



INSTITUT
DE VEILLE SANITAIRE

Surveiller, alerter, prévenir

CNR Toxoplasmose

Rapport d'Activités 2009

Pr I. VILLENA
Coordonnateur du CNR Toxoplasmose
Laboratoire de Parasitologie
Hopital Maison Blanche
45, rue Cognacq Jay
51092 REIMS CEDEX

SOMMAIRE

1- Introduction	p.4
1-1 Contexte du CNR de la toxoplasmose	p.4
1-2 Les missions	p.5
1-3 Résumé: Faits marquants du CNR de la toxoplasmose (année 2009)	p.6
1-4 Organisation du CNR de la Toxoplasmose	p.8
1-5 Locaux et Equipements	p.12
2- Activités d'expertises	p.14
2-1 Capacités techniques du CNR	p. 14
2-2 Activités d'expertise de l'année 2009	p. 17
3 - Activités de surveillance	p.23
3-1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	p.23
3-2 Surveillance de la toxoplasmose en France	p.27
3-3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	p.29
3-4 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens	p.29
4/ Mission d'alerte	p.32
5/ Activites d'enseignement, de formation et de conseil	p.33
6/ Travaux de recherche en lien direct avec l'activite du CNR	p.35
7/ Liste des publications et communications	p.39
8/ Programme d'activite 2009-2010	p.45
8-1 Perspectives du Pôle Epidémiologie	p.45
8-2 Perspectives du Pôle Souches	p.45
8-3 Perspectives du Pôle Sérologie	p.46
8-4 Perspectives du Pôle Biologie Moléculaire	p.46
Conclusion	p.48

Annexes	p.1
Annexe Pôle Epidémiologie	p.2
Annexe 1 : Membres du réseau du CNR de la toxoplasmose.	p.2
Annexe 2 : Membres du réseau national de surveillance ToxoSurv.	p.3
Annexe 3 : Plan d'analyse Toxosurv.	p.6
Annexe 4 : Toxosurv web	p.26
Annexe Pôle Sérologie	p.28
Annexe 1: Guide d'interprétation des serologies toxoplasmiques	p.28
Annexe 2 : Modalités de prise en charge des serologies toxoplasmiques	p.31
Annexe 3 : : Modalités de prise en charge des sérums problématiques	p.32
Annexe 4 : Liste des laboratoires experts	p.34
Annexe 5: Propositions de prise en charge/nomenclature pour le diagnostic biologique de la toxoplasmose	p.37
Annexe Enseignement et Formations	p.39
Résumé des communications	p..45

1/ INTRODUCTION

- Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR en terme de santé publique, son organisation, le cas échéant, la répartition des missions avec son ou ses laboratoires associés et ses principaux partenaires

1-1 Contexte du CNR de la Toxoplasmose

Le Centre National de Référence de la Toxoplasmose a été nommé en janvier 2006 en réponse à l'appel d'offre lancé par l'Institut de veille sanitaire relatif à la création de nouveaux centres de référence, notamment dédié à cette pathologie en particulier. Les principaux objectifs sont une meilleure connaissance épidémiologique de cette maladie en France et une évaluation des pratiques de diagnostic pour tendre à une meilleure standardisation de la prise en charge des patients. Pour répondre à ces objectifs, **le CNR (qui est en charge du Pôle Epidémiologie) est entouré de 3 Laboratoires associés animant 3 Pôles d'activités : Pôle Souches, Pôle Sérologie et Pôle Biologie moléculaire.** Le CNR de la Toxoplasmose s'appuie sur un réseau de laboratoires spécialisés fortement impliqués dans le diagnostic, l'épidémiologie, le traitement de la toxoplasmose et reconnus pour leur domaine d'excellence dans la toxoplasmose (Annexe 1 du Pôle Epidémiologie).

La toxoplasmose est une zoonose transmissible à l'homme et aux animaux (à sang chaud), fréquente et transmise par un parasite protozoaire ubiquitaire. La toxoplasmose est l'une des infections les plus prévalentes en France avec des valeurs de séroprévalence chez l'adulte comprises entre 30 et 60%, variables suivant l'âge, la région géographique et la catégorie socioprofessionnelle. La séroprévalence a varié considérablement depuis 30 ans avec une baisse de prévalence régulière. Généralement bénigne pour l'homme, cette maladie peut cependant être grave dans certaines circonstances :

1/ *Chez la femme enceinte*, la primo-infection toxoplasmique peut être transmise au fœtus et être à l'origine de la toxoplasmose congénitale pouvant entraîner de graves séquelles. Les formes inapparentes paraissent les plus fréquentes à l'heure actuelle mais leur pronostic évolutif demeure incertain (risque de chorioretinites ultérieur). La fréquence et la gravité des toxoplasmoses congénitales ont conduit à la mise en place d'un programme national de dépistage sérologique systématique chez la femme enceinte, avec émission de recommandations de prévention par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France.

2/ *Chez les malades immunodéprimés*, la toxoplasmose est particulièrement sévère, mortelle sans traitement. Elle correspond le plus souvent à la réactivation d'une infection antérieurement acquise. La forte prévalence de la toxoplasmose en France dans la population générale explique la très forte incidence de la toxoplasmose au cours du SIDA avec une diminution des cas observés depuis l'introduction de la chimioprophylaxie et des nouveaux traitements antiviraux. Cependant, ce risque demeure pour d'autres types d'immunodépression (patients atteints de cancer, patients greffés).

3/ *Chez le patient immunocompétent*, des formes graves avec détresse respiratoire aiguë, voire des formes mortelles ont été décrites notamment en Guyane Française. Des formes graves ont aussi été décrites, bien que plus exceptionnellement, sur le territoire métropolitain. Les souches à l'origine de ces cas sévères se sont révélées génétiquement différentes de celles circulant habituellement en France métropolitaine.

Le **diagnostic** de la toxoplasmose repose principalement sur l'étude immunologique. La recherche du parasite ou de son ADN est réalisée chez les patients immunodéprimés, les patients immunocompétents en cas de toxoplasmose virulente, chez les femmes enceintes au décours d'une séroconversion et chez les enfants suspects de toxoplasmose congénitale à la naissance. Actuellement, de nombreux laboratoires français (hospitaliers et privés) ont acquis une expertise technique en matière de diagnostic sérologique, cependant le diagnostic par biologie moléculaire reste encore peu développé et non standardisé. Appliqué au diagnostic anténatal, il est réservé à 23 laboratoires agréés en France.

Un autre objectif du CNR réside dans l'évaluation des pratiques du diagnostic, l'essai de leur standardisation et la diffusion auprès des laboratoires en charge du diagnostic de bonnes pratiques d'analyses. Des guides d'interprétations des résultats doivent être rédigés par le CNR et diffusés à l'ensemble des professionnels de santé.

1-2 Les missions :

Le CNR Toxoplasmose a pour objectif général de répondre aux besoins exprimés par les gestionnaires de santé, les cliniciens et les biologistes, en termes d'épidémiologie et de diagnostic de la toxoplasmose sous toutes ses formes, mais aussi de soutien aux études portant sur le traitement et la prévention de la toxoplasmose congénitale et de la toxoplasmose chez l'immunodéprimé.

Missions de contribution à la surveillance :

En 2006, lors de la création de ce CNR, un des objectifs majeurs était de contribuer à l'évaluation de la pertinence du programme national de prévention de cette maladie, programme instauré depuis 1978 en France. Pour cela, l'InVS en partenariat avec le Pôle Epidémiologie du CNR a proposé d'établir un système de surveillance nationale de la toxoplasmose congénitale basé sur une notification des cas. Ce système de surveillance a été initié en 2006 et recueille les données des cas de toxoplasmoses congénitales en France depuis 2007.

Un des objectifs du CNR est de mieux connaître l'épidémiologie des souches de toxoplasmes en France métropolitaine et DOM-TOM et d'étudier ainsi la biodiversité de *T. gondii*. Pour cela, le Pôle Souches est en charge de collecter les souches issues des prélèvements cliniques, de les caractériser (d'un point de vue clinique et génotypique), les comparer aux souches circulant dans le monde et le cas échéant, alerter les autorités sanitaires de la survenue de cas groupés dus à des génotypes identiques ou voisins. Le CNR, grâce à une collaboration étroite avec le Laboratoire National de Référence « Parasites transmis par les aliments » (AFSSA-LERPAZ) assure également une comparaison des souches humaines avec celles isolées dans l'environnement (notamment les souches isolées des animaux qui transmettent la maladie).

Un Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma est intégré à ce Pôle en partenariat avec le Pôle Epidémiologie (inclusion des souches collectées dans le cadre du CNR dans le CRB). Avec le Pôle Epidémiologie, il contribue à l'étude de la circulation de la toxoplasmose chez l'animal notamment pour mieux identifier les sources de contamination humaine.

Un autre objectif du CNR est de mieux identifier les sources de transmission de la toxoplasmose ; en effet à l'heure actuelle nous constatons une absence de connaissance sur le poids respectif des modes de contamination en cas d'infection toxoplasmique. Aucun moyen diagnostique ne permet de faire la part dans la contamination alimentaire entre celle due à l'ingestion de viande (contamination par les kystes) et celle due à la consommation de végétaux (contamination par les oocystes), ou encore dans le risque de contamination hydrique (seulement des données d'infections d'origine hydrique rapportées dans la bibliographie). Un programme de recherche ANR (Programme ALIA, Protofood a été obtenu en 2009 pour mettre en place des techniques de détection des parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Toxoplasma*) dans différentes matrices alimentaires.

Mission d'alerte :

Les Centres de Référence doivent transmettre à l'InVS et la DGS l'identification de cas groupés de la maladie et pour cela une centralisation des données est nécessaire. Le CNR participe grâce au maillage national des laboratoires du réseau, à la mise en place d'un relevé des cas de toxoplasmoses en lien avec l'InVS. La recherche dans des conditions épidémiologiques particulières, de souches de toxoplasmes génétiquement différentes des souches usuelles (et que l'on sait associées à des pathologies sévères), participe à cette mission d'alerte.

Mission de conseil :

Elle doit être assurée aux professionnels de santé notamment pour un meilleur dépistage et des conseils actualisés de prévention sur la transmission, conseils sur le diagnostic et le traitement. Un guide des bonnes pratiques est en cours de rédaction par le Pôle Sérologie pour assurer le diagnostic immunologique dans les meilleures conditions, il est destiné notamment aux laboratoires privés ou de CHG ayant recours aux laboratoires des CHU lors de difficultés d'interprétation ou de datation d'une infection en particulier chez la femme enceinte. Un guide des bonnes pratiques doit être également rédigé par le Pôle Biologie Moléculaire, destiné aux laboratoires prenant en charge le diagnostic de cette affection par PCR, en particulier dans le cadre du diagnostic prénatal de la toxoplasmosse congénitale.

1-3. Résumé: Faits marquants du CNR de la toxoplasmosse (année 2009).

Les activités de surveillance se sont traduites par la rédaction d'un article (à paraître dans Eurosurveillance) décrivant l'analyse des cas de toxoplasmoses congénitales diagnostiqués en France en 2007. Ces activités ont continué la poursuite de l'animation du réseau « Toxosurv » en charge de la notification des cas diagnostiqués dans l'année 2008 (évaluation en 2009) et ceux diagnostiqués en 2009 (évaluation en 2010). La mise en place de ce système de surveillance a été publiée dans le BEH (8 avril 2008 / n° 14-15 ; p122-124) et la nécessité au cours de l'année 2009, une mise à jour des laboratoires participants suite aux notifications recensées en 2007 et 2008. Outre le nombre de laboratoires dits spécialisés dans ce diagnostic (n= 35) ; le nombre de laboratoires participants au réseau de surveillance est passé de 74 laboratoires (année 2007) à 13 (année 2008) et 16 (année 2009). Ce réajustement a été effectué par appel de tous les laboratoires s'étant déclarés comme potentiellement participants (effectuant le diagnostic de toxoplasmosse congénitale) et n'ayant notifié aucun cas depuis 2007. Une majorité de LBAM hors laboratoires spécialisés ont précisé transmettre leurs examens biologiques vers un centre spécialisé (le plus souvent CHU) pour confirmation des cas. Ainsi, l'exhaustivité du recueil des cas de toxoplasmosse congénitale diagnostiqués en France paraît satisfaisante en reposant sur l'ensemble des laboratoires spécialisés (recueillant la majorité des diagnostics posés sur le territoire français) auxquels 16 laboratoires polyvalents (privés ou CH, dernière actualisation fin décembre 2009) s'ajoutent car posant le diagnostic de façon occasionnelle (1 à 3 cas par an). La liste des membres du réseau Toxosurv est indiquée en Annexe 2 du Pôle Epidémiologie.

Au cours de l'année 2009, le programme statistique développé spécifiquement pour l'analyse des résultats a été revu par le pôle Epidémiologie et avec les membres du comité de pilotage Toxosurv défini par l'Invs. Ce programme permet une meilleure lisibilité des résultats en les exprimant sous différents chapitres décrivant le réseau Toxosurv de recueil des cas (analyses par centres), l'épidémiologie de l'affection (caractéristiques des infections), les performances de diagnostic et l'évaluation du poids de la maladie par recueil des informations cliniques sur les cas diagnostiqués. L'ensemble de ces données permet de recueillir des indicateurs remarquables qui seront suivis au cours du temps pour connaître l'évolution de la maladie. Par ailleurs, un programme de contrôle automatique des cohérences a été développé par le CNR Coordonateur afin de permettre une meilleure analyse de la base de données (recueillies grâce au logiciel spécifique « Toxosurv », Voozoo) et un gain de temps pour la relance des informations à recueillir auprès des centres notifiants les cas.

