRun® Toxoplasma gondii DNA Control) dilué dans un liquide amniotique négatif. Pour

sécuriser cette étape critique, nous avons donc décidé de réaliser pour chaque échantillon 3 extractions dans la même série.

L'amplification des extraits est ensuite réalisée sur l'automate LightCycler 2.0 Roche®. En 2006, une étude multicentrique a été organisée pour évaluer les performances des techniques d'amplification pour la détection de l'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique. 5 échantillons lyophilisés d'un liquide amniotique artificiellement infecté avec une souche RH à des concentrations variant de 5 à 1000 parasites/mL, un contrôle négatif ainsi qu'un questionnaire sur la méthode appliquée ont été envoyés à 33 laboratoires de 17 pays (116). Dans cette étude, le LightCycler 2.0 Roche® donnait les meilleurs résultats pour les faibles concentrations de parasites (5 et 10 T/mL) par rapport à d'autres automates de PCR en temps réel (ABI PRISM, Ix Biorad...) ou des techniques de PCR conventionnelle.

En l'absence de recommandations internationales, le CNR a fixé le seuil de sensibilité de la PCR *T. gondii* pour la détection dans le liquide amniotique à 0,5 toxoplasme par prise d'essai, ce qui correspond à des concentrations comprise entre 0,75 à 2,5 toxoplasmes /mL de liquide amniotique.

Les différentes trousse commerciales actuellement sur le marché n'offrent pas toutes des seuils de sensibilité aussi bas. La plupart d'entre elles manquent de sensibilité pour les faibles concentrations, inférieures à 10 T/mL de liquide amniotique.

Dans leur étude visant à comparer la technique de PCR commerciale BioEvolution® à 2 techniques « maison » (1 conventionnelle, 1 en temps réel), Morelle et al ont déterminé le seuil de sensibilité analytique de chaque méthode, à l'aide d'une gamme de dilution d'un échantillon d'ADN calibré commercialisé. Pour chaque concentration testée (correspondant à 50, 20, 10, 5, 2 et 1 tachyzoïtes/mL), la réaction de PCR a été répétée 4 fois, en partant du principe que lorsque la limite de détection d'une technique est atteinte, toutes les réactions ne sont pas positives. Le seuil de sensibilité a ainsi été défini comme étant la plus faible concentration détectée dans au moins la moitié des tubes de PCR (2 réactions positives sur les 4 réalisées). Pour le kit commercial BioEvolution® le seuil analytique de sensibilité a été estimé à 5 tachyzoïtes /mL de liquide amniotique et à < 1 tachyzoïte/mL pour les 2 techniques maison.(101).

La validation de la technique TIB MOLBIOL réalisée dans ce travail de thèse, a permis d'établir son seuil de sensibilité à 1 toxoplasme/mL, Il est donc conforme au seuil recommandé par le CNR et à priori, 5 fois inférieur à celui de la technique BioEvolution®. Comme nous l'avons vu le choix de la cible de la méthode de PCR est essentiel puisqu'il conditionne la sensibilité de la méthode. Dans une étude récemment publiée, Costa et al. (117) ont déterminé le nombre de copies du gène B1 et celui de la séquence REP 529 des 3 principaux génotypes de *T. gondii*, en utilisant le gène à copie unique P30 comme référence. Ce travail a établi que les nombres de copies de ces gènes étaient différents entre les génotypes et qu'ils étaient largement surestimés. On peut citer à titre d'exemple que le génotype II ne possède que 3 copies du gène B1 au lieu des 35 copies initialement décrites (6). Fort de ce constat, le rapport entre le nombre de copies de la séquence REP 529 et celui du gène B1 estimé à 10 pour les 3 génotypes devient un paramètre très variable selon le génotype considéré. En effet, grâce aux travaux de Costa et al., il est établi aujourd'hui que ce rapport est de 4 pour le génotype I, de 13,5 pour le génotype III et de 22,5 pour le génotype II. Le génotype II représentant plus de 90% des souches de *T. gondii*, isolées en France, les performances des PCR quantitative en temps réel ont été plus aisément améliorées par rapport à d'autres pays.

Pour déterminer le seuil de sensibilité de la technique TIB MOLBIOL, nous avons utilisé un échantillon de liquide amniotique négatif artificiellement infecté avec des tachyzoïtes de la souche RH de *T. gondii* de génotype I. D'après les données de Costa et al., nous avons probablement sous estimé le seuil de sensibilité (établi à 1 tachyzoïte /mL,) ce qui explique en partie les bonnes performances de la technique en pratique clinique.

Un autre moyen pour améliorer la sensibilité analytique est d'augmenter le volume de liquide amniotique analysé, qui varie, d'après les données de la littérature de 1 à 15 mL. Comme nous ne disposons pas de liquide amniotique en grande quantité, nous avons choisi de valider la technique pour un volume de 6 mL, soit 2 mL par prise d'essai. Dans le cadre de l'amélioration continue des performances de la technique, nous évaluerons l'intérêt d'analyser un plus grand volume 4, 6 voire 8 mL par prise d'essai.

Le liquide amniotique peut contenir des inhibiteurs de PCR, qui seront à l'origine de faux négatifs. De fortes concentrations d'ADN humains présentes dans l'échantillon par l'intermédiaire des cellules épithéliales ou des leucocytes diminuent la sensibilité de détection de l'agent infectieux par PCR en temps réel (118).

A l'inverse, une matrice pauvre en cellules ne subira pas l'effet « portage d'ADN » au moment de l'extraction améliorant ainsi le rendement de la PCR en temps réel.

En pratique, le liquide amniotique est un liquide biologique peu cellulaire et peu sujet à des problèmes d'inhibition. Dans notre protocole, l'analyse du contrôle interne (IC) permet de détecter la présence d'inhibiteurs.

Les faux négatifs « biologiques » du diagnostic prénatal sont liés à un passage retardé du parasite au fœtus, qui n'est donc pas contaminé à la date de l'amniocentèse.

Un diagnostic prénatal négatif ne permet pas d'exclure l'infection congénitale ce qui rend obligatoire les diagnostics néonatal et postnatal pour confirmer ou exclure l'infection.

Dans le cadre du diagnostic néonatal, un prélèvement encore assez peu exploré est le liquide amniotique prélevé au cours de l'accouchement. Une étude est actuellement en cours par le CNR pour évaluer sa sensibilité (1).

De même, dans une cohorte de 12 nouveau-nés, la détection d'ADN de *T. gondii* par PCR dans le sang du nouveau-né a permis d'établir le diagnostic de toxoplasmose congénitale chez 5 des 6 enfants infectés durant le premier trimestre de grossesse. La PCR sur le sang du nouveau-né apparaît comme une méthode sensible, rapide et peu coûteuse pour affirmer le diagnostic de l'infection congénitale non diagnostiquée en période prénatale. (119).

Le risque de faux positif analytique est lié à la contamination des échantillons avant l'étape d'extraction, ou de l'extrait lors de la réalisation de la plaque de PCR. Il est essentiel de maîtriser les sources de contamination au sein du laboratoire. Une des principales sources de contamination au laboratoire de parasitologie provient d'une technique sérologique, le test de lyse, qui nécessite pour sa réalisation des toxoplasmes vivants. Au cours de l'année 2013, nous avons décelé deux faux positifs, l'un provenant de la contamination d'un LCR de nouveau-né, l'autre de celle d'un contrôle de qualité sur du plasma. Dans les deux situations, la charge parasitaire détectée était très faible, de l'ordre de 1 à 2 toxoplasmes/mL. Afin de pallier à ce problème, un témoin négatif est disposé dans chaque série de PCR et tous les prélèvements précieux (LCR, liquide amniotique, LBA) sont analysés en triplicata. Nous avons également renforcé les mesures de nettoyage, identifié et désinfecté toutes les sources de contamination éventuelles. Une évaluation des procédures de bionettoyage a été réalisée dans un

second temps par écouvillonnage des sources de contamination puis réalisation d'une PCR directement à partir des écouvillons sans extraction préalable.

La deuxième source majeure de contamination est la présence de produits d'amplifications antérieures dans le milieu environnant, ce qui impose une organisation adéquate du laboratoire avec un cloisonnement des locaux en zone pré et post PCR. Ce risque peut être également maîtrisé par une décontamination préalable par une enzyme (l'uracyl-N-glycosylase), capable de détruire d'éventuels amplicons contaminants tout en conservant l'ADN natif-cible. En 2014, sur les 26 laboratoires français qui participent au CNQ PCR-*Toxoplasma*, seulement la moitié d'entre eux emploient cette enzyme. Le coût supplémentaire engendré explique en partie pourquoi les laboratoires ne l'utilisent pas plus.

L'intérêt de la PCR quantitative en temps réel pour la toxoplasmose est de pouvoir quantifier la charge parasitaire. Plusieurs études ont déjà montré chez les patients immunodéprimés une corrélation entre la charge parasitaire et la sévérité de la toxoplasmose cérébrale ou l'évolution clinique sous traitement dans le contexte de toxoplasmose disséminée (120) (121).

Dans le cas de la toxoplasmose congénitale, les résultats sont moins nets Une étude est actuellement menée par le Pôle de biologie moléculaire du CNR.

Dans leur étude réalisée en 2001, Costa et al (122) ont montré une tendance à la corrélation entre la charge parasitaire et l'existence d'anomalies échographiques traduisant les lésions fœtales. 87 liquides amniotiques ont été analysés. Les 2/3 des liquides amniotiques présentant une charge parasitaire supérieure à 100 toxoplasmes/mL étaient associés à des anomalies échographiques. Aucun des liquides amniotiques provenant de patientes ayant fait une séroconversion au 3^{ème} trimestre, n'avait une charge parasitaire supérieure à 100 toxoplasmes/mL, et aucune anomalie échographique n'a été mise en évidence.

Dans l'étude de Romand et al., (123) une corrélation a été démontrée entre la concentration en tachyzoïtes dans le liquide amniotique et l'âge gestationnel lors de la séroconversion maternelle, les concentrations les plus élevées étant observées pour les séroconversions survenues avant la 20^{ème} SA.

L'un des objectifs principal du CNR (pôle de biologie moléculaire) est la standardisation de la quantification. Seulement 12 laboratoires sur les 20 ayant participé au CNQ

national en 2013 ont rendu une quantification absolue assez précise. Pour obtenir une quantification correcte et homogène dans chaque centre pratiquant le DPN, le CNR les incitent à réaliser la quantification à l'aide de la gamme de quantification fournie par le laboratoire de Montpellier et disponible sur demande.

La standardisation de la quantification inter-centre est nécessaire pour confirmer s'il existe un lien entre la gravité des lésions fœtales et la charge parasitaire dans le liquide amniotique et souligner ainsi l'intérêt de la quantification par PCR, comme marqueur pronostique de l'infection fœtale.

Une nouvelle méthode moléculaire d'amplification isothermale appelée LAMP pour « loop-médiated isothermal amplification » (ou technique d'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle) a récemment été développée. La technique LAMP, simple d'utilisation, permet d'amplifier la séquence d'ADN cible avec une haute spécificité et sensibilité, dans des conditions isothermales et en 50 minutes. C'est une méthode alternative à la PCR (124). La technique LAMP a été appliquée avec succès pour le diagnostic de la toxoplasmose chez des cochons et des moutons à partir d'échantillons sanguins même si la technique de PCR en temps réel utilisée en comparaison restait plus sensible (125). La première étude rapportant son utilisation pour le diagnostic chez l'homme a été publiée en 2014. Dans cette étude, Fallahi et al., (126) ont comparé la technologie LAMP à une méthode de PCR emboîtée (ou nested-PCR), en utilisant comme cible le gène B1 et la séquence REP 529, pour la détection de l'ADN de *T.gondii* dans des échantillons de sang provenant d'enfants immunodéprimés atteints de leucémie. 110 échantillons sanguins ont été analysés avec les 2 techniques. Sur les 50 prélèvements sanguins séropositifs (IgG+ et IgM+), 92% et 86% étaient positifs avec la technique LAMP ciblant respectivement la séquence REP 529 ou le gène B1 et 82% et 68% avec la PCR emboîtée. Aucun des 10 échantillons sanguins (IgM-, IgG+) n'étaient positifs quelle soit la technique utilisée. Le CNR a évalué les performances de la trousse Iam Toxoplasmosis Q-lamp DiaSorin sur des liquides amniotiques de patientes infectées et des liquides amniotiques infectés artificiellement en la comparant à la PCR en temps réel utilisée dans le laboratoire de Parasitologie de Montpellier. Les deux méthodes ont donné des résultats hautement comparables (données non encore publiées).

La diminution avérée de la séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes en âge de procréer se traduit par une augmentation significative du nombre de tests sérologiques à effectuer dans le cadre du suivi mensuel des femmes enceintes séronégatives.

La persistance d'incertitudes concernant notamment l'efficacité des interventions préventives et thérapeutiques dans le cadre de la prise en charge de la toxoplasmose au cours de la grossesse ne permet pas de déterminer avec un niveau de certitude suffisant le rapport bénéfice/risque du dépistage prénatal de la toxoplasmose et les modalités les plus adaptées d'un tel programme.

Une étude coût/bénéfice du dépistage de la toxoplasmose congénitale va être menée par le CNR et L'InVS selon le modèle de E. Stillwagon développé pour les Etats-Unis (127). C'est un modèle de décision analytique et de minimisation des coûts construit pour comparer le dépistage sérologique mensuel des femmes enceintes, le traitement prénatal, le suivi et le traitement post-natal selon le protocole français de dépistage de la toxoplasmose congénitale versus l'absence de dépistage sérologique systématique ou de traitement périnatal. Sur les 4 millions de naissance annuelle aux Etats-Unis, on estime entre 400 et 4000 le nombre d'enfants atteints de toxoplasmose congénitale. Le coût des répercussions sur la vie sociale liées à des troubles du développement est estimé à 1010\$ par naissance. L'application du protocole français de dépistage permettrait de faire une économie de 620\$ par enfant dépisté. Selon le même modèle, avec un test sérologique à 12\$, le suivi sérologique de la femme enceinte permet de réaliser des économies de coût si le taux d'infection congénitale est supérieur à 1 pour 10000 naissances. Si le coût du test sérologique est abaissé à 2\$, le suivi sérologique devient rentable pour un taux d'infection congénitale bien en deçà du taux le plus bas rapporté aux Etats-Unis de 1 pour 10 000 naissances. Ce modèle va être appliqué aux données françaises afin d'évaluer le coût actuel du dépistage et de suivre son évolution au cours du temps.

6. CONCLUSION

La PCR en temps réel pour la détection de l'ADN de *T.gondii* est l'outil de choix pour le diagnostic prénatal de l'infection congénitale à *T. gondii*.

La méthode mise en place au laboratoire de parasitologie du CHU de Bordeaux correspond à nos attentes et nos besoins et répond à la politique de déploiement de la norme NF EN ISO 15189. L'accréditation de cette méthode et l'obtention de l'autorisation au DPN constituent les prochains objectifs du laboratoire.

La méthode a démontré ses performances au niveau de l'extraction et de l'amplification, les facteurs techniques sont maîtrisés. Les résultats obtenus des différents EEQ ont été validés par le CNR et ceux des liquides amniotiques envoyés par le Pr Saura sont en accord avec les résultats du laboratoire privé pratiquant actuellement l'analyse pour le CHU de Bordeaux. La technique est prête à être utilisée au laboratoire de parasitologie du CHU de Bordeaux.

Une diminution du nombre de cas de toxoplasmose congénitale clinique a été constatée au fil des années, le contexte épidémiologique a évolué et les techniques de diagnostic précoce de la toxoplasmose congénitale en pré et postnatal se sont améliorées. Une mise au point sera faite sur la réglementation actuelle ainsi qu'un meilleur encadrement des outils de prévention secondaire. Un développement de travaux de recherche vaccinaux et thérapeutiques sont à prévoir afin d'assurer une alternative à moyen ou à long terme.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Rapport annuel d'activités du Centre National de la Toxoplasmose, Année d'exercice 2012. 2013. Available from <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2013/09/RAPPORT-CNR-Toxoplasmose-2012.pdf>.
2. Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondii : Toxoplasme. Arch Inst Pasteur Tunis. 1909 ; 2:97-103.
3. Fortier B, Ajana F, Dao A. Toxoplasme et toxoplasmoses. Encycl. Médico-chirurgicale, Pédiatrie maladies infectieuses, 2000 ; 4:330-A-10. Available from <http://www.em-consult.com/article/3959/toxoplasme-et-toxoplasmoses>.
4. Hutchison WM. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nat. Macmillan Journals. 1965 May 29; 206(987):961-2.
5. Frenkel J. Toxoplasma in and around us. Bioscience. 1973; 23:343-52.
6. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1989 Aug ; 27(8):1787-92.
7. Levine N-V. The Protozoan Phylum Apicomplexa. UCRL Press. Inc Boca Raton, Florida. 1988.
8. Robert-gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clin. Microbiol. Rev. 2012; 25(2):264-96.
9. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics : shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Exp. Rev. Mol. Med. 2001 January.
10. Dubey JP, Lindsay D. Structures of *Toxoplasma gondii* : tachyzoites , bradyzoites , and sporozoites and biology and development of tissue cysts . 1998; 11(2):267-99.
11. Cycle *Toxoplasma gondii*. Available from: <http://spiral.univ-lyon1.fr>
12. Zardi O. Biology of *Toxoplasma gondii*, its survival in body tissues and liquids, risks for the pregnant woman. Biochem. Exp. Biol. 1979; 15(4):355-60.
13. Euzeby J. Toxoplasmose. Les parasites des viandes. Epidémiologie, physiopathologie, incidences zoonosiques. Ed. Lavoisier, Paris. 1998;45-90.
14. Dubey JP. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J. Parasitol. American Society of Parasitologists; 1990 Apr;76(2):201-4.
15. Derouin F, Thomann, Ribeiro. Etat des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. Rapport du groupe de travail de l'AFSSA ; Décembre 2005; p 1-378.

16. Nicolas J., Pestre-Alexandre M. Toxoplasmose : une zoonose transmissible à l'homme. *Med Mal Infect.* 1993; 23:128–39.
17. Relapsing WA. Toxoplasmosis and horse meat. 2011; 17(7):2009–10.
18. Baril L, Ancelle T, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Facteurs de risque d'acquisition de l'homme. *Med Mal Infect.* 1998; 23:129–38.
19. Ferro E, Silva D, Bevilacqua E, Mineo J, Sa U. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus* , a model of congenital toxoplasmosis. 2002; 70(12):7089–94.
20. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 1995 Dec 1; 172 (6):1561–6.
21. Ajzenberg D, Yera H, Marty P, Paris L, Dalle F, Menotti J, et al. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients and correlation with clinical findings. *Journal Infect Disease.* 2009; 199:1155-67.
22. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2004 Sep; 34(10):1185–96.
23. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet.* 2004 Jun 12; 363(9425):1965–76.
24. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 2009 Oct; 39(12):1385–94.
25. Acha P, Szyfres B. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. Paris, Off. Int. des épizooties. 1989.
26. Bellali H, Pelloux H, Villena I, Fricker-Hidalgo H, Le Strat Y, Goulet V. Prevalence of toxoplasmosis in France in 1998: is there a difference between men and women? At what age do children become infected? *Rev. Epidemiol. Sante Publique.* Elsevier Masson; 2013 Aug ; 61(4):311–7.
27. Ben Abdallah R, Siala E, Bouafsoun A, Maatoug R, Souissi O, Aoun K, et al. Toxoplasmosis mother-to-child screening: study of cases followed in the Pasteur Institute of Tunis (2007-2010). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2013 May;106(2):108–12.
28. Nogareda F, LE Strat Y, Villena I, De Valk H, Goulet V. Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980-2020: model-based estimation. *Epidemiol. Infect.* 2013 Aug;142(8):1661–70.