Une alerte sur la présence de cas groupés de toxoplasmose (16 patients avec pour certains une virulence particulière d'un point de vue clinique) a été donnée fin décembre 2008 par un des laboratoires membre du Pôle Epidémiologie (CHU de Montpellier, Dr Pratlong). Une investigation a été conduite par la CIRE Languedoc Roussillon en collaboration avec le CNR et l'Invs. Une autre alerte est venue secondairement à la consommation de viande de cheval crue ; la viande importée du continent américain (Canada) est apparue comme une source potentielle de la circulation en France métropolitaine de génotypes atypiques, à l'origine d'un cas sévère (mortel) en 2009 chez un patient à l'état général altéré par une pathologie sous-jacente.

Un objectif important pour la surveillance et le cas échéant l'alerte, réside dans la **collecte des souches responsables de toxoplasmose en vue de leur caractérisation génotypique et de leur conservation** pour des études ultérieures. Le nombre de prélèvements adressés au pôle souche du CNR a augmenté de 37% en 2009 par rapport à l'année précédente. En 2009, sur les 189 prélèvements reçus, 64% proviennent de cas de toxoplasmose congénitale, 13,2% de toxoplasmoses systémiques de patients immunodéprimés, 16,9% de cas de toxoplasmoses oculaires. Les prélèvements provenant de cas de toxoplasmoses acquises systémiques restent rares. Le génotypage confirme la prédominance du type II (89,65% des cas), l'implication du génotype Africa 1 chez des patients africains, le rôle des génotypes atypiques dans des formes sévères de toxoplasmoses acquises ou congénitales.

L'aspect de conservation des isolats a été pris en compte avec la constitution du Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma depuis 2002 ; l'année 2009 a été marquée par la démarche de certification du CRB *Toxoplasma* adossé au pôle souches du CNR. La certification selon la norme CRB 96900 a été obtenue le 12/01 2010. Cette démarche a été l'occasion de remettre en ordre la banque de souches mais aussi celle des extraits d'ADN toxoplasmiques, avec une dénomination plus anonymisée des différents prélèvements....

Pour répondre aux objectifs d'évaluation des pratiques de diagnostic et des réactifs commercialisés ou disponibles pour le diagnostic immunologique et par biologie moléculaire, les deux Laboratoires associés en charge de ces activités ont effectué plusieurs enquêtes nationales et ont mis en place des comparaisons de méthodes.

Une biothèque (incluant les panels de l'AFSSA) est constituée permettant l'évaluation des kits de diagnostic immunologique commercialisés en France (techniques manuelles et automatisées). Les modalités d'expertise des réactifs sérologiques ont été définies permettant une analyse objective des réactifs par les laboratoires membres du Pôle Sérologie, cette étude débutée en 2008 s'est poursuivie en 2009 en testant les réactifs commercialisés sur les sérums délicats ou à problème (voir chapitre Expertise).

Le guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques (avec logigrammes d'interprétation) rédigé par le Pôle au cours de l'année 2008 a été finalisé en 2009 et validé par l'ensemble des membres du CNR au cours de la réunion annuelle organisée en septembre à Reims ; de même les deux questionnaires sur les pratiques dans le diagnostic sérologique ont permis de rédiger un document sur les modalités de prise en charge des sérologies toxoplasmiques et des sérologies problématiques.

Comme les années précédentes, l'activité du Pôle Biologie moléculaire a été principalement concentrée autour de **l'évaluation des méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose**.

Depuis 2008, l'objectif d'homogénéisation des méthodes de diagnostic moléculaire à un niveau national a fait place, de façon plus pragmatique, à celui de proposer des seuils de détection minimum qui devraient être atteints par les laboratoires effectuant ce diagnostic moléculaire. Ces seuils seront définis grâce à des contrôles de qualité externes plus fins que ceux actuellement proposés (tant au niveau national qu'au niveau européen). La définition de ces seuils est en cours de réalisation au sein du Pôle.

L'élaboration d'un matériel biologique de référence dit "étalon", discriminant, robuste, reproductible, et en grande quantité, avait été en grande partie atteint en 2008. Il s'agit d'échantillons lyophilisés, mimant les échantillons cliniques et élaborés à diverses concentrations de Toxoplasmes. Un net progrès a été enregistré en 2009 avec l'utilisation de toxoplasmes provenant de cultures *in vitro*, rendant ce matériel plus stable.

Le Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose a été renouvelé en 2009 sous l'égide du CNR, basé sur une gamme de deux concentrations basses de toxoplasmes, préparées avec le matériel étalon cité ci-dessus. Il a été suivi par l'ensemble des laboratoires de CHU possédant l'agrément pour le DPN de la toxoplasmose. Les résultats montrent encore un progrès par rapport à l'année précédente, puisque tous les laboratoires ont trouvé positif au moins un des deux échantillons avec une concentration faible de parasites et aucun faux positif n'a été relevé pour la quatrième année consécutive.

Les études comparatives multicentriques ont pour objectif majeur d'évaluer et de classer les différentes méthodes de diagnostic moléculaire utilisées dans les laboratoires impliqués dans le Pôle. Les deux études menées en 2007 ont été ou sont en cours de publication. Une étude plus ciblée visant les très faibles concentrations en Toxoplasmes a été réalisée ainsi qu'une évaluation d'une trousse commerciale de PCR en comparaison avec deux techniques « maison » utilisant la même cible ADN. Une étude préliminaire a été réalisée afin de valider l'utilisation de la cible ADN rep529 pour la quantification absolue de la charge parasitaire dans les liquides amniotiques par PCR temps réel. Les différents résultats sont indiqués dans le chapitre Expertise du rapport.

L'enquête sur les pratiques de PCR dans le domaine de la toxoplasmose montre une évolution lente vers une relative homogénéisation des méthodes, avec en particulier une restriction de la diversité des amorces utilisées. La PCR-ELISA a disparu et un seul centre se repose désormais uniquement sur de la PCR conventionnelle. D'autres aspects concernant les méthodes d'extraction, le nombre de réactions nécessaires, l'utilisation de témoins négatifs et positifs, les mesures de prévention des contaminations etc. ont été abordés. Cette enquête a fait l'objet d'un retour d'information à tous les participants.

1-4 Organisation du CNR de la Toxoplasmose

Un Laboratoire Coordonnateur et 3 Laboratoires Associés assistés par un groupe de travail (Laboratoires Supports) assurent les missions du CNR en s'appuyant sur un réseau national de laboratoires spécialisés et reconnus dans le diagnostic, l'épidémiologie et le traitement de cette affection. Des **Laboratoires Supports** (n= 17) constituent des groupes de travail au sein de chaque Pôle. Les groupes de travail apportent un soutien au Laboratoire Associé ; ils sont coordonnés par les Responsables des Pôles auxquels ils sont rattachés.

Des **Laboratoires Réseau Supports** (n= 28), constitués par l'ensemble des laboratoires qui ont manifesté leur souhait de participer aux activités du CNR. Ces laboratoires constituent un maillage national des laboratoires ayant en charge le diagnostic des toxoplasmoses. Ils fournissent des informations d'ordre épidémiologique, envoient les souches isolées de patients, mettent à disposition leur sérothèque, peuvent participer à diverses études visant à une standardisation de techniques. Ces laboratoires de CHU sont, à un échelon local, référents pour les laboratoires hospitaliers et privés dont ils sont un interlocuteur constant, ils sont notamment en première ligne pour la mission d'alerte sur l'apparition de cas groupés.

Total ETP affecté CNR Toxoplasmose en 2007 : 7,15 ETP participent au fonctionnement du CNR

Organigramme global

Biologistes :	PU-PH	1,4 ETP	;	MCU-PH/ PH	3 ETP
Techniciens :		1,15 ETP			
Secrétariat :		1 ETP			
Attaché de Recherche Clinique		0,6 ETP			

Organigramme par laboratoire

Laboratoire Coordonnateur (CHU Reims)

Pr. I. Villena, Responsable de la Coordination du CNR et Responsable du Pôle Epidémiologie

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance (organisme payeur)	Temps consacré (% ETP)
Isabelle VILLENA	PU-PH, Chef de Service	CHU /Université Reims EA3800	30%
<i>Dominique AUBERT</i>	<i>MCU-PH</i>	<i>CHU /Université Reims</i>	10%
Cathy CHEMLA	PH	CHU Reims	5%
Laurence DUBOIS	Secrétaire	CHU Reims	50%
<i>Naima ORTIS</i>	<i>Technicienne</i>	<i>CHU Reims</i>	25%
Régine GEERS	Technicienne	CHU Reims	10%
Christelle DELMAS	ARC	CHU Reims/ InVS	30%
Laboratoires support			
Marie-Laure DARDÉ	<i>PU-PH</i> Chef de Service	Université Limoges/CHU	10%
Thierry ANCELLE	MCU-PH	Université Paris 5 /Cochin	10%
Philippe THULLIEZ	Chef de service	Institut Puériculture/IPP	10%
Francine PRATLONG	MCU-PH	Université Montpellier/CHU	10%
Pierre MARTY	PU-PH	Université Nice/CHU	10%
Nicole FERRET	PH	CHU Nice	10%
Marie-Hélène BESSIERES	MCU-PH	Université Toulouse/CHU	10%
P. BATIGNE	Adjoint technique .	CHU Toulouse	5%
Joëlle VIGUIE	Technicienne	CHU Toulouse	5%
Bernard CARME	PU-PH	Université Antilles-Guyane / CH Cayenne	10%
<i>Stéphane SIMON</i>	<i>Technicien</i>	<i>Université Antilles-Guyane/</i>	10%

Laboratoire Associé Pôle Souches : Epidémiologie moléculaire et Chimiosensibilité (CHU Limoges)

Pr. M L Dardé, Responsable

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance (organisme payeur)	Temps consacré
Marie-Laure DARDÉ	<i>PU-PH</i> Chef de Service	Université Limoges/CHU	20%
Daniel Ajzenberg	MCU-PH	Université Limoges/CHU	20%
Homayoun RIAHI	ARC	CHU Limoges	30%
Laboratoires support			
<i>Dominique AUBERT</i>	<i>MCU-PH</i>	<i>CHU /Université Reims</i>	10%
<i>Naima ORTIS</i>	<i>Technicienne</i>	<i>CHU Reims</i>	25%
Francis Derouin	PU-PH Chef de Service	Université Paris 7	10%
Pascale Meneceur	Ingénieur d'Etudes	Université Paris 7	10%
Magali Demar	Médecin, PH	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	10%

En italique personnes impliqués dans les deux Pôles

Laboratoire Associé Pôle Sérologie ((CHU/Université Louis Pasteur Strasbourg)

Pr E. Candolfi, Responsable

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance	Temps consacré
Laboratoire associé			
CANDOLFI Ermanno	PU-PH	ULP de Strasbourg	10%
VILLARD Odile	MCU-PH	ULP de Strasbourg	20%
FILISSETTI Denis	MCU-PH	ULP de Strasbourg	5%
DODERER Cécile	Ingénieur	ULP de Strasbourg	30%
BACHMANN Michèle	Secrétaire	ULP de Strasbourg	30%
LIENHARDT Elisabeth	Technicien	ULP de Strasbourg	30%
HOFFMANN Estérina	Bibliothécaire	ULP de Strasbourg	10%
Laboratoires support			
CIMON Bernard	MCU-PH	CHU/ Université Angers	10%
<i>PELLOUX Hervé</i>	PU-PH	CHU/ Université Grenoble	10%
FRICKER HIDALGO Hélène	PH	CHU/ Université Grenoble	10%
FRANCK Jacqueline	MCU-PH	CHU/ Université Marseille	10%
HOUZE Sandrine	MCU-PH	CHU/ Université Paris-Bichat	10%
PARIS Luc	PH	CHU/ Université Paris- Pitié Salpétrière	10%
GODINEAU Nadine	PH	CHG Saint-Denis	10%

Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire (CHU Montpellier)

Pr P. Bastien, Responsable

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance	Temps consacré
Laboratoire associé			
BASTIEN Patrick	PU-PH	CHU/Université Montpellier	10%
STERKERS Yvon	AHU	CHU/Université Montpellier	20%
VARLET M Emmanuelle	Praticien attaché	CHU/Université Montpellier	30%
LAMI Joelle	Secrétaire	CHU Montpellier	3%
DOUZOU Sylvie	Technicien	CHU Montpellier	5%
BRESSON Guillaume	Technicien	CHU Montpellier	5%
Laboratoires support			
BONNIN Alain	PU-PH	CHU/Université Dijon	5%
DALLE Frédéric	MCU-PH	CHU/Université Dijon	10%
<i>PELLOUX Hervé</i>	PU-PH	CHU/ Université Grenoble	5%
BRENIER PINCHART M Pierre	MCU-PH	CHU/ Université Grenoble	10%
DELHAES Laurence	MCU-PH	CHU/ Université Lille	10%
YERA Hélène	MCU-PH	CHU/ Université Paris Cochin	10%
BRUN Sophie	H	CHU/ Université Paris Salpétrière	10%
CASSAING Sophie	MCU-PH	CHU/ Université Toulouse	10%
FILISSETTI Denis	MCU-PH	ULP de Strasbourg	10%

En italique personnes impliqués dans les deux Pôles

Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation...

Tous les laboratoires membres du CNR de la Toxoplasmose sont en démarche qualité et tous ont rédigé leurs procédures selon le GBEA.

Le Laboratoire coordonnateur et les trois Laboratoires Associés sont en phase active d'accréditation et disposent d'un référentiel qualité sous la responsabilité du chef de service et d'un responsable qualité.

Pour le **Laboratoire du Pôle Epidémiologie**, un PH (Dr Foudrinier) est dédié à la qualité, elle est titulaire d'un DIU de Qualité (Marseille, diplôme 2007). Ce PH assure la qualité des procédures instaurées dans le laboratoire qui a déjà bénéficié de 3 audits externes qualité. Deux techniciennes ont suivi une formation à l'audit et procèdent à des audits internes des différents secteurs diagnostic. Le laboratoire est engagé dans une démarche d'accréditation pour le diagnostic de la toxoplasmose (norme ISO 1589).