29. Berger F, Goulet V, Le Strat Y, H de Valk, Desenclos J. La toxoplasmose en France chez la femme enceinte en 2003 : séroprévalence et facteurs associés. 2003.
30. Berger F, Goulet V, Le Strat Y, Desenclos J-C. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France : évolution de la séroprévalence et de l'incidence et facteurs associés , 1995-2003. BEH Apr 2008; 14-15:117-21.
31. Villard O, Jung-Etienne J, Cimon B, Franck J et al. Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage. Feuilles de Biologie, 2011; 298:43-9.
32. Antenatal care : routine care for the healthy pregnant woman. NICE 2008, Clinical guideline 62. Available from <http://guidance.nice.org.uk/CG62/NiceGuidance/pdf/English>
33. HAS. Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au cours de la grossesse. 2009. http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-12/depistages_prenatals_obligatoires_synthese_vf.pdf
34. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 2002; 185(suppl1):S73-82.
35. Point sur la sérologie de la toxoplasmose en France. Unité Réactovigilance AFSSAPS. 2008. <http://ansm.sante.fr/content:download/15788/184644>
36. Couvreur J, Desmonts G, Aron-Rosa D. Ocular prognosis in congenital toxoplasmosis: the role of treatment. Preliminary communication. Ann. Pediatr. (Paris). 1984 Nov;31(10):855-8.
37. Flori P, Chene G, Varlet M-N, Tran Manh Sung R. sérologie de la toxoplasmose chez la femme enceinte : caractéristiques et pièges. Ann. Biol. Clin. 2009;67(2):125-33.
38. Desmonts G, Naot Y, Remington JS. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. J. Clin. Microbiol. 1981 Nov;14(5):486-91.
39. Maudry A, Chene G, Chatelain R, Patural H, Bellete B, Tisseur B, et al. Bicentric evaluation of six anti-toxoplasma immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot. Clin. Vaccine Immunol. 2009 Sep;16(9):1322-6.
40. Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. J. Clin. Microbiol. 1997 Jan; 35(1):174-8.

41. Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiol. Infect.* 2004 Jun;132(3):541–8.
42. Lefevre-Pettazzoni M, Le Cam S, Wallon M, Peyron F. Delayed maturation of immunoglobulin G avidity: implication for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2006;25(11):687–93.
43. Franck J, Garin YJ-F, Dumon H. LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-toxoplasma antibody detection. *J. Clin. Microbiol.* 2008 Jul ;46(7):2334–8.
44. LDBIO-TOXO II IgG Confirmation. <http://www.ldbiodiagnostics.com>
45. Garry DJ, Elimian A, Wiencek V, Baker D. Commercial laboratory IgM testing for *Toxoplasma gondii* in pregnancy: a 20-year experience. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2005 Sep ;13(3):151–3.
46. Fricker-Hidalgo H, Cimon B, Chemla C, Darde ML, Delhaes L, L'ollivier C, et al. Toxoplasma seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicenter retrospective study. *J. Clin. Microbiol.* 2013 Jul ;51(7):2103–11.
47. Ancelle T, Goulet V, Tirard-fleury V, Baril L, Mazaubrun C, Thulliez P, Wisclo M, Carne B. La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. *BEH* . 1996; 51. <http://www.invs.sante.fr/beh/1996/9651/>
48. Ancelle T, Goulet V, Tirard-Fleury F, Baril L, Du Mazaubrun C, Thulliez P. La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. *BEH*. 1996;
49. Villena I. État de la situation en 2012- AAEIP n°210. 2012;
50. Couvreur J. Le problème de la toxoplasmose congénitale : l'évolution sur quatre décennies. *Presse Med.* 1999;28:753–7.
51. Villena I, Bory J-P, Chemla C, Hornoy P, Pinon J-M. Congenital toxoplasmosis: necessity of clinical and ultrasound follow-up despite negative amniocentesis. *Prenat. Diagn.* John Wiley & Sons, Ltd. 2003 ; 23(13):1098–9.
52. Wolak A, Ancelle T, Delmas C, Villena I. Analyse réseau,Toxosurv.Janv 2014;données du CNR.
53. Villena I, Delmas C. Surveillance de la Toxoplasmose congénitale. 2014. données du CNR et de l'InVS
54. Villena I, Ancelle T, Delmas C, Garcia P, Brézin AP, Thulliez P, et al. Congenital toxoplasmosis in France in 2007 : first results from a national surveillance system.

Euro Surveill. 2010;15(25):pii=19600. Available from
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?Articleid=19600>

55. Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 2013 Jul 1; 91(7):501–8.
56. Brézin AP, Thulliez P, Couvreur J, Nobré R, Mcleod R, Mets MB. Ophthalmic outcomes after prenatal and postnatal treatment of congenital toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol. Elsevier*; 2003 Jun 11; 135(6):779–84.
57. Vaudaux B, Rudin C, Kind C. Congenital toxoplasmosis: pediatric approach. Consensus report of the Swiss infectious disease pediatricians. *Schweiz. Med. Wochenschr. Suppl.* 2003; 65:70–81.
58. Shobab L, Pleyer U, Johnsen J, Metzner S, James ER, Torun N, et al. toxoplasma serotype is associated with development of ocular toxoplasmosis. *J Infectious disease.* 2013; 208:1520-8.
59. Garcia-Méric P, Franck J, Dumon H, Piarroux R. Management of congenital toxoplasmosis in France: current data. *Presse Med.* 2010 May; 39(5):530–8.
60. Rorman E, Zamir CS, Rilkis I, Ben-David H. Congenital toxoplasmosis : prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod. Toxicol.* 2006 May ; 21(4):458–72.
61. Mandelbrot L. Prévention de la transmission mère-enfant de la toxoplasmose : perspectives. 2012; 40:591–8.
62. Virkola K, Lappalainen M, Valanne L, Koskiniemi M. Radiological signs in newborns exposed to primary *Toxoplasma* infection in utero. *Pediatr. Radiol. Springer-Verlag*; 1997;27(2):133–8.
63. JW Seeds. Diagnostic mid trimester amniocentesis : how safe ? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 191(2):608–16.
64. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002; 96(suppl1):S205-S215.
65. Romand S. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstet. Gynecol. Elsevier*; 2001 Feb; 97(2):296–300.
66. Filisetti D, Sterkers Y, Villena I, Sophie T, et al. Logigramme associé aux « Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant le diagnostic par biologie moléculaire de la toxoplasmose congénitale ». 2012. <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2012/07/logigramme-diagnostic-TC.pdf>
67. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon J-M, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact on

- fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999 Feb; 180(2):410–5.
68. Kieffer F, Thulliez P, Gallimard E, Tasseau A. *Toxoplasmose congénitale*. EMC (Elsevier), *Traité de Médecine Akos*. 2006. 8–370.
 69. Bessières MH, Berrebi a, Rolland M, Bloom MC, Roques C, Cassaing S, et al. Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2001 Jan; 94(1):37–45.
 70. Naessens A, Jenum PA, Pollak A, Decoster A, Lappalainen M, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis in the neonatal period: A multicenter evaluation. *J. Pediatr.* 1999: 714–9.
 71. Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Zufferey J, et al. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis : evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G , M , and A antibodies *J. Clin. Microbiol.* 2001;39 (6): 2267-71.
 72. Robert-gangneux F, Duprez P, Yvenou C, et al. Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2010;29(1):33–8.
 73. Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart MP, Schaal JP, et al. Value of *Toxoplasma gondii* detection in one hundred thirty-three placentas for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007;26(9):845–6.
 74. Filisetti D, Cocquerelle V, Pfaff A, et al. Placental testing for *toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2010;29(7):665–7.
 75. Bessières MH, Berrebi A, Cassaing S, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009 Mar;104(2):389–92.
 76. Kieffer F, Wallon M, Garcia P, Thulliez P, Peyron F, Franck J. Risk factors for retinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008 Jan; 27(1):27–32.
 77. Binquet C, Wallon M, Quantin C, Kodjikian L, Garweg J, Fleury J, et al. Prognostic factors for the long-term development of ocular lesions in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Epidemiol. Infect. Cambridge University Press*; 2003 Dec; 131(3):1157–68.
 78. Tan HK, Schmidt D, Stanford M, Teär-Fahnehjelm K, Ferret N, Salt A, et al. Risk of visual impairment in children with congenital toxoplasmic retinochoroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* 2007 Nov ; 144(5):648–53.

79. Phan L, Kasza K, Jalbrzikowski J, Noble AG, Latkany P, Kuo A, et al. Longitudinal Study of New Eye Lesions in Treated Congenital Toxoplasmosis. *Ophthalmology*. 2008 Mar; 115(3):553–559.
80. Kodjikian L, Wallon M, Fleury J, Denis P, Binquet C, Peyron F, et al. Ocular manifestations in congenital toxoplasmosis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. 2006 Jan ; 244(1):14–21.
81. Berrébi A, Assouline C, Bessières M-H, Lathière M, Cassaing S, Minville V, et al. Long-term outcome of children with congenital toxoplasmosis. *Am. J. Obstet. Gynecol. Elsevier*; 2010 Jun 12; 203:552e1–6.
82. Roizen N, Kasza K, Karrison T, Mets M, Noble G, Boyer K, et al. Impact of visual impairment on measures of cognitive function for children with congenital toxoplasmosis: implications for compensatory intervention strategies. *Pediatrics*. 2006 Aug ;118(2):379–90.
83. Wallon M, Kodjikian L, Binquet C. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatr. American Academy of Pediatrics*. 2004 Jun; 113(6):1567–72.
84. Costa JG, Carneiro AC, Tavares AT, et al. Real-time PCR as prognostic tool for human congenital toxoplasmosis. *J Clin. Microbiol*. 2013 Aug; 51(8):2766-8.
85. Villena I, Aubert D, Leroux B, et al. Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group. *Scand. J. Infect. Dis*. 1998;30(3):295–300.
86. Freeman K, Salt A, Prusa A, Malm G, Ferret N, Buffolano W, et al. Association between congenital toxoplasmosis and parent-reported development outcomes, concerns and impairments in 3 year old children. *BMC Pediatrics*. 2005 Jan; 5:23-25.
87. Gilbert RE, Gras L, Wallon M, Peyron F, Ades a E, Dunn DT. Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France. *Int. J. Epidemiol*. 2001 Dec; 30(6):1303–8.
88. Boyer KM, Holfels E, Roizen N, Swisher C, Mack D, Remington J, et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis : Implications for prenatal management and screening. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2005 Feb ;192(2):564–71.
89. Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, et al. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr*. 2005 Dec ; 94(12):1721–31.

90. Thiébaud R, Leproust S, Chêne G, Gilbert R. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients data. *Lancet*. 2007 Jan ; 369(9556):115–22.
91. Kim K. Time to screen for congenital toxoplasmosis? *Clin. Infect. Dis.* 2006 May 15; 42(10):1395–7.
92. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, Decoster A, Lappalainen M, Pinon J-M, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy : A multicenter study of impact on fetal transmission and children’s sequelae at age 1 year. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999 Feb ; 180(2):410–5.
93. Fortier B, Coignard-Chatain C, Dao A, Rouland V, Valat A-S, Vinatier D, et al. Etude des poussées cliniques évolutives et des rebonds sérologiques d’enfants atteints de toxoplasmose congénitale et suivis durant les 2 premières années de vie. *Arch. Pediatr.* 1997; 4:940-946.
94. Sabin AB. Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am Med Assoc.* 1941; 116:801–807.
95. Faucher B, Miermont F, Ranque S, Franck J, Piarroux R. Optimization of *Toxoplasma gondii* DNA extraction from amniotic fluid using NucliSENS easyMAG and comparison with QIAamp DNA minikit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012 Jun ; 31(6):1035–9.
96. System performance. 2012. Available from: Roche-applied-science.com
97. Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa J. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. 2003; 9:1–9.
98. Homan WL, Vercammen M, Braekeleer J De, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii* , and its use for diagnostic and quantitative PCR. 2000; 30:69–75.
99. PCR en temps réel. 2010; Available from: <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>
100. PCR en temps réel. 2010; Available from: <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>
101. Morelle C, Varlet-Marie E, Brenier-Pinchart M-P, Cassaing S, Pelloux H, Bastien P, et al. Comparative assessment of a commercial kit and two laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 2012 Dec ; 50(12):3977–82.
102. Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid . *J. Clin. Microbiol.* 1990;28(10): 2297-2301.


103. Jauregui L, Higgins J, Zarlenga D, Dubey J, Lunney J. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:2065-71.
104. Costa J, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-time PCR for diagnosis and follow-up of Toxoplasma reactivation after allogenic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridisation probes. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:2929-32.
105. Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 1988 Nov 15;141(10):3584-91.
106. Bretagne S, Costa JM, Vidaud M, Tran J, Nhieu V, Fleury-Feith J. Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. J. Infect. Dis. 1993 Dec; 168(6):1585-8.
107. Cazenave J, Bessières MH, Sourrue D, Cheyrou A, Béqueret J. détection de toxoplasmes par amplification d'ADN. Rev. Fr. Lab. 1990 ; 209: 11812.
108. Menotti J, Garin YJ-F, Thulliez P, Sérugue M-C, Stanislawiak J, Ribaud P, et al. Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. Clin. Microbiol. Infect. 2010 Apr;16(4): 363-8.
109. Sterkers Y, Varlet-Marie E, Cassaing S, Brenier-Pinchart M-P, Brun S, Dalle F, et al. Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. J. Clin. Microbiol. 2010 Sep ; 48(9):3216-22.
110. Kasper DC, Sadeghi K, Prusa A-R, Reischer GH, Kratochwill K, Förster-Waldl E, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. Elsevier. 2009 Jan ; 63(1):10-5.
111. Cassaing S, Bessières MH, Berry A, et al. Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. 2006 Mar;44(3):720-4.
112. Delhaes L, Yera H, Ache S, Tsatsaris V, Houf V. Contribution of molecular diagnosis to congenital toxoplasmosis. 2013; 76:244-7.
113. Wahab T, Edvinsson B, Palm D, Lindh J. Comparison of the AF 146527 and B1 repeated elements, two real time PCR targets used for detection of *toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 2010; 48:591-2.
114. Edvinsson B, Lappalainen M, Evengård B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. Clin. Microbiol. Infect. 2006; 12(2):131-6.

115. Yera H, Filisetti D, Bastien P, Ancelle T, Thulliez P, Delhaes L. Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid. *J. Clin. Microbiol.* 2009 Dec ;47(12): 3881–6.
116. Kaiser K, Van Loon AM, Pelloux H, Ferrandiz J, Picot S, Wallace P, et al. Multicenter proficiency study for detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid by nucleic acid amplification methods. *Clin. Chim. Acta.* 2007 Jan; 375(1–2):99–103.
117. Costa J-M, Bretagne S. Variation of B1 gene and AF146527 repeat element copy numbers according to *Toxoplasma gondii* strains assessed using real-time quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2012 Apr; 50(4):1452–4.
118. Varlet-marie E, Sterkers Y, Bastien P. Quality Control for the Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis. 2002; 11: 217-32
119. Sterkers Y, Ribot J, Albaba S, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction on neonatal peripheral blood. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011 Oct; 71(2):174–6.
120. Botterel F, Ichai P, Feray C, et al. Disseminated toxoplasmosis, resulting from infection of allograft, after orthotopic liver transplantation: usefulness of quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002;1648–50.
121. Martino R, Bretagne S, Einsele H, et al. Early detection of *Toxoplasma* infection by molecular monitoring of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood samples after allogeneic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 2005;40:67–78.
122. Costa J-M, Ernault P, Gautier E, Bretagne S. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Prenat Diagn* 2001;21:85-8.
123. Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, et al. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004 Mar;190(3):797–802.
124. Colotta F. Q-LAMP : the 2nd Generation LAMP, Isothermal Evolution in Molecular Diagnostics. 2012. Available from: http://www.diasorin.com/sites/default/files/docs/DIASORIN_ANALYST_DAY.pdf
125. Lin Z, Zhang Y, Zhang H, Zhou Y, Cao J, Zhou J. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Vet. Parasitol.* 2012 Apr 30 ;185(2-4):296–300.
126. Fallahi S, Javad S, Tabaei S, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and nested-PCR assay targeting the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* in blood samples of children with leukaemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014 Jul;79(3):347-54.

127. Stillwaggon E, Carrier CS, Sautter M, McLeod R. Maternal serologic screening to prevent congenital toxoplasmosis: a decision-analytic economic model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011 Sep ; 5(9):1-17.

8. ANNEXES

8.1. Analyse de risque

	Entité d'application : PBP – Parasitologie – Mycologie - Virologie Emetteur : PBP-P2A-Parasitologie-mycologie		EN-LAB-3007	
	DOCUMENT D'ENREGISTREMENT Analyse de risque DPN <i>Toxoplasma gondii</i> par PCR		Ind : 001	Page : 1/6

Champ d'analyse (pratique, processus, équipement)	Entité concernée	Date	Membres du groupe de travail
Système 2 PCR Roche / TibMoiBiol	PTBM	juillet-13	B Tausin, S Pichard

Gravité G	Fréquence F	Déteçtabilité D	15 = seuil d'alerte	
			32	= seuil de priorisation
1 - MINEUR : Impact minime, pas d'impact sur le résultat	1-EXCEPTIONNEL <1/an, 1/10 000	1-INMANQUABLE		
2 - MODERE : Impact sur le travail du laboratoire, mais pas sur le résultat	2- RARE : <1/trimestre, <1/1000	2- FACILE moyen de détection simple et systématique		
3 - SIGNIFICATIF : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat mais pas la prise en charge du patient	3- PEU FREQUENT <1/mois, <1/500	3- ALEATOIRE moyen de détection simple mais sporadique		
4 - IMPORTANT : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat et sans conséquence grave pour le patient	4 - FREQUENT <1/semaine, <1/100	4- DIFFICILE moyen de détection difficile et sporadique		
5 - MAJEUR : Impact majeur sur la prise en charge du patient	5- TRES FREQUENT <1/jour, <1/10	5- INDETECTABLE		

Etapes du processus	Nature des défaillances	Risque / événement redouté / mode de défaillance (AMDEC)	Causes (F)	Effets (G)	G	F	D	ICR	Moyens de maîtrise existants (D)	N°
Mauvaise manipulation du prélèvement	Tube renversé	Impossibilité de réaliser l'analyse	inattention	Impossibilité de rendre un résultat	5	1	1	5	-Contacter le service -Récupérer le reste du prélèvement venant d'un autre laboratoire	1
	Erreur d'échantillon (analyse réalisée sur un échantillon autre que le patient concerné)	Mauvaise attribution du résultat	inattention	Retard dans le rendu Résultat erroné	5	1	1	5	-vérifier la concordance flacon / demande -vérifier l'identité flacon / feuille de paillasse	2