Le Dr Foudrinier est également en charge de l'assurance qualité du CRB Toxoplasma dont la localisation est double (Reims et Limoges/Pôle Souches), le CRB Toxoplasma a été certifié le 12/01/2010 selon le référentiel AFNOR NF 96-900 (suite à l'obtention d'un programme ANR dédié à la certification des CRB en France obtenu en 2006, I.Villena). La co-localisation de la banque à Reims et à Limoges renforce la sécurité de la conservation des échantillons, la réception des prélèvements, leur mise en cryobanque font l'objet de procédures écrites selon le référentiel AFNOR. Le transport des prélèvements est assuré par un transporteur agréé. Cette démarche de certification a été accompagnée par un ingénieur qualité déléguée par l'INSERM. En outre, le CRB Toxoplasma a intégré le réseau européen des CRB (BBMRI) et bénéficie du label IBiSA. **Etant donné l'intrication étroite entre les activités de CRB Toxoplasma et du Pôle souches du CNR Toxoplasmose, cette démarche qualité du CRB retentit sur le niveau de qualité du CNR.** Ainsi, pour le **Laboratoire du Pôle Souches**, cette démarche a été l'occasion de remettre en ordre la banque de souches mais aussi celle des extraits d'ADN toxoplasmiques, avec notamment une dénomination plus anonymisée des différents prélèvements

Le Laboratoire du Pôle Sérologie est engagé dans une démarche d'accréditation pour la portée « diagnostic biologique de la toxoplasmose » (norme ISO 15189) avec mise en place de comités de pilotage pré et post analytique, analytique, hygiène /sécurité, informatique, métrologie, commandes et ressources humaines. Les phases pré et post analytiques sont finalisées. La démarche qualité a conduit à mettre en place :

- Un système de signalement des non conformités avec suivi des actions menées en vue d'améliorer le fonctionnement du laboratoire
- Un nouveau contrôle de qualité externe qui s'ajoute à celui de l'AFSSAPS et de Biologie Prospective : UK National External Quality Assessment Service For Microbiology (London)
- Une validation interne des techniques utilisées au sein du laboratoire par la réalisation de tests de reproductibilité, répétabilité selon les recommandations publiées dans le guide de validation en biologie médicale du COFRAC.
- Un contrôle de qualité interne journalier pour les techniques ELISA, immunofluorescence et ELISA IgG avidité.

Le laboratoire élabore et évalue des réactifs employés pour la mise au point de réactifs de diagnostic *in vitro* dans le cadre de contrat de collaboration entre l'industrie et l'université.

Le Laboratoire du Pôle de Biologie moléculaire a commencé la mise en place du GBEA en 1998. Il a mis en route un système de management de la Qualité dès 2006, avec une déclaration de Politique Qualité début 2007. Des réunions Qualité ont lieu de façon mensuelle entre tous les biologistes du laboratoire, l'un des deux RAQ et la Direction.

Le secteur "pilote" pour tous les axes Qualité du Laboratoire a toujours été le secteur de Biologie moléculaire. Ce dernier a une réunion Qualité (avec suivi des actions d'amélioration) réunissant tous les acteurs concernés sur un rythme trimestriel. Il participe à un contrôle de Qualité externe européen (QCMD) une fois par an.

Le laboratoire est globalement engagé dans une démarche d'accréditation (au mieux à l'horizon 2013).

Par ailleurs, le Laboratoire-Support de Toulouse a reçu l'Accréditation COFRAC depuis Septembre 2006 (numéro 1-1769), pour :

- les techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic de la Toxoplasmose
- la recherche d'ADN parasitaire par PCR.

La démarche qualité a conduit à mettre en place dans chacun des quatre laboratoires du CNR:

- Un système de signalement des non conformités avec suivi des actions menées en vue d'améliorer le fonctionnement du laboratoire.

- Des contrôles de qualité externe nationaux et européens en particulier pour le diagnostic de la toxoplasmose par biologie moléculaire (contrôle QCMD). Le contrôle national de qualité pour cette activité est d'ailleurs organisé par le Pôle Biologie moléculaire du CNR.

- Une validation interne des techniques utilisées au sein du laboratoire par la réalisation de tests de reproductibilité, répétabilité selon les recommandations publiées dans le guide de validation en biologie médicale du COFRAC. Comparaison avec les données fabricants.

1-5 Locaux et Equipements

Les locaux équipements des différents laboratoires (Coordonnateur et Laboratoires Associés) sont décrits ici. Le CNR dispose des équipements nécessaires pour les études sérologiques (automates de sérologie et techniques manuelles) et en biologie moléculaire pour le diagnostic (PCR temps réel et PCR conventionnelle) et le cas échéant la caractérisation des souches (séquenceur, PCR-RFLP...). **La diversité des automates présents dans les différents laboratoires constituant le CNR (laboratoires coordonnateur, associés et supports) pour les activités de sérologie et de biologie moléculaire, permet d'assurer une expertise complète dans ces domaines.**

Les laboratoires disposent de hottes PSM et d'animaleries (zone A2) pour la récolte et l'entretien des souches et de cryoconservateur à azote liquide sécurisé pour leur stockage. Les Pôles Epidémiologie et Souches ont développé un logiciel spécifique à la gestion des souches incluses dans le CRB Toxoplasma avec traçabilité complète des échantillons et des événements.

Les locaux sont en adéquation avec la réglementation actuelle notamment celle spécifique à la biologie moléculaire. Les Laboratoires du CNR (Coordonnateur et Associés) possèdent l'agrément pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose incluant des locaux dédiés.

En complément, les Laboratoires supports mettent à disposition leurs locaux et équipements pour participer aux activités du CNR.

Laboratoire Coordonnateur CNR : (CHU Reims)

- Locaux universitaires (locaux de recherche, surface : 220m²). Ces locaux regroupent des pièces de culture cellulaire, biologie moléculaire.

- Locaux hospitaliers (800m² dont surface dédiée au CNR : 100 m²). Ces locaux sont partagés entre les pièces dévolues au Centre de Ressources Biologiques (pièce de cultures cellulaires avec recueil de souches, multiplication des souches et cryoconservation dans pièce spécifique), une pièce où sont effectuées les sérologies, des locaux dédiés à la biologie moléculaire (en conformité avec la réglementation) et une animalerie agréée à l'intérieur du laboratoire.

Adresse : Laboratoire Parasitologie-Mycologie, Hôpital Maison Blanche, CHU Reims, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 REIMS CEDEX

Laboratoire Associé Pôle Souches : (CHU Limoges)

L'activité du CNR du Pôle souches se déroule dans les locaux du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Limoges où environ 40 m² sont consacrés à cette activité dans plusieurs pièces du laboratoire. Des locaux spécifiques sont dédiés aux activités de biologie moléculaire (en conformité avec la réglementation) et a accès à une animalerie agréée. Une partie du typage moléculaire des souches est réalisée sur les locaux universitaires voisins du CHU.

Adresse : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Dupuytren, CHU de Limoges,

La partie chimiosensibilité des souches est réalisée dans les locaux du laboratoire de Parasitologie du CHU Saint Louis (EA 3520, Paris 7) et dans les locaux du CHU de Reims.

Laboratoire Associé Pôle Sérologie (CHU/Université Louis Pasteur Strasbourg)

Le Laboratoire situé au sein de l'Insitut de Parasitologie Tropicale (surface de 2000 m²), est constitué de trois entités : (i) un laboratoire de parasitologie et de mycologie médicale de 1500 m² agréé par le ministère de la santé pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose (ii) une équipe pédagogique participant aux enseignements dans différents UFR; (iii) une équipe d'accueil reconnue par le ministère (4 hospitalo-universitaires et trois chercheurs INSERM).

Le laboratoire dispose de locaux équipés en immunologie, en biologie moléculaire (en conformité avec la réglementation) ainsi que d'une animalerie agréée. En biologie moléculaire, il dispose également de locaux. Ces outils sont employés non seulement pour le diagnostic mais également pour des expertises. Le laboratoire dispose aussi d'une animalerie agréée et d'un laboratoire de cultures cellulaires.

Adresse : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU/Université Louis Pasteur Strasbourg, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg.

Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire : (CHU Montpellier)

Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie a déménagé au cours de l'année 2009 vers des locaux neufs, plus modernes, plus fonctionnels et toujours spacieux.

Le laboratoire est installé sur une surface totale de 1330 m² (surfaces utiles) sur 2 étages (650 m² au rez-de-chaussée et 680 m² à l'étage), dont 330 m² dédiés à la recherche. L'unité de diagnostic moléculaire proprement dit (C.H.U.) occupe environ 130 m².

Il n'y a pas de pièces dédiées spécifiquement au Pôle BM du CNR Toxoplasmose, mais l'activité de ce dernier se déroule dans les locaux dévolus uniquement au diagnostic moléculaire. Ce "plateau" de biologie moléculaire comporte deux grandes salles (chacune faite de trois boxes) en surpression, dédiées à la phase pré-amplification, une salle en dépression dédiée à la post-amplification, et un bureau. Des mesures très strictes de confinement et de séparation y sont imposées (personnel autorisé, surblouses, surchaussures etc...).

Le tableau ci-dessous détaille ces pièces.

Secteur	N° pièce	Niveau	Surface	Fonction
Bureaux	PAR1002	1 ^{er} étage	20 m ²	Responsable Pôle Biologie Moléculaire CNR Toxoplasmose
	PAR0012	RDC	13 m ²	- Responsable Diagnostic moléculaire Toxoplasmose - Praticien Attaché Diagnostic moléculaire Toxoplasmose / CNR Toxoplasmose
	PAR0041	RDC	30 m ²	Secrétariat, Expédition
Diagnostic moléculaire	PAR0021	RDC	18 m ²	Pièce technique Pré-amplification
	PAR0022	RDC	18 m ²	Pièce technique Pré-amplification
	PAR0025	RDC	33 m ²	Pièce technique Amplification et Post-amplification (PCR en temps réel)

Dans le domaine particulier des activités de référence (biologie moléculaire), le laboratoire possède les locaux et équipements en adéquation avec les missions proposées (animalerie agréée, pièces de biologie moléculaire notamment).

Par ailleurs, les activités du Pôle BM du CNR Toxoplasmose empruntent occasionnellement des locaux à d'autres UFR à Montpellier pour la préparation du Contrôle de Qualité national en diagnostic prénatal de la toxoplasmose : Laboratoire de Bactériologie, UFR de Pharmacie, et UMR 5235 (DIMNP), UFR Sciences.

Adresse : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, C.H.U. de Montpellier, 39 Av. Charles Flahault (site Antonin Balmès), 34295 Montpellier cedex 5.

2/ ACTIVITES D'EXPERTISE

2-1 Capacités techniques du CNR

2-1-1 Liste des techniques :

- Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux
- Techniques disponibles
- Techniques développées l'année N: brève description (principes, validation)
- Techniques en développement : principes et état d'avancement

Pour remplir ses missions notamment les missions épidémiologiques et de typage des souches toxoplasmiques collectées par l'ensemble des laboratoires français appartenant au réseau du CNR ; les Pôles Epidémiologie et Souches disposent de plusieurs techniques :

- ***Techniques disponibles***

Les techniques de typage des souches ou ADN parasites par des techniques de biologie moléculaire reposent en 2009 sur les mêmes marqueurs que ceux indiqués en 2008 : 11 marqueurs microsatellites et 3 marqueurs de PCR-RFLP. Le séquençage des gènes GRA6, GRA7 et de certains marqueurs microsatellites est rajouté pour certaines souches atypiques.

- ***Techniques développées l'année 2009:***

Une technique PCR multiplex permettant d'amplifier lors d'une seule PCR les 11 marqueurs microsatellites, a été développée. Dans le cadre d'une démarche qualité, mise en place d'un contrôle interne en simple aveugle avec tous les 6 mois, extraction anonymisée de l'ADN de la souche PRU ou NED maintenue en souris, suivi d'un génotypage. La validation de l'extraction et du génotypage se fait par comparaison du génotype obtenu avec le génotype attendu.

- ***Techniques en développement :*** principes et état d'avancement

Quatre autres marqueurs microsatellites ont été définis. Ils seront ajoutés au génotypage à partir de 2010.

- Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles
 - o Microsatellites (site de Limoges) :
 - marqueurs permettant la définition du type : *TUB2, TgM-A, M33, W35, B17, B18* (Ajzenberg et al. 2005 ; Blackston et al. 2001),
 - marqueurs plus polymorphes pour épidémiologie moléculaire, traçage des épidémies ou cas groupés : *N60-N82-AA* (Ajzenberg et al. 2002), *M48-M102* (Blackston et al. 2001)
 - o PCR-RFLP sur gènes *SAG2, SAG1, GRA7* (site de Reims)
 - o Séquençage de *GRA7, GRA6*, microsatellites

Pour remplir ses missions d'évaluation du diagnostic sérologique (pratique du diagnostic et interprétation des résultats) les Laboratoires Associés correspondant au Pôle Sérologie disposent des techniques classiques commercialisées et diffusées aux laboratoires de biologie polyvalente et de techniques « maison » ou spécifiquement développées au sein des laboratoires du réseau du CNR et des laboratoires associés permettant une expertise des sérologies « à problème ».

Une biothèque (incluant les panels de l'AFSSA) **est constituée permettant l'évaluation des kits de diagnostic immunologique** commercialisés en France (techniques manuelles et automatisées). Les modalités d'expertise des réactifs sérologiques ont été définies permettant une analyse objective des réactifs par les laboratoires membres du Pôle Sérologie. Les résultats (partiels) sont disponibles dans le rapport.

Le guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques a été validé par le groupe de travail du Pôle Sérologie et les membres du réseau lors de la réunion annuelle du CNR (25-26 septembre 2009), ainsi que les deux questionnaires sur les pratiques dans le diagnostic sérologique.

- **Techniques disponibles:**

Toutes les techniques utilisant des méthodes ELISA sont disponibles au sein du laboratoire associé et des laboratoire supports, permettant de tester l'ensemble des trousse commercialisées pour le diagnostic immunologique de la toxoplasmose ; en outre ces laboratoires possèdent les techniques de référence (immunofluorescence, agglutination directes, western-blott) et ont la capacité d'avoir recours au dye-test (laboratoire du Pôle Souches à Limoges ou laboratoire de l'IPP. (Voir partie expertise du rapport).

Pour remplir ses missions d'évaluation du diagnostic par biologie moléculaire (pratique du diagnostic et interprétation des résultats) les Laboratoires Associés correspondant au Pôle Biologie moléculaire disposent de techniques « maison » ou spécifiquement développées au sein des laboratoires du réseau du CNR et des laboratoires associés. L'accès à ces techniques est plus restreint dans le cadre du diagnostic moléculaire (comparativement au diagnostic sérologique) étant donné l'indisponibilité de trousse commercialisées, cette pratique est donc réservée aux laboratoires de CHU et aux laboratoires agréés pour le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale.

La recommandation de pratiques et de techniques/méthodes de diagnostic moléculaire fait partie des objectifs de ce Pôle. Néanmoins, cet objectif a été placé en deuxième intention en raison de la complexité des analyses (toutes "artisanales"), ce qui implique des études comparatives poussées avant de pouvoir parvenir à un consensus sur ce sujet délicat (voir activités d'expertise).

- **Techniques disponibles:**

La constitution du Pôle "Biologie moléculaire" permet de disposer d'un vaste panel de techniques de diagnostic moléculaire, représentatif des méthodes utilisées au niveau national et essentiel pour les études comparatives : PCR conventionnelle avec révélation sur gel, PCR conventionnelle avec révélation en ELISA, PCR en temps réel utilisant diverses technologies (Light-Cycler + sondes FRET, ABI Prism + sondes TaqMan, ABI Prism + sondes Taqman MGB). (Voir partie expertise du rapport).

Par ailleurs, plusieurs membres du Pôle possèdent une expertise importante dans la préparation de toxoplasmes destinés à fabriquer des échantillons artificiels pour les études en réseau

- **Techniques développées l'année 2009 :**

Laboratoire associé de Montpellier

- Adaptation de la PCR quantitative en temps réel ciblant la séquence répétée rep529 de *Toxoplasma gondii* par LightCycler (Roche®) avec les amorces de Reischl et al.
- Extraction ADN de *T. gondii* à l'aide de l'automate d'extraction Magpure Compact (Roche®) (encore en cours d'évaluation).

Laboratoire-support de Dijon

- Evaluation d'une nouvelle cible de PCR pour diagnostic de toxoplasmose (Reischl et al., BMC Infect Dis. 2003 May 2;3:7) ;
- Extraction ADN de *T. gondii* à l'aide de l'automate d'extraction 8LX BIONOBIS® (encore en cours d'évaluation).

Laboratoire-support de Grenoble

- Adaptation dans le laboratoire de la PCR quantitative en temps réel ciblant la séquence répétée rep529 de *T. gondii* par LightCycler (Roche Diagnostics) et mise en place d'un contrôle interne (β -globine humaine). Cette technique est utilisée par ce laboratoire pour le diagnostic de la toxoplasmose depuis juin 2009.

2-1-2 Description de la collection des souches de toxoplasmes disponible au CNR

- **Description :**

Le CNR a été créé en 2006. Nous avons intégré à ce bilan global les souches et ADN adressés antérieurement au CRB (créé en 2002).

	Souches	ADN	TOTAL
2009	108	81	189
2002-2008	464	322	786
TOTAL	572	403	975

Tableau 1 : Nombre de souches et d'ADN toxoplasmiques adressés au CNR.

Les souches représentent 58,6% des prélèvements ; 97,5% ont pu être génotypées avec succès. Les extraits ADN provenant de produits pathologiques des patients représentent 41,3% des prélèvements adressés au CNR ; 53,8% ont pu être génotypés.

Au total, sur 975 prélèvements, 79,48% ont été caractérisés d'un point de vue génomique avec les marqueurs énoncés.

Les prélèvements provenant des cas de toxoplasmose congénitale (liquide amniotique, placenta, sang du cordon, tissus fœtaux) représentent 63,17% des prélèvements (616/975).

Nature de prélèvements	Génotypage direct 2002-2009			Génotypage souches 2002-2009		
	succès	échec	<i>total direct</i>	succès	échec	<i>total souches</i>
Sang / Moelle osseuse 81	28	27	55	26	0	26
LCR 58	20	37	57	1	0	1
Cerveau 36	18	4	22	14	0	14
LBA 43	26	8	34	9	0	9
Expectoration / trachée 8	3	5	8	0	0	0
Liquide pleural 6	3	1	4	2	0	2
Humeur aqueuse/Vitré 118	30	87	117	1	0	1
placenta 354	33	7	40	306	6 (+2NE*)	314
sang du cordon 38	8	1	9	27	2	29
tissus fœtaux 14	9	0	9	5	0	5
Liquide amniotique 210	34	8	42	164	1 (+3 NE)	168
Divers 9	5	1	6	3	0	3
Total 975	217	186	403	558	9 (+5 NE)	572

Tableau 2 : Nature des prélèvements et résultats du génotypage.

* NE : typage non effectué

Dans le cadre d'une activité de recherche ou de surveillance des souches à l'origine de la contamination humaine, la collection s'est également enrichie en 2009 de souches d'origine animale, 34 provenant de Guyane Française, 3 provenant du territoire français dont 2 de bovins, 1 du Canada (viande de cheval, achat sur le territoire français).

- **Conditions de stockage**

Les souches sont stockées en azote liquide à Reims et à Limoges.

Les ADN extraits de produits pathologiques sont stockés à -80°C dans un congélateur sécurisé. Pour ces derniers, la déclaration de collection conforme au décret n°2007- 1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain a été faite en 2008 à Reims et à Limoges au titre des collections des CHU respectifs et déclarée acceptable

- **Conditions de mise à disposition de ces collections**

Les souches, avec l'accord de cession signé du biologiste responsable de l'isolement, sont destinées à être disponibles pour des projets scientifiques. Elles sont alors intégrées à la

structure Centre de Ressources Biologiques *Toxoplasma*. Un site Internet avec catalogue a été créé (<http://www.toxobrc.com>) exposant les conditions de dépôt et de cession des souches. Les subcultures de la souche déposée au CRB *Toxoplasma* sont distribuées à la communauté scientifique, après avis d'un conseil scientifique, moyennant un coût permettant de couvrir les frais encourus par la préparation et la conservation. Cette activité de cession ne concerne que les souches, et non l'ADN issu de produits pathologiques humains.

2.2 Activités d'expertise de l'année 2009

2.2-1 Expertise apportée par le Pôle Souches

- **Décrire le nombre de souches ou prélèvements** réceptionnés, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation

Nature de prélèvements	Génotypage direct 2009			Génotypage souches 2009			
	succès	échec	total direct	succès	échec	total souches	
Sang	12	4	6	10	2	0	2
LCR	11	3	8	11	0	0	0
Cerveau	7	4	0	4	3	0	3
LBA	5	3	1	4	1	0	1
Expectoration / trachée	3	1	2	3	0	0	0
Humeur aqueuse/Vitré	32	7	25	32	0	0	0
placenta	74	3	4	7	64	3	67
sang du cordon	6	0	0	0	4	2	6
tissus fœtaux	3	2	0	2	1	0	1
Liquide amniotique	36	6	2	8	27	1	28
TOTAL	189	33	48	81	102	6	108

Tableau 3 : Activités de génotypage du CNR *Toxoplasma* en 2009 en fonction de la nature du prélèvement et du succès du génotypage.

- **Décrire le nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats**

Il n'y a pas eu en 2009 d'étude de chimiosensibilité sur des souches du CNR.

- **Décrire le nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués**

Trois souches guyanaises émanant du CNR/CRB ont été adressées à la Faculté de Médecine de Cayenne.

Les autres souches distribuées sont des souches du CRB : souches de référence (type I, II, III), 1 souche de type d'origine ovine, 2 souches atypiques antérieures à la création du CNR. Les demandes émanent de France (Strasbourg), Irlande, Finlande, Colombie, Malaisie

- **Analyse de l'évolution des tendances en termes d'activités**

On note une augmentation de près de 37% du nombre de prélèvements adressés par rapport à 2008.

2.2-2 Expertise apportée par le Pôle Sérologie

Les résultats des évaluations des réactifs de diagnostic sérologique sélectionnés et testés sur le panel 1 (sérologies de toxoplasmose négatives ou anciennes) en 2008 ont été validés par le groupe de travail. Les objectifs de 2009 étaient d'évaluer les réactifs sur les panels 2 et 3.

Pour rappel la liste des réactifs évalués :

- Techniques type ELISA automatisées : VIDAS IgG et IgM BioMérieux, VIDIA IgG et IgM BioMérieux et AXSYM IgG et IgM Abbott
- Techniques d'agglutination: Toxoscreen BioMérieux, Toxocell Biokit, Toxolater Fumouze, HAI Fumouze et Pastorex Toxo BioRad.

Résultats des évaluations 2009

Panel 2A: Taux limites en IgG avec IgM négatives (n=23)

Concordance avec les techniques de référence pour les IgG

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM IgG Abbott	20/23	87
VIDIA IgG BioMérieux	13/23	56,5
VIDAS IgG BioMérieux	10/23	43,5
Techniques agglutination	Nb	%
Toxoscreen BioMérieux	18/23	78,3
Toxolater Fumouze	16/23	69,6
Toxocell Biokit	18/23	78,3
Pastorex Biorad	9/23	39,1
HAI Fumouze	20/23	87
HAI Behring	20/23	87

Les résultats équivoques en IgG sont considérés comme négatifs

Panel 2B: Pathologies virales, bactériennes ou immunes, potentiellement interférentes avec IgG et IgM négatives (n=46)

Spécificité pour les IgG

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM IgG Abbott	36/46	78,3
VIDIA IgG BioMérieux	36/46	78,3
VIDAS IgG BioMérieux	45/46	97,8
Techniques d'agglutination		
Toxoscreen BioMérieux	44/46	95,7
Toxolater Fumouze	41/46	89,1
Toxocell Biokit	41/46	89,1
Pastorex Biorad	43/46	93,5
HAI Fumouze	45/46	97,8
HAI Behring	45/46	97,8

Les résultats équivoques en IgG sont considérés comme positifs

Spécificité pour les IgM

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM IgM Abbott	45/46	97,8
VIDIA IgM BioMérieux	46/46	100
VIDAS IgM BioMérieux	46/46	100

Panel 3A: Séroconversions toxoplasmiques avec sérums négatifs avec IgG et IgM négatives (n=15)

Spécificité pour les IgG

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM IgG Abbott	15/15	100
VIDIA IgG BioMérieux	15/15	100
VIDAS IgG BioMérieux	15/15	100
Techniques d'agglutination	Nb	%
Toxoscreen BioMérieux	15/15	100
Toxolates Fumouze	13/15	86,7
Toxocell Biokit	15/15	100
Pastorex Biorad	15/15	100
HAI Fumouze	15/15	100
HAI Behring	15/15	100

Spécificité pour les IgM

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM IgM Abbott	15/15	100
VIDIA IgM BioMérieux	15/15	100
VIDAS IgM BioMérieux	15/15	100

Panel 3B: Séroconversions : sérums positifs avec IgM et/ou IgG positives (n=21)

Sensibilité : analyse globale IgM positives avec IgG positives ou négatives

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM Abbott	21/21	100
VIDIA BioMérieux	21/21	100
VIDAS BioMérieux	21/21	100
Techniques d'agglutination	Nb	%
Toxoscreen BioMérieux	17/21	81
Toxolates Fumouze	21/21	100
Toxocell Biokit	20/21	95,2
Pastorex Biorad	20/21	95,2
HAI Fumouze	20/21	95,2
HAI Behring	19/21	90,5

Sensibilité pour les IgM

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM IgM Abbott	21/21	100
VIDIA IgM BioMérieux	21/21	100
VIDAS IgM BioMérieux	21/21	100

Les résultats équivoques en IgG ou IgM sont considérés comme positifs

Panel 3C: Toxoplasmoses anciennes > 1 an (n=20)

Sensibilité pour les IgG

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM IgG Abbott	20/20	100
VIDIA IgG BioMérieux	20/20	100
VIDAS IgG BioMérieux	20/20	100
Techniques d'agglutination	Nb	%
Toxoscreen BioMérieux	20/20	100
Toxolates Fumouze	20/20	100
Toxocell Biokit	20/20	100

Pastorex Biorad	20/20	100
HAI Fumouze	20/20	100
HAI Behring	20/20	100

Concordance pour les IgM avec les techniques de référence

Techniques ELISA	Nb	%
AXSYM IgM Abbott	12/20	60
VIDIA IgM BioMérieux	11/20	55
VIDAS IgM BioMérieux	4/20	20

Les résultats équivoques en IgM sont considérés comme positifs

Ces résultats préliminaires sont en cours d'analyse et de validation par le groupe de travail. L'ensemble des résultats sur les 3 panels fera l'objet d'une publication en 2010.