Analyse de risque DPN *Toxoplasma gondii* par PCR

		ANALYSE		MATERIEL (REACTIFS, CONSOMMABLES...)		ANALYSE			
Anomalie concernant le contenu	Centrifugation mal ou non effectuée	augmentation du seuil de détection de la PCR en temps réel	Centrifugeuse défectueuse	non concentration des <i>Toxoplasma gondii</i> dans le prélèvement	5	1	3	3	-Vérifier la présence du culot cellulaire dans le fond de l'aliquot -Vérifier les centrifugeuses -Statut d'étalonnage -Au besoin recentrifuger
	Volume insuffisant	augmentation du seuil de détection de la PCR en temps réel	Erreur du préleveur	Résultats erronés	5	3	1	4	-Information auprès des services cliniques du volume minimum requis -Contrôle de la température des locaux par enregistreurs qualifiés -Stockage conforme aux spécifications du fournisseur
Anomalies dues à la qualité intrinsèque des réactifs	Non maîtrise de la température des zones de stockage	Réactifs détériorés, mal conservés	Surveillance métrologique	Résultats ininterprétables ou erronés	4	1	3	5	
	Anomalies de la qualité des lots	Impossibilité d'effectuer l'analyse	Problème fournisseur	Résultats erronés	2	1	2	6	-Contrôle à la réception -CQI valide -Appel fournisseur pour remplacement du réactif
Anomalies dues à la gestion des réactifs	Réactifs périmés	Retard dans l'exécution de l'analyse	Mauvaise gestion des stocks	Impossibilité de rendre le résultat dans un délai raisonnable	2	1	2	7	-Vérifier les dates de péremption -Gestion des stocks de réactifs -Formation du personnel -Commande en urgence si possible
	Réactifs en quantité insuffisante en stock	Mauvaise distribution	Nouvelle appel d'offre	Résultats erronés	5	2	4	8	-Respect du cahier des charges des pipettes -Vérification à réception d'un nouvel appel d'offre
Anomalies dues à la gestion des consommables	Cônes non adaptés à la pipette	Non enregistrement de l'analyse	erreur de prescription ou d'enregistrement	oubli d'analyse, réalisation d'analyses non demandées, non réalisation de l'analyse	5	1	2	10	-vérification des feuilles de prescription par le biologiste
Préparation de l'extraction	Absence d'enregistrement	problème informatique							

DOCUMENT D'ENREGISTREMENT

Analyse de risque DPN *Toxoplasma gondii* par PCR

			demandée	ABC, problème synergie					édition des non terminés	
			erreur d'identité du patient, retard dans le rendu des résultats	inattention, portoir éluats en disposition inverse (de la plaque de travail)	erreur de pipetage ou d'étiquetage, erreur d'orientation de la plaque (à l'envers),	vérification de l'identité patient, aliquotage, étiquetage sur le plan de travail, le tube éluat et le tube archive, chargement de la plaque extraction		5 1 3 15	-rigueur -organisation	10
			faux positif	inattention	risque de contamination	non vérification du changement de la poubelle tips		4 2 4 32	-rigueur	11
			absence d'extraction	inattention	mauvais positionnement des réactifs et consommables	chargement des réactifs sur MP96		1 1 1 1	-signallement par l'appareil	12
			omission d'un patient et confusion d'identités	inattention fiabilité du scan	1 effacement d'un numéro en réécrivant par-dessus, 2 scan deux fois du même numéro, 3 scan d'une autre étiquette, 4 scan incomplet, 5 erreur du scan (8 pour 0, 7 pour 4)	scan des numéros de dossiers		4 2 2 16	-rigueur et attention, l'erreur de scan ne sera détectée que sur l'EP Motion (confrontation des deux listes)	13
			confusions identités	inattention	import d'une autre liste	import de la liste MP96		4 2 2 16	-rigueur noms évocateurs pour chaque plaque (ex : chat / perché), effacer chaque matin les listes de la journée précédente	14
			blocage	inattention	oubli d'import de la liste	Traçabilité		4 2 1 8	-faire l'import	15
			confusion identité	inattention	inversion de tubes par rapport au plan de travail	scan des numéros de dossiers (à partir		4 2 1 8	-comparaison de la liste importée ou contrôle des tubes, par rapport	16

Analyse de risque DPN *Toxoplasma gondii* par PCR

des tubes ou du plan de travail)	des tubes ou du débouchage des tubes d'éluat	inattention	confusion identité	au plan scanné
	inversion de tubes par rapport à la liste initiale			
	erreur de sélection des réactifs	inattention	retard au rendu des résultats	17
	Omission de vérification des lots de réactifs	inattention	retard au rendu des résultats	18
	Erreur de quantification	inattention	retard au rendu des résultats	19
Préparation des mélanges réactionnels	reconstitution des réactifs	inattention, pipettes inadaptées ou non exactes, cônes inadaptés, mauvais milieu de régénération	échec d'amplification, retard au rendu des résultats	20
	préparation des mix	inattention, pipettes inadaptées ou non exactes	échec d'amplification, retard au rendu des résultats	21
Répartition en capillaires du mix	mise en place des mix	inattention	retard au rendu des résultats	22
	Mise en place des échantillons	inattention	retard au rendu des résultats, résultat erroné si inversion témoin +/- avec l'échantillon	23



Entité d'application : PBP – Parasitologie – Mycologie - Virologie
 Emetteur : PBP-P2A-Parasitologie/mycologie

EN-LAB-3007

Ind : 001

Page : 5/6

DOCUMENT D'ENREGISTREMENT

Analyse de risque DPN *Toxoplasma gondii* par PCR

			témoins							
	Matériel fragile	Capillaires cassés	Inattention, mauvais choix du carrousel	retard au rendu des résultats risque de contamination du carrousel, de la centrifugeuse	3	1	1	3	-Rigueur, attention	24
	Choix du LC2.0	Mauvais LC	inattention	Pas de gamme standard accessible	3	2	1	6	Rigueur, attention	25
Lancement de la PCR sur LC2.0	Mise en place du carrousel	Mauvais positionnement	inattention	Capillaire cassé, Contamination du LC2.0	4	2	1	8	-Rigueur, attention +++	26
	Choix du programme de PCR	Mauvais programme	inattention	retard au rendu des résultats	3	2	1	6	-rigueur	27
	Feuille de route	Mauvaise saisie des numéros d'échantillons, inversion de 2 identifiants Erreur de standard	inattention	Résultat erroné	5	1	4	20	-Rigueur +++ -Feuille de travail avec étiquette patient	28
	Démarrage de la PCR	Sauvegarde au mauvais emplacement	inattention	Difficulté pour le run	1	2	2	4	-attention	29
	Vérification des contrôles qualité	non prise en compte d'un contrôle interne négatif ou plat	inattention	résultat erroné	4	2	3	24	-rigueur, lecture des Tm, vérification lors de la validation biologiste	30
Lecture des résultats et validation technique	CQI	Non réalisé Non conforme	inattention	Validation abusive de la technique Non validation de la technique	3	1	2	6	-Passage des CQI à chaque série	31
	Quantification	calcul des charges avec la mauvaise gamme (mauvais lot), calcul sans gamme	inattention	résultat erroné	4	2	2	16	-recommencer le calcul avec la gamme adéquate	32
ANOMALIES D'INTERPRETATION										



CHU
Hôpitaux de
Bordeaux

Entité d'application : PBP – Parasitologie – Mycologie - Virologie
Emetteur : PBP-P2A-Parasitologie/mycologie

EN-LAB-3007

Ind : 001

Page : 6/6


DOCUMENT D'ENREGISTREMENT

Analyse de risque DPN *Toxoplasma gondii* par PCR

ANOMALIES DE RESULTATS

	1	1	5	5	33
Validation biologique	Oubli de rendu	Absence de résultat	inattention	Retard dans le rendu	-Rigueur, attention
	vérification des résultats sur papier	oubli de vérification des IC, des valeurs de standards, des courbes "plates"	inattention	résultats erronés	-validation biologiste sous synergie avec la feuille des résultats LC2.0 sous les yeux : 1) IC, 2) valeurs des standards 3) courbes plates et si besoin retour au Tm (papier ou écran LC2.0) 4) confrontation au dossier clinique si besoin
					34

8.2. Conditions de prélèvement et acheminement du LA

	Entité d'application : PBP et Etablissements extérieurs Emetteur : PBP – P2A – Parasitologie -Mycologie	IN-LAB-3000
	INSTRUCTION	
DIAGNOSTIC PRENATAL DE LA TOXOPLASMOSE CONGENTALE PRELEVEMENT ET ACHEMINEMENT DU LIQUIDE AMNIOTIQUE		Ind : 001 Page : 1/1

Merci de contacter le laboratoire concerné pour avertir de l'envoi d'un prélèvement de liquide amniotique.

Conditions du prélèvement :

- Ne pas utiliser d'héparine
- Eviter la contamination du liquide amniotique par du sang
- Volume de prélèvement minimum : 10 ml
- Recueillir dans des flacons stériles **fermés hermétiquement** en l'absence de tout anticoagulant
- Etiqueter l'échantillon : Nom marital, nom de jeune fille, prénom, date de naissance (étiquette SIGMA)

Documents associés à joindre impérativement :

- Consentement signé par la patiente et attestation de consultation médicale signée par le médecin (disponible sur le portail du CHU, EN-LAB-3006)
- Bon de prescription signé par le médecin (disponible sur le portail du CHU, EN-LAB-9000 et EN-LAB-3000)
- Fiche de renseignements administratifs et cliniques avec accusé-réception (disponible sur le portail du CHU, EN-LAB-3001)

Conditions d'envoi à l'accueil de biologie centralisée de l'hôpital Pellegrin :

- Pour les prélèvements effectués au CHU : envoi immédiat, à température ambiante
- Pour les prélèvements extérieurs : envoi à +4°C par transporteur agréé
le bon de transport doit indiquer l'identité du transporteur et l'heure d'enlèvement dans les conditions usuelles de transport de matériel biologique
- Pour une prise en charge optimale, faire parvenir le prélèvement de liquide amniotique aux horaires suivants : 8h-16h du lundi au jeudi et 8h-14h le vendredi et veille de jour férié.
- En cas d'impossibilité d'acheminer rapidement le prélèvement, le conserver à +4°C (moins de 48h).