2.2-3 Expertise apportée par le Pôle Biologie Moléculaire :

1. Expertise des techniques et réactifs

L'un des premiers objectifs du Pôle "Biologie moléculaire" du CNR est de réaliser des études comparatives des méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose afin de définir des seuils minimum de sensibilité à atteindre, et de dégager des méthodes à recommander au niveau national. En-dehors des méthodes d'extraction d'ADN (quasiment partout commerciales), il existe très peu de méthodes de PCR-Toxoplasmose commercialisées (trousses). De plus, la plupart de ces trousses apparaissent en retard sur un plan technologique par rapport aux méthodes développées dans les CHU. Les méthodes de PCR sont donc actuellement "artisanales" et qualifiées de »maison « dans tous les laboratoires en France, entraînant nécessairement des variations d'efficacité, et peut-être de performances. Ces différences apparaissent surtout dans de faibles concentrations de toxoplasmes (< 10 parasites/mL). Néanmoins, il est primordial de tester ces faibles concentrations dans les études comparatives car près de la moitié des liquides amniotiques infectés contiennent des charges parasitaires inférieures à 10/mL (Costa et al. 2001, Prenat Diagn. 21:85-8).

a) Elaboration d'un matériel biologique de référence. L'objectif de pouvoir disposer d'un matériel dit "étalon", discriminant, robuste, reproductible, et en grande quantité, a été en grande partie atteint en 2008. Il s'agit d'échantillons lyophilisés, mimant les échantillons cliniques et élaborés à diverses concentrations de toxoplasmes. Un grand progrès a été réalisé en 2009 avec l'abandon des toxoplasmes provenant de souris et l'utilisation de parasites issus de culture *in vitro*, permettant une meilleure reproductibilité. Des concentrations relativement faibles ont été préférées cette année de façon à viser à établir des seuils de sensibilité qui pourraient être proposés comme "standard". D'autres concentrations, encore plus basses, ou plus élevées, sont réservées aux études au sein du Pôle. Un échantillon "étalon" de 50 toxoplasmes / mL a commencé à être distribué aux laboratoires qui en faisaient la demande à des fins d'auto-évaluation.

b) L'étude comparative multicentrique concernant les méthodes d'extraction d'ADN a été publiée (Yera et al, 2009). Elle n'a pas pu donner lieu à des recommandations claires en raison d'une petite discordance obtenue entre deux tests de performances utilisés au cours de l'étude. Des études complémentaires sont nécessaires avant de pouvoir conclure définitivement sur les méthodes étudiées. A noter que ces études sont extrêmement délicates au vu des multiples biais et causes de variations pouvant intervenir dans les méthodes « maison », sans rapport direct avec l'objet étudié, et au vu de l'intrication étroite des différentes étapes, pré-analytiques et analytiques.

c) L'étude comparative multicentrique concernant les performances globales de la méthode de PCR est en voie de publication (Sterkers et al., article accepté). Cette étude a

permis de confirmer, sur un mode multicentrique, qu'une des cibles ADN utilisées (rep529) autorise plus facilement des performances supérieures de la méthode de PCR. Elle sera donc recommandée au sein de la communauté des professionnels concernés. Toutefois, l'optimisation des conditions de PCR (à méthode égale) garde également une réelle importance. Par ailleurs, l'objectif d'évaluer et classer les différentes méthodes de diagnostic moléculaire utilisées dans les laboratoires au sein du Pôle a été atteint ; toutefois d'autres évaluations sont prévues afin de proposer une homogénéisation des méthodes à l'ensemble des laboratoires membres du CNR.

d) Une étude plus ciblée visant les très faibles concentrations en Toxoplasmes (1 et 2,5 toxoplasmes / mL) a été réalisée fin 2009, toujours multicentrique au sein du Pôle. Cette étude très "stringente" a révélé de fortes différences entre centres; mais ces différences ne peuvent pas être expliquées simplement par la méthode de PCR utilisée ni par la distribution statistique. Des travaux complémentaires sont maintenant en cours afin de déterminer l'importance de l'adéquation entre méthode d'extraction d'ADN et méthode de PCR ("couple extraction-PCR").

e) Une évaluation de trousse commerciale de PCR-Toxoplasmose a été réalisée en 2009 aux CHU de Montpellier et de Grenoble). La méthode commerciale ciblant rep529 s'est révélée nettement inférieure aux deux méthodes « maison » (7 faux négatifs sur 15 diagnostics de toxoplasmose congénitale), en accord avec les évaluations de sensibilité analytique des trois méthodes. Les 3 autres trousse existantes ciblant le gène B1 n'ont pas été prises en compte : en effet, les méthodes développées au CHU de Montpellier ont une grande sensibilité, et la méthode la plus récemment développée (ciblant l'élément rep529) est supérieure à celle précédemment réalisée ciblant le gène B1. D'ailleurs, la cible B1 est de toute façon moins performante en général.

f) Une étude comparative de trois méthodes de PCR a été réalisée au sein des laboratoires supports de Paris-Cochin et Lille. Cette étude a également montré la supériorité de la cible rep529 sur la cible B1. Par contre, deux appareils différents utilisant deux technologies de détection différentes ont donné une sensibilité similaire, ce qui est rassurant pour la pratique du diagnostic.

Un ensemble d'études complexes sera nécessaire avant de pouvoir faire des **recommandations fortes sur ces techniques pour la communauté des biologistes** impliqués dans ce diagnostic. Par contre, les recommandations concernant les bonnes pratiques seront plus faciles à rédiger.

2. Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose

Le Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose a été renouvelé en 2009 sous l'égide du CNR, basé sur une gamme de deux concentrations basses de toxoplasmes, préparées avec le matériel étalon cité ci-dessus. **Il a été suivi par 28 participants**. Ce CQE concerne toujours exclusivement le liquide amniotique excluant pour l'instant le travail sur d'autres matrices (sang et placenta) car moins courant et techniquement beaucoup plus difficile à évaluer. Il reste basé sur une participation volontaire, anonyme et gratuite. Il a montré en 2009 **une excellente sensibilité de la méthode pour l'ensemble des laboratoires impliqués**, en progrès par rapport à l'année précédente, puisque, tous les laboratoires ont trouvé positif au moins un des deux échantillons avec la concentration de 5 toxoplasmes /mL. De plus, pour la quatrième année consécutive, **aucun faux positif n'a été relevé**.

Par ailleurs, 23 laboratoires ont exprimé des résultats quantitatifs, mais seulement 9 ont quantifié la charge parasitaire en toxoplasmes par mL. La reproductibilité était bonne pour la moitié des laboratoires. Les résultats sont relativement fiables et en adéquation avec les concentrations attendues pour 7 laboratoires sur au moins une des concentrations, et 5 laboratoires sur les deux concentrations. Ces données continuent néanmoins de mettre en

évidence un réel problème au niveau de la quantification absolue, alors que la quantification au sein d'un centre devient progressivement fiable. Elles soulignent le besoin d'une méthode de quantification standardisée et d'une gamme identique pour tous. En attendant des recommandations claires sur ce point, nous avons conseillé de ne pas rendre de quantification absolue aux cliniciens.

3. Etudes préliminaires à la standardisation de la quantification par PCR en temps réel

Le Contrôle de Qualité national en DPN de la toxoplasmose a mis en évidence un manque de cohérence entre CHU dans la quantification de la concentration en toxoplasmes dans le liquide amniotique. Or, bien que ce fait soit encore controversé, la charge parasitaire a été rapportée comme pouvant renseigner sur le pronostic fœtal et pourrait à ce titre être réclamée par les cliniciens en charge de la toxoplasmose congénitale. Homogénéiser la quantification par PCR sur le plan national est un vaste chantier. **Notre objectif aujourd'hui est de réaliser des études ponctuelles** afin de proposer des éléments scientifiques précis pour valider telle ou telle façon de procéder pour cette quantification.

Un point essentiel à la validation de la quantification par PCR en temps réel est la stabilité du nombre de copies de la cible ADN (forcément répétée) utilisée pour la PCR. La cible rep529 est de plus en plus utilisée pour le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose par PCR en temps réel. Il s'agit d'une séquence non-codante répétée en tandem (nombre de répétitions connu approximativement autour de 300) et pour une souche de référence. Une étude ponctuelle a été réalisée par les laboratoires supports de Toulouse et Grenoble, avec pour objectif de valider l'utilisation de la cible rep529 pour la quantification absolue. A partir d'une gamme définie de parasites, le nombre de copies de cette cible a été évalué et comparé avec celui du gène SAG1. Ce dosage a été réalisé pour quatre souches du principal type taxonomique de *T. gondii* impliqué dans la toxoplasmose congénitale en France (type II) et 10 souches isolées en France de patients immuno-déprimés. Le nombre de copies de rep529 était similaire dans toutes les souches, avec des variations de l'ordre de 10%, en prenant en compte les coefficients d'erreur inhérents à la technique. Ce travail doit toutefois être poursuivi et affiné sur un plus grand nombre de souches.

4) Enquêtes sur les pratiques et les méthodes utilisées en diagnostic moléculaire

Une étude rétrospective concernant les pratiques et les méthodes du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose entre 2002 et 2005 a été publiée (Sterkers et al, 2009). Elle sert de référence pour l'évolution de la diversité des méthodes vers une standardisation ou une homogénéisation. Cette enquête se poursuit de façon annuelle au cours du Contrôle de Qualité national. En 2009, elle montre une évolution lente vers une relative homogénéisation des méthodes avec parfois des choix pratiques et financiers dictés par les administrations de CHU. En particulier, la diversité des amorces utilisées s'est restreinte : en 2005, 25 laboratoires utilisaient 15 amorces sur 3 cibles ADN ; en 2009, le nombre total reste sensiblement identique pour 28 laboratoires; mais 12 des 23 méthodes ciblant l'élément rep529 utilisent les mêmes amorces (de Reischl et al. 2003).

La PCR-ELISA a disparu et un seul centre propose une PCR conventionnelle seule. D'autres aspects concernant les méthodes d'extraction, le nombre de réactions nécessaires, l'utilisation des témoins négatifs et positifs, les mesures de prévention des contaminations (etc.) ont été abordés. Cette enquête a fait l'objet d'un retour d'information à tous les participants.

5) Recommandations concernant le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

La rédaction de ces recommandations à destination du site Internet du CNR a été confiée à deux laboratoires (Strasbourg et Grenoble) et est en cours. Dans un premier temps, elle ne pourra pas concerner les aspects encore très complexes vus ci-dessus, mais donnera des indications précises sur un ensemble d'aspects techniques et diagnostiques.

3/ ACTIVITES DE SURVEILLANCE

Le réseau des laboratoires participant aux activités du CNR a été créé en 2006 sur la base du volontariat avec fédération de 33 laboratoires experts dans le domaine répartis en France métropolitaine et dans les DOM-TOM (**Annexe 1 Pôle Epidémiologie**).

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

- Réseau de partenaires :

- description des partenaires,

En 2009, en dehors des prélèvements listés dans le tableau ci-dessous et tous adressés par les laboratoires hospitaliers du réseau, 30 prélèvements nous ont été adressés par des laboratoires étrangers (23 Turquie, 7 Institut Pasteur d'Alger). Pour les laboratoires de Fort de France et de Saint Laurent du Maroni, les échantillons sont réacheminés au CNR par le laboratoire Cerba.

	2008	2009	
	prélèvements	prélèvements	patients
Bordeaux	0	0	0
Brest	2	5	4
Caen	1	0	0
Cayenne	9	10	7
Dijon	1	5	3
Fort de France	0	0	0
Grenoble	5	10	9
Lille	3	5	4
Limoges	11	6	5
Lyon	0	0	0
Marseille	3	12	11
Montpellier	3	6	5
Nancy	0	0	0
Nantes	13	27	23
Nice	0	6	6
Paris Cochin	0	32	31
Paris Institut de Puériculture*	6	0	0
Paris Necker	0	3	1
Paris Pitié Salpêtrière	9	12	12
Paris Saint Antoine	23	0	0
Paris Saint Louis	5	0	0
Poitiers	0	6	5
Reims	17	22	17
Rennes	4	3	3
Rouen	10	2	2
Saint Laurent du Maroni	2	2	2
Strasbourg	2	1	1
Toulouse	5	11	9
Tours	4	3	3
TOTAL	138	189	163

Tableau 4 : Participation des partenaires du réseau à l'envoi de prélèvements au CNR *Toxoplasma* et évolution 2008/2009.

*: l'activité du laboratoire de la toxoplasmose de l'Institut de Puériculture a cessé en Septembre 2009.

- répartition géographique, estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau

La participation de 21 des 29 centres du réseau assure une bonne représentativité du territoire métropolitain et des départements français d'outre mer. Certains des hôpitaux qui adressent le plus grand nombre de prélèvements reçoivent des prélèvements de divers départements français en raison de leur rôle de centre de référence. Une étude est en cours sur la réelle représentativité géographique des prélèvements et la distribution des géotypes à travers la France.

- Définition de l'échantillon de souches isolées**

Les formes cliniques d'origine des 189 prélèvements adressés au CNR en 2009 sont les suivantes :

- 121 (64%) prélèvements de cas de toxoplasmose congénitale.
- 32 (16,9%) prélèvements de toxoplasmose oculaire de patients immunodéprimés ou immunocompétents
- 25 (13,2%) prélèvements de cas de toxoplasmose systémique de patients immunodéprimés
- 7 (3,7%) prélèvements de cas de toxoplasmose systémique de patients immunocompétents
- 4 (2,6%) prélèvements sans renseignements cliniques

Ces 189 prélèvements correspondent à 163 patients. Le géotypage a été possible pour 116 patients.