Adresse d'envoi :

ABC Hôpital Pellegrin
CHU Bordeaux
Place Amélie-Rabat Léon
33076 Bordeaux Cedex


Contacts :

Laboratoire Parasitologie : Tel 05 57 82 09 86 Fax : 05 56 79 56 73

Date d'application : A la date d'autorisation

TABLEAU D'APPROBATION					
	POUR LE GROUPE D'ELABORATION	VALIDATION (fonction qualité)	AVIS EXPERT (facultatif)	APPROBATION (responsable d'activité)	
Nom :	Simon Pichard	Aurélie Victor	Isabelle Accoceberry MCU-PH	Philippe Vincendeau PP	Jean-Christophe Garoste Cadre de santé
Fonction :	Interne	CAQ			
Date :					
Signature :					

8.3. Fiche de renseignement à adresser au laboratoire de parasitologie

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : Pôle de Biologie Pathologie et Etablissements extérieurs	EN-LAB- 3001
	Emetteur : PBP – P2A – Laboratoire Parasitologie-Mycologie	
ENREGISTREMENT		Ind : 001 Page : 1/1
Fiche de renseignements à adresser au laboratoire de Parasitologie en vue du diagnostic prénatal de la toxoplasmose		

Date d'application :

PATIENTE	
Nom	Adresse :
Prénom	
Nom de jeune fille	
Date de naissance	Téléphone :

MEDECIN PRELEVEUR	MEDECIN TRAITANT
Nom :	Nom :
Prénom :	Prénom :
Adresse :	Adresse :
Tel :	Tel :
Fax :	Fax :

GROSSESSE ACTUELLE			
DDR :	DDG :	<input type="checkbox"/> Grossesse mono- fœtale	<input type="checkbox"/> Grossesse gémellaire

Indications
Résultats des sérologies toxoplasmiques si diagnostic de séroconversion réalisé hors CHU

Accusé de réception par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie


Prélèvement de Liquide amniotique

Date et heure de réception au laboratoire :

Prélèvement : Conforme Non conforme :

Signature du biologiste :

8.4. Fiche de suivi de grossesse après le DPN

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : PBP et Etablissements extérieurs Emetteur : PBP-P2A- Parasitologie - Mycologie	EN-LAB-3004
	ENREGISTREMENT	
Fiche de suivi de grossesse après le diagnostic pré-natal de toxoplasmose congénitale		

Date d'application :

A compléter pour tout diagnostic anténatal, en vue d'établir un rapport d'activité

Médecin prescripteur : Tel/Fax :

Service (UG), Hôpital :

Nom de la patiente :

Prénom de la patiente :

Date de naissance Nombre de semaines d'aménorrhée:

Indication et date du DPN :

Résultat du DPN :

q *Toxoplasma gondii* détecté.....q *Toxoplasma gondii* non détecté

Merci de compléter les informations suivantes :

Devenir de la grossesse :

- Poursuite de la grossesse
- Interruption médicale de grossesse
 - pour la maladie recherchée
 - pour une autre affection (précisez) :
- Fausse couche spontanée
- Date et établissement de naissance, nom et prénom de l'enfant :
- Autre (précisez) :

Diagnostic chez l'enfant :

Prélèvements réalisés chez l'enfant pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale et résultat ?

- | | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> sang de cordon | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> placenta | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> liquide céphalo rachidien | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> sang périphérique (suivi sérologique) | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> autre (précisez) : | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> aucun prélèvement réalisé | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |


Nouveau né symptomatique ?

- oui (précisez) :
- non

Merci de renvoyer cette fiche au laboratoire suivant :

Dr Isabelle ACCOCEBERRY
 Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Pellegrin, CHU Bordeaux
 Place Amélie Rabat Léon
 33076 Bordeaux CEDEX
 Tel : 05 56 79 57 40 Fax : 05 56 79 56 73

8.5. Lettre à la mère après le prélèvement de LA

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : Pôle de Biologie Pathologie et Etablissements extérieurs	EN-LAB- 3008
	Emetteur : PBP – P2A – Laboratoire Parasitologie-Mycologie	
ENREGISTREMENT		Ind : 1 Page : 1/1
Lettre à la mère après le prélèvement de LA suspicion toxoplasmose congénitale		

Professeur Philippe VINCEDEAU

*Praticien Hospitalier
Professeur des Universités
Chef de Service
Tél : 05 56 79 47 55
philippe.vincendeau@chu-bordeaux.fr*

A Bordeaux le,
A Mme.....,

Docteur Isabelle ACCOCEBERRY

*Maître de Conférences Universitaires
Praticien Hospitalier
Tél : 05 56 79 57 40
isabelle.accoceberry@chu-bordeaux.fr*

Madame,

Vous avez fait une séroconversion toxoplasmique au cours de votre grossesse. Nous avons effectué un examen en vue du diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale sur un prélèvement de liquide amniotique.

Le résultat a été envoyé à votre médecin. Il est à votre disposition ainsi que nous-mêmes pour répondre à vos questions.

Docteur Frédéric GABRIEL

*Praticien Hospitalier contractuel
Tél : 05 57 82 09 81
frederic.gabriel@chu-bordeaux.fr*

Quel que soit le résultat de ce diagnostic prénatal, il est essentiel de le confirmer à la naissance de l'enfant sur un certain nombre de prélèvements (sang du cordon, sang de l'enfant, placenta).

Secrétariat

*Tél : 14666 - Tél : 05 56 79 56 67
Fax : 05 56 79 56 73
sylvie.roumeqoux@chu-bordeaux.fr*

Par ailleurs, si ces examens sont négatifs à la naissance, la certitude de l'absence de toxoplasmose congénitale ne pourra être apportée que par le suivi de la sérologie toxoplasmique de l'enfant jusqu'à la négativation complète.


Celle-ci survient en général **entre 6 et 10 mois**.

Il est important d'effectuer ce suivi dans un laboratoire spécialisé et de nous communiquer le nom du médecin qui aura en charge la surveillance de l'enfant.

Je vous remercie de bien vouloir suivre ces indications dans l'intérêt de votre enfant.

Dr Isabelle Accoceberry
Responsable du diagnostic biologique
prénatal de la toxoplasmose
CHU de Bordeaux

8.6. Lettre de relance au médecin pour le suivi de suspicion de toxoplasmose congénitale

	Entité d'application : Pôle de Biologie Pathologie et Etablissements extérieurs	EN-LAB- 3009
	Emetteur : PBP – P2A – Laboratoire Parasitologie-Mycologie	Ind : 1 Page : 1/1
ENREGISTREMENT		
Lettre de relance au médecin pour le suivi de suspicion de toxoplasmose congénitale		

Professeur Philippe VINCENDEAU

Praticien Hospitalier
Professeur des Universités
Chef de Service
Tél : 05 56 79 47 55
philippe.vincendeau@chu-bordeaux.fr

A Bordeaux le,
Au Dr.....,

Docteur Isabelle ACCOCEBERRY

Maitre de Conférences Universitaires
Praticien Hospitalier
Tél : 05 56 79 57 40
isabelle.accoceberry@chu-bordeaux.fr

Cher Confrère,

Nous avons effectué un diagnostic anténatal de la toxoplasmose pour votre patiente dont le nom est indiqué dans le tableau joint.

Ce diagnostic anténatal était négatif. Afin de compléter nos dossiers, nous aurions besoin de connaître le suivi toxoplasmique de l'enfant né de cette grossesse.

Docteur Frédéric GABRIEL

Praticien Hospitalier contractuel
Tél : 05 57 82 09 81
frederic.gabriel@chu-bordeaux.fr

Vous est-il possible de nous communiquer les informations suivantes :

- Nom du bébé
- Date de naissance
- Résultats des examens parasitologiques et sérologiques à la naissance
- Et si vous le connaissez, le nom du pédiatre ayant en charge l'enfant.

Avec tous mes remerciements,

Je vous prie de bien vouloir croire, Cher Confrère, à l'expression de mes salutations les meilleures.