Formes cliniques	Nombre de patients	Type II	Type II variant	Type III	Type II/III	Africa 1	Atypique	Non déterminé
T. congénitale	101	84	2	3	1	0	1	10
T. immunodéprimés	22	12	0	1	0	2	1	6
T. oculaire	31	6	0	0	0	1	0	24
T, immunocompétents	6	1	0	0	0	0	2	3
Pas de renseignements	4	0	0	0	0	0	0	4
Total	163*	103	2	4	1	3	4	47

* : un patient immunodéprimé présente à la fois une forme cérébrale et une atteinte oculaire

Tableau 5 : Répartition des géotypes par forme clinique chez les 163 patients

Les données du géotypage confirment celles observées les années précédentes : le géotype II (type II et variant) est observé chez 89,65% des 116 patients pour lesquels le géotypage a été possible, le géotype III reste rare (3,4%). Les 3 patients infectés par le géotype Africa 1 sont d'origine africaine. Pour les 3 patients infectés par des géotypes atypiques, une source de l'infection hors du territoire métropolitain est soit certaine (Guyane Française), soit suspectée (voyage en Inde, Ile Maurice pour un cas ; consommation de viande cheval originaire du Canada dans l'autre cas).

Toxoplasmoses congénitales

Les 121 prélèvements provenant de toxoplasmose congénitale correspondent à 101 patients. On peut noter que cela représente environ le 1/3 des cas de toxoplasmoses congénitales déclarés au CNR.

Le géotype II reste largement majoritaire (83,16%). Le seul géotypique atypique (CNR TgH 18040) provient de Guyane Française. Il est à l'origine d'une mort fœtale avec atteinte disséminée. Ce cas de forme grave de toxoplasmose congénitale en Guyane Française est un argument supplémentaire en faveur de la virulence de ces géotypes atypiques.

Forme clinique	Nombre de patients	Type II	Type II variant	Type III	Type II/III	Atypique	Non déterminé
Asymptomatique	68	54	2	3	1	0	8
Calcifications cérébrales, rétinoblastome	6	6	0	0	0	0	0
Dilatations ventriculaires, formes disséminées	17	14	0	0	0	1	2
Autres*	1	1	0	0	0	0	0
Pas de renseignements cliniques	9	9	0	0	0	0	0
Total	101	84	2	3	1	1	10

* : mort fœtale d'une autre étiologie (syndrome de Klinefelter)

Tableau 6 : Génotypes observés dans les 101 cas de toxoplasmoses congénitales, en fonction de la forme clinique

Cas particuliers :

Trois grossesses gémellaires ont été analysées, toutes étaient dues à un génotype II :

- CNR TgH 21039A, B : 1 mort in utero / 1 asymptomatique
- CNR TgH 30006A : 1 calcifications cérébrales / 1 interruption médicale de grossesse pour dilatation ventriculaire (séroconversion entre 17 et 23 semaines d'aménorrhée)
- CNR TgH 38085A : 1 mort fœtale / 1 jumeau indemne (immunité ancienne chez la mère)

Toxoplasmose du patient immunodéprimé (hors toxoplasmose oculaire)

25 prélèvements (sang, LCR, LBA, biopsie cérébrale) correspondant à 22 patients ont été analysés. Le génotype II est majoritaire que ce soit chez les patients d'hématologie ou les patients sidéens. Les deux souches de génotype *Africa 1* ont été trouvées chez des patients africains (Guinée Conakry, Cameroun) confirmant la présence de cette lignée toxoplasmique sur ce continent (Ajzenberg et al. 2009). Les formes observées chez les patients sidéens sont toutes des formes cérébrales, celles des patients avec hémopathies sont des formes pulmonaires ou des fièvres isolées. Cette distribution des formes cliniques est indépendante du génotype.

Pathologie sous-jacente	Nombre de patients	Type II	Type III	Africa 1	Atypique	Non déterminé
Greffe de moelle/hémopathie	10	7	1	0	0	2
Greffe cardiaque	1	1	0	0	0	0
SIDA	11	5	0	2	0	4
Autre (lupus)	1	0	0	0	1	0
Total	23	13	1	2	1	6

Tableau 7 : Génotypes observés chez les patients immunodéprimés, en fonction de la pathologie sous-jacente.

Cas particulier :

- CNR TgH 29059A :

Toxoplasmose cérébrale et médullaire chez un patient traité par corticothérapie et Cellcept® pour un lupus. Ce patient signale de nombreux voyages en Inde, à l'île Maurice et en Afrique. La souche est atypique. Il est à noter que des formes cérébrales inhabituelles sont décrites en Inde, y compris chez des patients immunocompétents.

Toxoplasmoses du patient immunocompétent (hors toxoplasmose oculaire)

L'isolement à partir de cas de toxoplasmose acquise chez des patients immunocompétents reste rare (7 prélèvements, 6 patients en 2009). Il est l'apanage des formes graves de

toxoplasmose avec un isolement à partir du sang ou du LBA. Le génotype n'a pu être déterminé que pour 3 patients. Il est atypique dans 2 cas.

Origine géographique	Nombre de patients	Type II	Atypique	Non déterminé
Guyane	4	0	1	3
Canada ?	1	0	1	0
Non définie	1	1	0	0
Total	6	1	2	3

Tableau 8 : Génotypes observés dans les cas de toxoplasmose acquise du patient immunocompétent, en fonction de l'origine géographique de l'infection

Comme les années précédentes, c'est essentiellement de Guyane que proviennent ces formes sévères, associées à des génotypes atypiques.

A noter cependant 2 observations originales par rapport aux années précédentes. Elles ont été observées chez des patients considérés comme immunocompétents, mais ayant cependant une pathologie sous jacente qui peut avoir contribué à la pathogénicité de la souche de toxoplasme :

Cas particuliers :

- CNR TgH 29054A :

mort par abcès cérébral toxoplasmique chez un patient ayant une cardiopathie congénitale. C'est la première fois qu'une souche de type II est observée dans ce type de pathologie sévère.

- CNR TgH 23018A :

Antécédents :

. patient de 74 ans, broncho-pneumopathie chronique obstructive, altération de l'état général depuis 3 mois avec nodules pulmonaires découverts en 2008 au scanner thoracique

Histoire de la maladie :

. début 2009 : 3 hospitalisations pour décompensation de BPCO

. 23 mars 2009 : hospitalisation pour pneumopathie fébrile résistante aux antibiotiques et corticoïdes (50 mg/j de méthylprednisolone, mis en place le 1^{er} avril)

. 4 avril: découverte d'adénopathies cervicales

. 16 avril : traitement par Sulfadiazine-Malocide mis en route suite à une sérologie indiquant une toxoplasmose récente et une PCR Toxoplasmose positive dans le sang. Le typage de l'extrait d'ADN parasite révélera une souche atypique.

. 19 avril : mort

Enquête épidémiologique

. enquête auprès de la famille révélant que le patient consommait au moins 2 fois par semaine de la viande de cheval crue pour lutter contre son altération de l'état général. Cette viande achetée dans un supermarché de la région d'Antibes est importée du Canada, conditionnée sous vide en Bretagne.

. quatre steaks de cheval sont achetés fin mai dans le même supermarché pour un isolement de souches. Une souche (Ca-Equ cab-001) est isolée : elle est différente de celle ayant infecté le patient, mais elle est également atypique par rapport à celles de l'environnement français.

Toxoplasmoses oculaires

Trente deux prélèvements d'humeur aqueuse ou de vitré correspondant à 31 patients ont été reçus. Les deux prélèvements du même patient correspondent à une récurrence de l'atteinte oculaire 7 mois après la première. Un patient immunodéprimé présente à la fois une atteinte oculaire et une atteinte cérébrale.

Le génotypage a été réussi (plus de 3 marqueurs amplifiés) pour 7 patients / 31 (22,6%). Le

taux d'échec relativement important reflète la très faible quantité d'ADN parasitaire dans ces prélèvements.

La prédominance du type II même chez des patients immunocompétents confirme que ce génotype prédominant dans l'environnement en France peut aussi être à l'origine d'atteintes oculaires acquises. Le patient présentant une atteinte due au génotype *Africa 1* est d'origine africaine, de même que 4 autres patients pour lesquels le génotype parasitaire n'a pu être défini.

Etat immunitaire	Nombre de patients			
	Type II	Africa 1	Non déterminé	
Immunodéprimé	7	1	6	
Immunocompétent	13	4	9	
Non défini	11	1	9	
Total	31	6	1	24

Tableau 9 : Génotypes observés dans 31 cas de toxoplasmose oculaire, en fonction de l'état immunitaire.

- Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement.

Pour les études destinées à l'épidémiologie animale, le Pôle Epidémiologie collabore directement avec le Pôle Souches pour l'isolement et la caractérisation de souches issues de la faune sauvage ou domestique. Le CNR collabore avec le Laboratoire National de Référence (LNR) « Parasites transmis par l'alimentation » AFSSA-LERPAZ (responsable P. Boireau) pour des études visant à une meilleure connaissance de l'impact de l'alimentation sur la contamination humaine. Des programmes nationaux de surveillance, établis et financés par la DGAL, portant sur l'évaluation de la présence de toxoplasmes dans la viande de boucherie ont été menés dans ce cadre (sur la viande ovine en 2007 ayant conduit à l'isolement de 43 souches ovines et sur la viande bovine en 2009 ayant conduit à l'isolement de deux souches bovines, fait rarissime dans la littérature). Les publications sont en cours (Halos et al., 2010).

3.2. Surveillance de la toxoplasmose en France.

Les objectifs du Pôle Epidémiologie du CNR Toxoplasmose doivent permettre une évaluation de l'incidence et de la prévalence de la toxoplasmose d'une façon générale (circulation du parasite) et en particulier des toxoplasmoses congénitales. Le CNR doit contribuer à la mesure de l'efficacité des mesures de prévention ou de dépistage mises en place depuis de nombreuses années en collaboration avec l'InVS. L'ensemble des études épidémiologiques doivent intéresser les différentes communautés de France métropolitaine mais aussi des DOM-TOM qui vivent dans des contextes environnementaux différents avec des particularités socioculturelles souvent marquées.

3.2.1- Une enquête sérologique ponctuelle a été réalisée sur des sérums collectés par l'InVS (échantillon de 2064 sérums de différentes classes d'âge appartenant à une sérothèque nationale constituée en 1997), en vue d'obtenir la prévalence de la toxoplasmose par tranche d'âge. Cette enquête a été confiée par le CNR Coordonnateur à un des laboratoires experts du Pôle Sérologie au CHU de Grenoble où avait également lieu une étude sérologique sur la sérologie herpétique. Les sérums ont été testés en 2008-2009, à la recherche d'anticorps anti-Toxoplasma par ELISA (AxSYM Abbott, VIDAS BioMérieux). Les résultats ont été interprétés et transmis à l'InVS qui a réalisé l'analyse statistique grâce au logiciel Stata 9.2 par une stagiaire. Les résultats doivent être discutés avec le CNR et l'InVS et une publication sera faite en 2010.

3.2.2- Le CNR a répondu à l'Appel d'offre initié par l'INED en collaboration avec l'InVS visant à la constitution d'une cohorte nationale (cohorte ELFE) d'enfants qui naîtront en 2010 et qui seront suivis longitudinalement sur une durée de 20 ans. Le CNR a participé à l'élaboration du questionnaire qui sera relevé en maternité pour la question relative à la toxoplasmose et a

analysé courant 2009 les échantillons (201 sangs du cordon) collectés lors de l'enquête pilote conduite en 2007 dans un échantillon de maternités. Les résultats sérologiques ont permis de vérifier la concordance des données issues du recueil d'informations dans le carnet de maternité (statut sérologique des mères) et de les comparer aux résultats des enquêtes périnatales. La bonne concordance avec les données de l'enquête périnatale a incité le CNR en accord avec l'Invs à ne pas étudier de façon systématique les sangs du cordon des enfants de la cohorte à venir mais de pouvoir contrôler si nécessaire, les résultats issus du recueil d'informations dans le carnet de maternité.

3.2.3- Système national de notification des cas de toxoplasmose congénitale.

Rappel de la constitution de ce système et de ses objectifs:

Le CNR de la Toxoplasmose (laboratoire Coordonnateur) en collaboration étroite avec l'InVS a organisé la mise en place d'un système national de déclaration des cas de toxoplasmose congénitale basé sur la notification des cas diagnostiqués par les laboratoires du réseau « Toxosurv ». Un comité de pilotage a été constitué en 2006 par l'InVS regroupant des membres du Pôle Epidémiologie du CNR (I. Villena, T. Ancelle, P. Thulliez), des épidémiologistes de l'InVS, un médecin parasitologue hors CNR (Lyon), un gynécologue-obstétricien, un pédiatre, un ophtalmologue et un médecin épidémiologiste en Santé Publique. Ce comité a validé le logiciel spécifique de notification développé par le laboratoire Coordonnateur avec la Société Epiconcept et l'InVS ainsi que le programme statistique produit spécifiquement pour l'analyse des résultats (T. Ancelle, I. Villena, C. Delmas). Ce comité se réunit annuellement pour valider les résultats du plan d'analyse présentés par le CNR.

Les laboratoires spécialisés (n=35) déclarent les cas de toxoplasmose congénitale via le site Web (<https://www.chu-reims.fr/notification> de cas). Les laboratoires polyvalents (n=16) dont la fréquence de notification est moindre déclarent les cas avec une fiche de notification adressée au CNR Coordonnateur qui en effectue la saisie dans la base du logiciel. La représentativité nationale de la notification est assurée par l'ensemble des CHU, CHG et laboratoires privés déclarants, drainant l'ensemble du territoire (y compris DOM-TOM). Il a été décidé que cette surveillance n'avait pas d'objectif de suivi des toxoplasmoses congénitales et ne produirait donc pas de données sur le nombre de séquelles dues à la maladie.

Activité 2009 :

Les activités de surveillance ont continué en 2009 par la poursuite de l'animation du réseau « Toxosurv » en charge de la notification des cas diagnostiqués. Après l'analyse des résultats de la surveillance de 2007, un réajustement des laboratoires participants au réseau « Toxosurv » a été mené en 2008 et 2009. La liste établie fin 2009 est présentée en Annexe 2 du Pôle Epidémiologie et a été mise en ligne sur le site internet du CNR.