Dr Isabelle Accoceberry
Responsable du diagnostic biologique
prénatal de la toxoplasmose
CHU de Bordeaux

8.7. Performances de l'extraction

Calcul de la répétabilité

passage du même échantillon 6 fois dans une même série
niveau fort : 100 Tachy/ mL

passage du même échantillon 6 fois dans une même série
niveau faible : 1 tachy/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copie/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	27,53	6,61E+04	2,64E+02	2,422261451
100	27,65	6,08E+04	2,43E+02	2,385963571
100	27,79	5,50E+04	2,20E+02	2,342422681
100	27,74	5,72E+04	2,29E+02	2,35945602
100	27,76	5,63E+04	2,25E+02	2,352568386
100	27,99	4,78E+04	1,91E+02	2,281487888

	Log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	2,35736	27,7433333	229
ecart-type	0,04698386	0,15331884	24,4085231
CV	1,99307114	0,55263309	10,7

[C] Tachy/mL	CT	[C] copie/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
1	32,99	8,91E+02	3,56E+00	0,551937695
1	35,24	1,72E+02	6,88E-01	-0,162411562
1	33,88	4,65E+02	1,86E+00	0,269512944
1	33,09	8,29E+02	3,32E+00	0,520614522
1	34,67	2,62E+02	1,05E+00	0,020361283
1	35,33	1,62E+02	6,48E-01	-0,188424994

	Log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	0,16859831	34,2	1,85E+00
ecart-type	0,32865047	1,03711137	1,30577242
CV	194,931052	3,03248939	7,04E+01

Calcul de la reproductibilité (fidélité intermédiaire)

passage du même échantillon dans 6 séries différentes
Niveau fort 100 Tachy/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	27,02	6,40E+04	2,56E+02	2,408239965
100	27,66	5,27E+04	2,11E+02	2,323870607
100	27,79	5,48E+04	2,19E+02	2,34084055
100	27,25	5,89E+04	2,36E+02	2,372175286
100	26,29	1,30E+05	5,20E+02	2,716003344
100	27,5	4,46E+04	1,78E+02	2,25139485
100	27,59	5,39E+04	2,16E+02	2,333648757

	log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	2,39231048	27,3	2,62E+02
ecartype	0,15059207	0,51555795	116,111867
CV	6,29483798	1,88849066	4,43E+01

Niveau faible 1 Tachy/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
1	34,74	2,70E+02	1,08E+00	0,033423755
1	34,92	2,72E+02	1,09E+00	0,036628895
1	34,67	2,62E+02	1,05E+00	0,020361283
1	34,71	2,85E+02	1,14E+00	0,056904851
1	33,56	5,33E+02	2,13E+00	0,3287872
1	35,64	1,51E+02	6,04E-01	-0,218963061

	log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	0,04285715	34,7066667	1,18E+00
ecartype	0,17386029	0,66842103	0,50508296
CV	405,6739	1,92591536	4,27E+01

Calcul de la contamination

Passage dans la même série, en alternance d'un échantillon positif fort à 100 T/mL et d'un échantillon négatif répété 6 fois

Passage dans la même série, en alternance d'un échantillon positif faible à 1 T/mL et d'un échantillon négatif répété 6 fois

[C] Tachy/mL	CT	[C] copie/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	27,53	6,61E+04	2,64E+02	2,422261451
100	27,72	5,80E+04	2,32E+02	2,365487985
100	27,65	6,08E+04	2,43E+02	2,385963571
100	28,24	3,99E+04	1,60E+02	2,203032887
100	27,79	5,50E+04	2,20E+02	2,342422681
100	27,71	5,82E+04	2,33E+02	2,366982976
0	*			
0	*			
0	*			
0	*			
0	*			
0	*			
0	*			
1	32,99	8,91E+02	3,56E+00	0,551937695
1	35,24	1,72E+02	6,88E-01	-0,162411562
1	33,88	4,65E+02	1,86E+00	0,269512944
1	33,09	8,29E+02	3,32E+00	0,520614522
1	34,67	2,62E+02	1,05E+00	0,020361283
1	35,33	1,62E+02	6,48E-01	-0,188424994
0	*			
0	*			
0	*			
0	*			
0	*			
0	*			

0% de contamination

8.8. Performances de l'amplification

Calcul de la répétabilité

Passage du même échantillon 18 fois dans une même série
Niveau fort : 100 Tachy/ mL

Passage du même échantillon 18 fois dans une même série
niveau faible : 1 Tachy/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copie/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	27,53	6,61E+04	2,64E+02	2,422261451
100	27,72	5,80E+04	2,32E+02	2,365487985
100	27,79	5,48E+04	2,19E+02	2,34084055
100	27,65	6,08E+04	2,43E+02	2,385963571
100	28,24	3,99E+04	1,60E+02	2,203032887
100	28,1	4,39E+04	1,76E+02	2,244524512
100	27,79	5,50E+04	2,20E+02	2,342422681
100	27,71	5,82E+04	2,33E+02	2,366982976
100	28,35	3,69E+04	1,48E+02	2,169086357
100	27,74	5,72E+04	2,29E+02	2,35945602
100	27,84	5,30E+04	2,12E+02	2,326335861
100	28,13	4,31E+04	1,72E+02	2,236537261
100	27,76	5,63E+04	2,25E+02	2,352568386
100	27,58	6,40E+04	2,56E+02	2,408239965
100	27,64	6,12E+04	2,45E+02	2,388811413
100	27,99	4,78E+04	1,91E+02	2,281487888
100	28,12	4,35E+04	1,74E+02	2,240549248
100	27,7	5,86E+04	2,34E+02	2,369957607

	Log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	2,322474812	27,85444444	2,13E+02
écart-type	0,074557958	0,240225929	34,5425607
CV	3,210280595	0,862433028	1,62E+01

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
1	33,64	6,45E+02	2,58E+00	0,411619706
1	34,74	2,70E+02	1,08E+00	0,033423755
1	35,07	2,41E+02	9,64E-01	-0,015922966
1	34,17	4,93E+02	1,97E+00	0,294906911
1	34,92	2,72E+02	1,09E+00	0,036628895
1	36,02	1,11E+02	4,44E-01	-0,35261703
1	35,64	1,53E+02	6,12E-01	-0,213248578
1	35,59	1,59E+02	6,36E-01	-0,196542884
1	35,43	1,81E+02	7,24E-01	-0,140261434
1	34,82	2,96E+02	1,18E+00	0,073351702
1	34,71	3,23E+02	1,29E+00	0,111262514
1	34,46	3,92E+02	1,57E+00	0,195346058
1	35,88	1,25E+02	5,00E-01	-0,301029996
1	35,51	1,70E+02	6,80E-01	-0,167491087
1	34,35	4,27E+02	1,71E+00	0,232487866
1	35,11	2,34E+02	9,36E-01	-0,028724151
1	33,75	6,86E+02	2,74E+00	0,438384107
1	34,75	3,12E+02	1,25E+00	0,096214585

	Log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	0,028210443	34,92	1,22E+00
écart-type	0,230576029	0,685453907	0,67109743
CV	817,3428161	1,962926424	5,50E+01

Calcul de la reproductibilité (fidélité intermédiaire)

passage du même échantillon dans 6 séries différentes
Niveau fort 100 Tachy/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	27,02	6,40E+04	2,56E+02	2,408239965
100	27,66	5,27E+04	2,11E+02	2,323870607
100	27,79	5,48E+04	2,19E+02	2,34084055
100	26,29	1,30E+05	5,20E+02	2,716003344
100	27,25	5,89E+04	2,36E+02	2,372175286
100	27,5	4,46E+04	178	2,250420002
100	27,59	5,39E+04	216	2,333648757

	log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	2,392171216	27,3	2,62E+02
écart-type	0,150744477	0,51555795	116,160087
CV	6,301575576	1,88849066	4,43E+01

Niveau faible 1 Tachy/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
1	34,74	2,70E+02	1,08E+00	0,033423755
1	34,92	2,72E+02	1,09E+00	0,036628895
1	34,71	2,85E+02	1,14E+00	0,056904851
1	34,67	2,62E+02	1,05E+00	0,020361283
1	33,56	5,33E+02	2,13E+00	0,3287872
1	35,64	1,51E+02	6,04E-01	-0,218963061

	log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	0,042857154	34,7066667	1,18E+00
écart-type	0,173860288	0,66842103	0,50508296
CV	405,6739003	1,92591536	4,27E+01

Approche de la justesse
évaluation du biais sur les CQI externalisés

comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon (m) à une valeur cible "vraie" (v) : CIQ externalisés ou EEQ

CQI Gamme CNR	CT	[C] copie/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
10	32,62	1,69E+03	6,76E+00	0,829946696
10	33,91	6,02E+02	2,41E+00	0,381656483
10	33,99	4,82E+02	1,93E+00	0,28510703
10	35,37	1,42E+02	5,68E-01	-0,245651664
10	39,7	7,80E+00	3,12E-02	-1,505845406

	log [C#250#]	CT	[C#250#]
moyenne	-0,0509574	35,118	2,34E+00
ecartype	0,89870616	2,73997628	2,65430334
CV	1797,41232	7,80219909	1,13E+02

seuil de quantification

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
5	30,15	6,44E+03	2,58E+01	1,410945859
5	31,45	2,50E+03	1,00E+01	1
5	30,03	7,05E+03	2,82E+01	1,450249108
5	30,09	6,75E+03	2,70E+01	1,431363764
5	32,05	1,60E+03	6,40E+00	0,806179974
5	33,6	5,20E+02	2,08E+00	0,318063335
5	31,06	3,32E+03	1,33E+01	1,123198075
5	31,52	2,36E+03	9,44E+00	0,974971994
5	31,5	2,41E+03	9,64E+00	0,984077034
5	33,08	7,56E+02	3,02E+00	0,480581787
5	32,64	1,05E+03	4,20E+00	0,62324929
5	30,97	3,53E+03	1,41E+01	1,149834697
5	32,05	1,61E+03	6,44E+00	0,808885867
5	31,86	1,85E+03	7,40E+00	0,86923172
5	31,24	2,90E+03	1,16E+01	1,064457989
5	33,51	5,55E+02	2,22E+00	0,346352974
5	30,14	6,51E+03	2,60E+01	1,41564098
5	31,57	2,29E+03	9,16E+00	0,961895474

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
1	33,64	6,45E+02	2,58E+00	0,411619706
1	34,74	2,70E+02	1,08E+00	0,033423755
1	35,07	2,41E+02	9,64E-01	-0,015922966
1	34,17	4,93E+02	1,97E+00	0,294906911
1	34,92	2,72E+02	1,09E+00	0,036628895
1	36,02	1,11E+02	4,44E-01	-0,35261703
1	35,64	1,53E+02	6,12E-01	-0,213248578
1	35,59	1,59E+02	6,36E-01	-0,196542884
1	35,43	1,81E+02	7,24E-01	-0,140261434
1	34,82	2,96E+02	1,18E+00	0,073351702
1	34,71	3,23E+02	1,29E+00	0,111262514
1	34,46	3,92E+02	1,57E+00	0,195346058
1	35,88	1,25E+02	5,00E-01	-0,301029996
1	35,51	1,70E+02	6,80E-01	-0,167491087
1	34,35	4,27E+02	1,71E+00	0,232487866
1	35,11	2,34E+02	9,36E-01	-0,028724151
1	33,75	6,86E+02	2,74E+00	0,438384107
1	34,75	3,12E+02	1,25E+00	0,096214585

seuil de détection

Concentration minimale qui sera détectée dans au moins 95 % des cas
passage d'un échantillon à 0,5 tachy/mL
1 extraction suivie de 10 PCR