Au cours de l'année 2009, le programme statistique développé spécifiquement pour l'analyse des résultats a été revu par le pôle Epidémiologie (avec l'ARC du Pôle Epidémiologie) et avec les membres du comité de pilotage Toxosurv. Ce programme permet une meilleure lisibilité des résultats en les exprimant sous différentes rubriques décrivant le réseau Toxosurv de recueil des cas (analyses par centres), l'épidémiologie de l'affection (caractéristiques des infections), les performances de diagnostic et l'évaluation de la sévérité de la maladie par recueil des informations cliniques sur les cas diagnostiqués. L'ensemble de ces données permet de fournir des indicateurs remarquables qui seront suivis au cours du temps pour connaître l'évolution de la maladie. Ces indicateurs sont publiés sur le site internet du CNR.

Une stagiaire a été accueillie par l'Equipe de Reims pour effectuer un travail sur la base des notifications des cas de 2008 (stage de Master 1 Sciences de la vie et de la santé, Santé publique, Université Bordeaux 2) avec pour mission la réalisation d'un contrôle qualité de la base de notification des cas de toxoplasmoses hébergée dans le logiciel Voozoo. Ainsi au cours de ce stage, nous avons créé un programme (sous STATA) permettant la vérification de la base et une identification automatique des erreurs rencontrées dans les fiches de notifications. Nous vérifions ainsi plus rapidement qu'auparavant (contrôle visuel des fiches) les

discordances et rappelons les centres afin de lever ces discordances (incohérence de données, imprécisions sur les notifications, manque de notifications des cas à la naissance...).. Une amélioration du recueil des données est ainsi assurée. L'analyse des cas notifiés a été refaite après retour des centres, au cours de l'été et l'ensemble des résultats de cette surveillance a été présenté lors de la réunion annuelle du CNR en septembre 2009. Suite à cette présentation, des rectifications voir des ajouts de cas ont été saisis via le logiciel Toxosurv. Un rappel a été fait en septembre 2009 pour tous les membres du réseau Toxosurv afin d'obtenir une très bonne exhaustivité du recueil. La notification des cas diagnostiqués en France en 2008 et/ou les corrections apportées par les centres a été définitivement bloquée par les responsables de la base au 31 janvier 2010, donnant lieu à une nouvelle analyse des résultats fin février 2010. Les résultats ont été validés lors de la réunion du comité de pilotage « Toxosurv » du 25 février 2010, envoyés ensuite à tous les membres du réseau Toxosurv (n=51) et sont présentés en Annexe 3 du Pôle Epidémiologie. Des données sélectionnées par le CNR et le comité de pilotage sont issues de ce plan d'analyse et mises en ligne sur le site internet du CNR Epidémiologie ([http://www.chu-reims.fr/CNR toxoplasrose](http://www.chu-reims.fr/CNR_toxoplasrose)) (Annexe 4 du Pôle Epidémiologie).

En 2008, 268 cas de toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiqués en France conduisant à une interruption de grossesse dans 16 cas (12 Interruptions de grossesse pour raison médicale et 4 Morts fœtales *in utero*) ; 233 enfants sont nés dont 4 huit présentent une atteinte sévère de la maladie et 19 une atteinte modérée, 206 enfants sont asymptomatiques à la naissance. Un logigramme (page 30) représente le récapitulatif de ces cas. Ainsi, en 2008 la **prévalence globale** de la toxoplasmose congénitale observée en France est de **3.1 pour 10 000 naissances** et la prévalence des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués à la naissance est de 1.8 pour 10 000 naissances. Ces données sont inférieures aux données estimées dans les différentes enquêtes faites il y a plus d'une dizaine d'années. La létalité liée à la toxoplasmose congénitale est de 6% et la morbidité globale représente 11.6% (voir tableau 10 des indicateurs remarquables, page 31). **Ces données démontrent une stabilité de la toxoplasmose congénitale en France** (pour mémoire, létalité de 4.5% et morbidité de 11.5 % observées en 2007).

L'évolution des pratiques du recueil des cas et du système de notification depuis son instauration en 2007 seront publiées dans le BEH en 2010 (trois années de fonctionnement du réseau Toxosurv).

Un autre point intéressant de cette activité de surveillance repose sur le contrôle *a posteriori* des données collectées par l'Agence de Biomédecine concernant l'activité de diagnostic prénatal dans les laboratoires agréés. Le CNR Coordonnateur collabore avec cette agence en lui indiquant le nombre de diagnostics prénataux notifiés par les laboratoires agréés dans la base via le logiciel Toxosurv; l'agence renvoie au CNR la liste des centres ayant renseigné leur activité de diagnostic prénatal avec l'issue des grossesses. Ainsi, un contrôle de la cohérence des déclarations (au CNR et à l'Agence de Biomédecine) est effectué. En 2009, nous avons relevé une incohérence des cas déclarés à l'Agence de Biomédecine amenant celle-ci à réviser son analyse et son rapport d'activités.

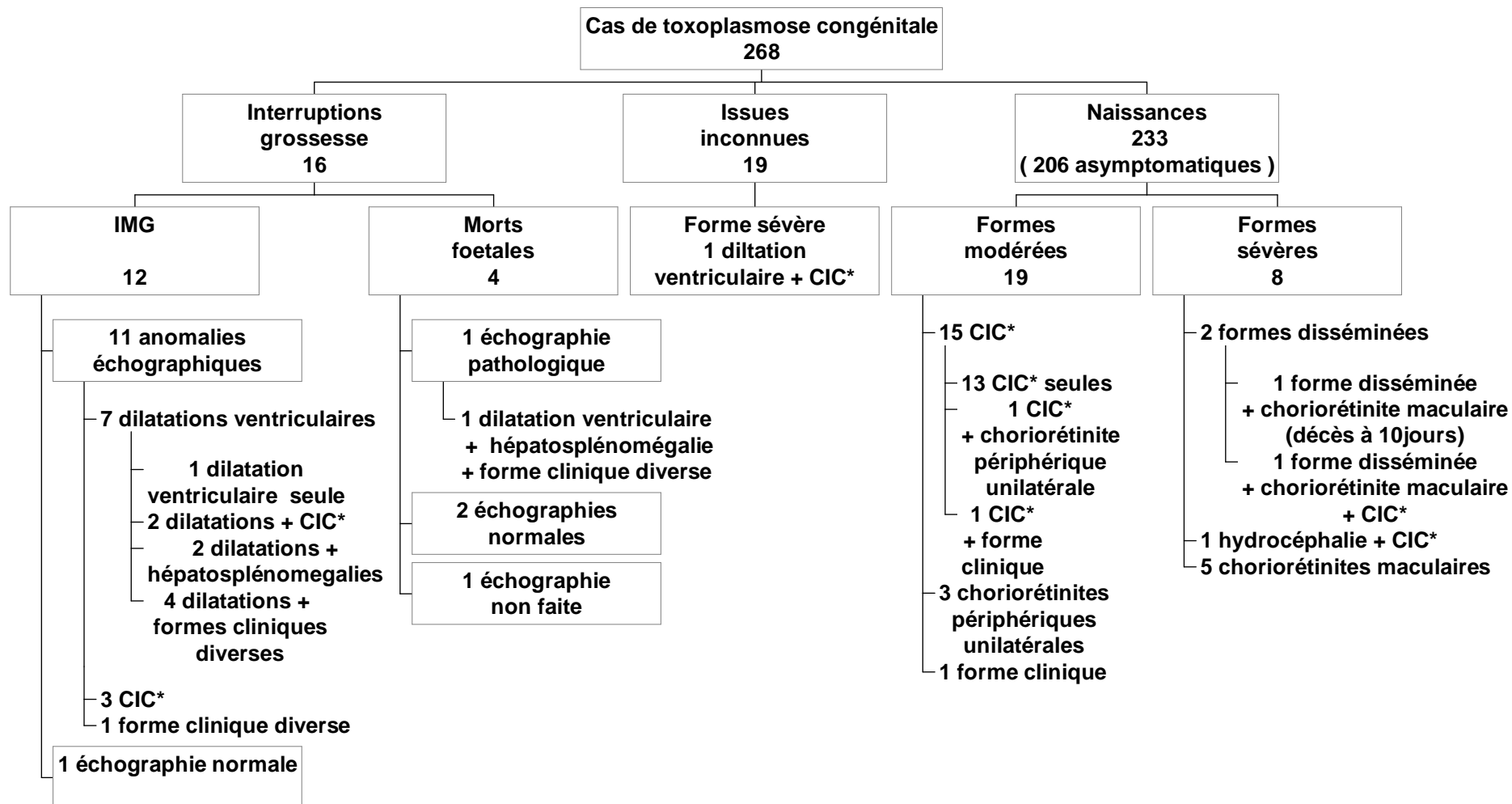
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Aucune nouvelle souche de toxoplasme n'a été testée vis-à-vis des antiparasitaires.

3.4. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux (européens)

Il n'y a pas de réseau de surveillance européen dans le domaine de la toxoplasmose ni dans celui des souches de toxoplasme. Les chercheurs du Pôle Souches collaborent avec des équipes internationales pour apporter leur expertise dans ce domaine (en 2009 : Turquie, Algérie, Pays-Bas, Finlande).

Logigramme : Récapitulatif des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France du 1er Janvier 2008 au 31 décembre 2008
(n=268)



CIC : Calcifications Intracrâniennes

Tableau 10 : Indicateurs remarquables des cas de toxoplasmose congénitale (TC) diagnostiqués en France du 1er Janvier 2008 au 31 décembre 2008 (n=268)

	N	Dénominateur	Proportion
Prévalence TC totale	268	866810*	0.31 p.1000 naissances
Prévalence TC diagnostiqués à la naissance	153	866810*	0.18 p.1000 naissances
Prévalence TC symptomatiques à la naissance	27	866810*	0.03 p.1000 naissances
Prévalence formes sévères TC à la naissance	8	866810*	0.01 p.1000 naissances
TC diagnostiqués à la naissance	153	268	57.1 p.100 cas de TC
pertes fœtales et mort-nés	16	268	6.0 p.100 cas de TC
Enfants nés avec la TC	233	268	86.9 p.100 cas de TC
TC symptomatiques à la naissance	28 **	233	11.6 p.100 cas de TC
TC symptomatiques avec formes sévères à la naissance	8	233	3.4 p.100 cas de TC

* 866810 naissances vivantes France entières +DOM (Guadeloupe, Guyane, La Réunion, Martinique). Résultats provisoires consultés le 15 septembre 2009 (bilan démographique INSEE)

** 1 forme sévère sans suivi postnatal

4/ MISSION D'ALERTE

Une alerte sur la présence de cas groupés de toxoplasmose a été donnée Laboratoire Coordonnateur fin décembre 2008 par un des laboratoires membre du Pôle Epidémiologie (CHU de Montpellier) : 13 patients résidant dans la couronne de l'agglomération de Montpellier ont été recensés pendant une durée de 2 mois (novembre 2008 à décembre 2008), une toxoplasmose évolutive d'un point sérologique a été relevée avec pour certains cas une virulence d'un point de vue clinique (présence d'adénopathies). Un signalement a été fait par le CNR à l'Invs le 22 janvier 2009 et à la CIRE du Languedoc –Roussillon ; une investigation des cas a alors été menée par la CIRE en collaboration avec l'InVS, le CNR et le laboratoire du CHU de Montpellier dès le mois de janvier 2009 afin de caractériser cette « épidémie ». Aucune souche n'a été isolée à partir de ces cas. Le rapport d'analyse de ces cas groupés (15 cas retenus au total) est en cours de validation et fera l'objet d'une publication dans le BEH en 2010. Les Drs Pratlong, Ancelle et Villena ont participé (au titre du CNR) à cette investigation et à la rédaction du rapport.

Une seconde alerte a été donnée concernant la possibilité de contamination par consommation de viande de cheval importée. Le dossier CNR TgH 23018A où l'implication de viande cheval importée du Canada est fortement suspecté en raison du caractère atypique de la souche et de l'enquête épidémiologique a été signalé à l'InVS. Ce dossier est à rapprocher des suspicions d'implication de la viande de cheval i) dans un cas de réinfection chez une femme enceinte avec toxoplasmose congénitale disséminée (voir rapport 2007) ii) dans trois des cas groupés observés à Montpellier. Ces différents arguments ont conduit le Pôle Epidémiologie du CNR en collaboration avec le LNR « Parasites transmis par l'alimentation » (AFSSA, Maison Alfort) à proposer à la DGAL un plan de contrôle de la viande de cheval importée pour 2010. Cette information a été relayée via le LNR aux différents LNR communautaires.

5/ ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT, DE FORMATION ET DE CONSEIL

- **Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires,**
Pour répondre à ces missions, le CNR met en place plusieurs niveaux d'information et de formation. Ainsi, le Laboratoire Coordonnateur, les Laboratoires Associés et les laboratoires constitutifs du réseau du CNR sont des lieux d'enseignement, de stage et de formation de par leur nature hospitalo-universitaire.

Les activités de formation relevant des enseignements effectués par les différents laboratoires constitutifs du CNR sont listées en Annexe Enseignement-Formations.

- **Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)**

Les documents rédigés par le groupe de travail du Pôle sérologie (guide d'interprétation, modalités de prise en charge des sérologies toxoplasmiques et des sérologies problématiques) ont été soumis à l'ensemble des membres du réseau en février 2009 pour avis. Une réunion de consensus pour la validation définitive s'est tenue lors de la réunion annuelle du CNR et une version finale a ainsi été rédigée (voir Annexes 1, 2 et 3 du Pôle Sérologie).

- **Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :**

- Rétro-information aux partenaires

- **Envoi individuel du Rapport d'activités 2008**, le 2 avril 2009 à tous les membres du CNR.