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
0,5	ND	ND	ND	ND
0,5	38,49	1,80E+01	7,20E-02	-1,142667504
0,5	34,29	3,86E+01	1,54E-01	-0,811352704
0,5	35,95	1,15E+01	4,60E-02	-1,337242168
0,5	ND	ND	ND	ND
0,5	35,72	1,37E+01	5,48E-02	-1,261219442
0,5	ND	ND	ND	ND
0,5	ND	ND	ND	ND
0,5	37,19	4,65E+01	1,86E-01	-0,730487056
0,5	37,09	5,00E+01	2,00E-01	-0,698970004

conclusion : le seuil de détection est supérieur à 0,5 tachy/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
1	33,64	6,45E+02	2,58E+00	0,411619706
1	34,74	2,70E+02	1,08E+00	0,033423755
1	35,07	2,41E+02	9,64E-01	-0,015922966
1	34,17	4,93E+02	1,97E+00	0,294906911
1	34,92	2,72E+02	1,09E+00	0,036628895
1	36,02	1,11E+02	4,44E-01	-0,35261703
1	35,64	1,53E+02	6,12E-01	-0,213248578
1	35,59	1,59E+02	6,36E-01	-0,196542884
1	35,43	1,81E+02	7,24E-01	-0,140261434
1	34,82	2,96E+02	1,18E+00	0,073351702
1	34,71	3,23E+02	1,29E+00	0,111262514
1	34,46	3,92E+02	1,57E+00	0,195346058
1	35,88	1,25E+02	5,00E-01	-0,301029996
1	35,51	1,70E+02	6,80E-01	-0,167491087
1	34,35	4,27E+02	1,71E+00	0,232487866
1	35,11	2,34E+02	9,36E-01	-0,028724151
1	33,75	6,86E+02	2,74E+00	0,438384107
1	34,75	3,12E+02	1,25E+00	0,096214585

conclusion : le seuil de détection est de 1 tachy/mL

Calcul de la contamination

Passage dans la même série, en alternance d'un échantillon positif fort à 100 T/mL et d'un échantillon négatif Répété 12 fois

[C] Tachy/mL	CT	[C] copie/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	27,53	6,61E+04	2,64E+02	2,422261451
100	27,72	5,80E+04	2,32E+02	2,365487985
100	27,65	6,08E+04	2,43E+02	2,385963571
100	28,24	3,99E+04	1,60E+02	2,203032887
100	27,79	5,50E+04	2,20E+02	2,342422681
100	27,71	5,82E+04	2,33E+02	2,366982976
100	27,74	5,72E+04	2,29E+02	2,35945602
100	27,84	5,30E+04	2,12E+02	2,326335861
100	27,81	4,74E+04	1,90E+02	2,277838333
100	27,66	5,27E+04	2,11E+02	2,323870607
100	27,76	4,92E+04	1,97E+02	2,294025094
100	27,51	5,90E+04	2,36E+02	2,372912003
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*

0% de contamination

[C] Tachy/mL	CT	[C] copie/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
1	31,91	1,97E+03	7,88E+00	0,896526217
1	32,99	8,91E+02	3,56E+00	0,551937695
1	35,24	1,72E+02	6,88E-01	-0,16241156
1	37,15	4,27E+01	1,71E-01	-0,76751213
1	33,88	4,65E+02	1,86E+00	0,269512944
1	31,21	3,27E+03	1,31E+01	1,116607744
1	36,65	6,15E+01	2,46E-01	-0,60906489
1	33,09	8,29E+02	3,32E+00	0,520614522
1	34,67	2,62E+02	1,05E+00	0,020361283
1	32,81	1,02E+03	4,08E+00	0,610660163
1	31,78	2,16E+03	8,64E+00	0,936513742
1	35,33	1,62E+02	6,48E-01	-0,18842499
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*
0	*	*	*	*

0% de contamination

évaluation de la stabilité du MIX

évaluation de la stabilité du mix après être resté 3h à température ambiante

à T0 avec deux niveaux de concentrations T100et T1

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	26,29	1,33E+05	5,32E+02	2,725911632
100	26,18	1,45E+05	5,80E+02	2,763427994
100	26,21	1,41E+05	5,64E+02	2,751279104
1	32,88	1,09E+03	4,36E+00	0,639486489
1	37,74	3,13E+01	1,25E-01	-0,902395671
1	35,64	1,44E+02	5,76E-01	-0,239577517

moyenne CT= 26,2266667
 moyenne [C]= 5,59E+02
 biais (100) = -0,11%

moyenne CT= 35,42
 moyenne [C]= 1,69E+00

à T +3h avec deux niveaux de concentrations T100 et T1

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	26,12	1,51E+05	6,04E+02	2,781036939
100	26,18	1,44E+05	5,76E+02	2,760422483
100	26,27	1,36E+05	5,44E+02	2,7355989
1	36,32	8,77E+01	3,51E-01	-0,454940415
1	35,24	1,93E+02	7,72E-01	-0,1123827
1	34,71	2,85E+02	1,14E+00	0,056904851

moyenne CT= 26,19
 moyenne [C]= 5,75E+02
 biais (1) = 0,008 %

moyenne CT= 35,4233333
 moyenne [C]= 7,54E-01

évaluation de la stabilité du prélèvement

évaluation de la stabilité du prélèvement après avoir passé 72 h a température ambiante

à T0 avec deux niveaux de concentrations T100et T1

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	27,74	3,74E+04	1,50E+02	2,174931594
100	28,04	3,02E+04	1,21E+02	2,082066934
100	27,5	4,46E+04	1,78E+02	2,25139485
1	33,56	5,33E+02	2,13E+00	0,3287872
1	35,48	1,31E+02	5,24E-01	-0,280668713
1	33,46	5,73E+02	2,29E+00	0,360214613

moyenne CT= 27,76
 moyenne [C]= 1,50E+02

moyenne CT= 34,1666667
 moyenne [C]= 1,65E+00

à T+72h avec deux niveaux de concentrations t100 et t1

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
100	31,13	3,14E+03	1,26E+01	1,098989639
1	36,14	8,10E+01	3,24E-01	-0,48945499

évaluation de la stabilité du prélèvement

évaluation de la stabilité du prélèvement après avoir passé 72 h à +4°C

à T0 avec 5 T/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
5	31,02	3,59E+03	1,44E+01	1,15715444
5	33,7	4,71E+02	1,88E+00	0,275080898
5	31,96	1,78E+03	7,12E+00	0,852479994

moyenne CT= 32,2266667
 moyenne [C]= 7,79E+00
 biais = 1,24%

à T+72h avec 10 T/mL

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
5	32,24	1,70E+03	6,80E+00	0,832508913
5	31,92	2,17E+03	8,68E+00	0,938519725
5	33,8	5,09E+02	2,04E+00	0,308777774

moyenne CT= 32,6533333
 moyenne [C]= 5,84E+00

réactifs régénérés conservés une semaine à -20°C

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
STD 2	30,01	1,00E+04		
STD 2	29,6	1,00E+04		

biais = -1,36%

réactifs lyophilisés conservés pendant 2 mois à température ambiante

[C] Tachy/mL	CT	[C] copies/ mL	[C] tachy/mL #250#	log [C#250#]
STD 5	26,6	1,00E+07		
STD 5	27,07	1,00E+07		

biais = 1,7%

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

RESUME :

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) est le deuxième agent responsable d'infection congénitale : la transmission transplacentaire du parasite peut être à l'origine de mort fœtale in utero et de lésions post-natales, parfois sévères, principalement cérébrales ou oculaires.

Les pouvoirs publics remettent en question le programme de prévention de la toxoplasmose congénitale établi en 1978, basé sur le dépistage et le suivi sérologique des femmes enceintes séronégatives. En cas de primo-infection pendant la grossesse, la recherche directe du protozoaire dans le liquide amniotique permet d'affirmer la toxoplasmose congénitale. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est aujourd'hui la méthode diagnostique de choix.

L'objectif principal de ce travail était de valider une technique de PCR en temps réel pour la détection d'ADN de *T. gondii* dans le liquide amniotique, selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189 relative aux laboratoires de Biologie Médicale. Le kit commercial TIB MOLBIOL utilisant la technologie FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer), ciblant la séquence répétée REP 529 a été utilisé. L'extraction de l'ADN a été automatisée sur le MagNA Pure 96® et l'amplification validée sur le Light cycler 2.0®. Un contrôle de qualité interne permet de contrôler le processus d'extraction et de détecter une inhibition de la PCR. Les performances de la technique sont satisfaisantes en termes de sensibilité, spécificité, robustesse et de contrôle de la contamination. La limite de détection a été évaluée à 1 toxoplasme par millilitre de liquide amniotique.

L'autre objectif a été de constituer et de déposer le dossier de demande d'autorisation pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale au CHU de Bordeaux auprès de l'Agence Régionale de Santé d'Aquitaine.

TITRE EN ANGLAIS :

Validation of a real-time PCR technique for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA in amniotic fluid and submission of authorization request to the Regional Health Agency for prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis at the CHU of Bordeaux

DISCIPLINE : Biologie Médicale

MOTS-CLES :

Toxoplasma gondii, Diagnostic prénatal, Infection congénitale, Liquide amniotique, Validation de méthode, PCR en temps réel, Séquence répétée REP 529, Norme NF EN ISO 15189 version 2012