- La **réunion annuelle du CNR** a eu lieu les 25 et 26 septembre 2009 à l'initiative du Laboratoire Coordonnateur et des Laboratoires Associés, réunissant l'ensemble des Laboratoires faisant partie du réseau national (32 laboratoires membres du CNR). Cette réunion a permis de présenter le bilan d'activité de chacun des Pôles pour l'année 2009 et de discuter des perspectives. Une large participation des centres a été observée (29 centres) et les présentations des activités menées au sein des différents Pôles ont permis un débat entre les responsables de Pôle et les membres du CNR notamment pour valider les propositions du Pôle Sérologie. L'ensemble des communications présentées a été adressé aux membres du CNR de la toxoplasmose (présents et absents) en octobre 2009.

- Les résultats du Contrôle de Qualité Externe national de biologie moléculaire ont été rendus par courrier de façon personnalisée. Les données des enquêtes ont fait l'objet d'une information par courriel à chacun des centres.

- **Information individuelle des résultats des génotypages** des souches envoyées au CNR : en 2009, un envoi individuel des résultats des génotypages selon les modalités de l'informatique du laboratoire du CHU de Limoges a été systématisé.

- **L'envoi des résultats du Plan d'Analyse Toxosurv** est réalisé pour tous les membres constitutifs du réseau de surveillance Toxosurv dépendant du CNR de la Toxoplasmose (51 laboratoires). Le plan d'analyse des cas toxoplasmoses congénitaux diagnostiqués en 2008 (et notifiés au CNR) a été adressé le 16 mars 2010 par mail.

- Diffusion aux professionnels : conférences, Site web

Un site Internet a été créé dès 2007 par le Pôle Epidémiologie (<http://www.chu-reims.fr/CNR> toxoplasmose), il est commun à l'ensemble des laboratoires associés du CNR Toxoplasmose. Ce site assure la présentation du CNR (organigramme, missions) et permet la notification directe des cas de toxoplasmose congénitale. **Le Rapport annuel d'activités est mis en ligne sur le site Internet** une fois validé par l'InVS (rapport 2007 et 2008 en ligne hors Annexes).

Des résultats partiels du Plan d'Analyse Toxosurv sont diffusés via le site Internet, les données mises en ligne ont été discutées au sein du Comité de Pilotage: ces données visent à présenter le réseau et les principaux résultats de cette surveillance avec le logigramme récapitulatif des cas (voir Annexe 3 et 4 du Pôle Epidémiologie).

Ce site offre un lien avec le site de l'InVS ainsi qu'avec le Centre de Ressources Biologiques

Toxoplasma (<http://www.brc.toxo.com>) créé en 2008 et en lien avec le Pôle Souches.

- Activités de conseil aux professionnels

Le système de surveillance pour la toxoplasmose congénitale mis en place par le Laboratoire Coordonnateur prévoit dans sa structuration des relances périodiques par voie de mail ou courriers (y compris appels téléphoniques pour répondre à certaines demandes spécifiques). Ces envois ainsi que leurs réponses sont tracées. En 2009, quatre relances générales ont ainsi été effectuées pour l'ensemble des laboratoires du réseau Toxosurv et une consultation auprès de chaque laboratoire (hors laboratoires spécialisés) a été menée pour vérifier la pertinence d'appartenance à ce réseau de notification amenant à une modification du réseau Toxosurv.

Une adresse mail toxosurv@chu-reims.fr est à la disposition de tous les membres pour toutes questions relatives à la notification des cas de toxoplasmoses congénitales, elle est consultable simultanément au CHU de Reims par le Coordonnateur du CNR (I.Villena), l'ARC (C. Delmas) et T. Ancelle du Pôle Epidémiologie (CHU Cochin) permettant ainsi une réponse rapide, l'ensemble des mails est tracé et conservé par le Coordonnateur.

Pour répondre à une demande de nombreux laboratoires d'analyses français ou de professionnels de santé (gynécologues obstétriciens en particulier), **une liste des laboratoires membres du CNR de la Toxoplasmose a été mise sur le site internet**. Cette liste présente les laboratoires experts pour le diagnostic de la toxoplasmose mentionnant les correspondants médicaux, les diagnostics pratiqués avec les spécificités techniques pour les méthodes immunologiques pratiquées au sein de chacun des laboratoires (Annexe 4 du Pôle Sérologie). Cette liste sera diffusée aux LABM français pratiquant la sérologie toxoplasmique.

- Liste des activités d'expertises

Un rapport visant à une évaluation du programme national de dépistage de la toxoplasmose congénitale a été mené par l'HAS à la demande de la DGS, avec notamment la participation de plusieurs membres du CNR (H. Pelloux, P. Thulliez, I. Villena) et l'InVS (V. Goulet) ainsi que d'autres professionnels de santé impliqués dans cette affection. Les recommandations de l'HAS ont été publiées en octobre 2009 avec comme conclusion la décision de ne pas modifier la surveillance sérologique telle que pratiquée à l'heure actuelle et en précisant que « *Les recommandations concernant la surveillance sérologique de la toxoplasmose devront faire l'objet d'un réexamen en fonction des données d'efficacité obtenues par l'essai contrôlé randomisé et des résultats consolidés du système de surveillance de la toxoplasmose qui vient d'être mis en place sous l'égide du CNR de la toxoplasmose et de l'Institut de veille sanitaire. Cette réévaluation, dont l'opportunité devra être appréciée de façon régulière en fonction de l'évolution des connaissances, devra être engagée au plus tard 5 ans après la publication des présentes recommandations* ».

Un travail de fond a été réalisé en 2009 pour la DHOS concernant les cotations des actes de biologie hors-nomenclature en toxoplasmose. Tous les aspects du diagnostic ont été considérés (sérologique, moléculaire, inoculation à la souris). Par ailleurs, un travail est en cours avec les représentants de la commission de la nomenclature pour réviser la nomenclature des actes de biologie concernant la toxoplasmose. Plusieurs membres du CNR se sont particulièrement impliqués dans ces deux missions dont les responsables des différents Pôles d'activités.

Plusieurs membres du CNR sont experts dans diverses agences :

- ML Dardé expert auprès de l'ECDC et de l'AFSSAPS.
- P. Thulliez expert auprès de l'AFSSAPS.
- I. Villena, expert auprès de l'AFSSA (présidente du CES Microbiologie), de l'AFSSAPS (Commission d'Evaluation des Dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*) et de l'AFSSET (CES Eaux et agents biologiques).

6/ TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

Les travaux de recherche sont menés au sein des Laboratoires du CNR, les Laboratoires coordonnateur et Associés étant tous labellisés (CNRS ou EA).

Pôle Epidémiologie et Pôle Souches

Les travaux en matière d'épidémiologie portent sur les études de prévalence (séroprévalence et isolement de souches) décrites précédemment. Ils ont été menés en 2009 par le Pôle Epidémiologie, en collaboration pour l'isolement des souches avec le Pôle Souches. Des programmes spécifiques sont également développés au sein des deux pôles:

- Programme interdisciplinaire CNRS « Maladies Infectieuses Emergentes » : **Différentiels génétiques et évolution de la virulence chez le toxoplasme**

Objectif :

Projet transversal visant à l'étude de la diversité génétique du toxoplasme et de l'évolution des facteurs parasitaires qui influencent la virulence chez l'homme.

Objectifs spécifiques :

Comparer la structure génétique et l'évolution des populations de toxoplasme circulant en France métropolitaine et en Guyane à travers leur diversité génétique neutre (microsatellites) et sélectionnée (marqueurs génétiques de virulence).

Valider le potentiel discriminant du modèle rat en comparant l'évolution de la toxoplasmose suite à une infection par un type II versus des souches « virulentes » guyanaises.

Porteur de projet : MF Cesbron-Delauw, DR CNRS Grenoble

Equipes associées :

IRD Montpellier (AL Banuls) Génétique des populations

CNR Toxoplasmose pôle souches (ML Dardé, D. Ajzenberg)

Participation du CNR : les membres du CNR pôle souches assurent la sélection des souches qui rentreront dans l'étude et effectuent le génotypage par microsatellites. Les souches sélectionnées ont été achetées au CRB en 2008.

Les séquençages des gènes potentiellement impliqués dans la virulence sont en cours d'analyse.

- Partenariat CIRMF (Centre International de Recherches de Franceville – Gabon) / équipe EA3174 Université de Limoges – CNR Toxoplasmose pôle souches : **Diversité génétique des souches de toxoplasme circulant au Gabon** (travail de thèse A. Mercier – bourse région Limousin) intitulée *Toxoplasma gondii* : Structure de population comparée au Gabon et en Guyane Française.

Objectif :

Comprendre la diversité génétique des souches africaines et l'éventuel impact des souches de type « européen » sur l'évolution des souches en Afrique

Etat d'avancement :

69 souches ont pu être isolées à partir d'animaux divers dans plusieurs localités du Gabon. Leur étude génétique a confirmé la nature différente des génotypes circulant en Afrique Centrale par rapport à la France, l'existence de plusieurs lignées clonales spécifiques (dont l'Africa 1 retrouvé également chez les patients en Afrique de l'Ouest et du Centre). L'étude a également permis d'analyser les différences de structure de population entre les zones urbaines et une zone rurale du pays.

Un article tiré de ce travail est soumis.

- Partenariat EA 3593 Epidémiologie des Parasitoses Tropicale- Faculté de médecine Antilles Guyane / équipe EA3174 Université de Limoges – CNR Toxoplasmose pôle souches : **Diversité génétique des souches de l'environnement domestique en Guyane Française** (travail de thèse A. Mercier – bourse région Limousin)

Objectif :

Définir les génotypes circulant dans l'environnement domestique en Guyane par opposition aux génotypes retrouvés chez les patients infectés à partir du cycle sauvage de la forêt amazonienne.

Etat d'avancement :

34 souches ont pu être isolées à partir d'animaux divers autour de Cayenne et de Kourou principalement. Leur étude génétique est en cours.

- PHRC interrégional TOXODFA : **Toxoplasmose cérébrale et SIDA dans les départements français d'Amérique. Apport diagnostique de la PCR et diversité génétique du Toxoplasme.**

Objectif principal :

Evaluer la performance diagnostique de la PCR *Toxoplasma* en temps réel à partir du sang dans la toxoplasmose cérébrale chez les patients atteints de SIDA dans les DFA.

Objectifs secondaires:

Isolement, typage génétique et mise en collection des souches de *Toxoplasma gondii* à l'origine de toxoplasmose cérébrale chez les patients atteints de SIDA dans les DFA.

Partenariats :

Porteur du projet : D. Ajzenberg , EA3174 Limoges, CNR/CRB Toxoplasmose Centre Hospitalier Universitaire de Pointe à Pitre, Guadeloupe

- Maladies Infectieuses : Lamaury Isabelle
- Laboratoire de Microbiologie : Nicolas Muriel

Centre Hospitalier Universitaire de Fort-de-France, Martinique

- Maladies Infectieuses et Tropicales : Cabié André
- Laboratoire de microbiologie : Desbois-Nogard Nicole :

Centre Hospitalier Andrée Rosemon de Cayenne, Guyane française

- Maladies Infectieuses et Tropicales : Demar Magalie : (CNR pôle souches) /Djossou Félix
- Dermatologie : Couppe Pierre :
- Centre d'Information et de Soins de l'Immunodeficiency Humaine de Cayenne: Nacher Mathieu
- Laboratoire de Parasitologie / Mycologie : Carme Bernard (CNR pôle épidémiologie)

Centre Hospitalier de l'Ouest guyanais, Guyane française

- Médecine : Vautrin Cyrille
- Laboratoire de Biologie Médicale : Boukhari Rachida

Etat d'avancement :

Après avis favorable du CPP Sud Ouest et de la DGS, l'étude a commencé en septembre 2008.

- **Convention d'étude avec co-financement de thèse par la Société Roche pour étude de la résistance des souches de toxoplasmes.**

Objectif : déterminer le niveau de résistance médicamenteuse des souches de *T. gondii* et caractériser les mécanismes de résistance impliqués.

Partenariats :

Porteur du projet : I. Villena. Thèse d'Université en cours (C. Doliwa) caractérisation de la résistance par protéomique.

Collaboration avec Pr J. Wastling (Université de Liverpool).

- **Programme ANR ALIA 2009 : PROTOFOOD (2010-2013)** «Contamination des mollusques bivalves et des végétaux par les protozoaires: développement et validation d'une stratégie standardisée de détection et de caractérisation ; étude de la persistance sur/dans matrices et évaluation de l'impact de procédés ménagers de cuisson ».

Objectif : ce programme vise à développer des outils de détections des parasites (dont *Toxoplasma*) dans l'alimentation, et d'évaluer leur persistance dans les matrices alimentaires et l'impact des procédés ménagers de cuisson afin d'améliorer les connaissances sur le risque de contamination alimentaire par ces parasites.

Partenariats :

Porteur du projet : I. Villena.

Partenariats : collaboration avec diverses équipes universitaires membres du CRN (EA 4311, Rouen, Pr Favennec ; EA 3609, Lille, Dr Dei-Cas ; UMR MD3, Marseille, Dr Dumètre), le Laboratoire Vétérinaire Départemental de Caen (MLHoussin) et le Centre de recherche en sécurité alimentaire ADRIA Normandie (T. Morin, B. Picoche). Les travaux ont débuté par la mise au point de méthodes de détection notamment par l'amélioration des protocoles d'extraction de l'ADN des parasites au sein des différentes matrices testées (salades, framboises, mollusques) et par l'optimisation des méthodes de PCR employées pour amplifier l'ADN de ces trois parasites.

Pôle Sérologie et Pôle Biologie moléculaire

Strasbourg

- PHRC HUS N° 3964 (2008-2010) : **Infections oculaires graves**: coordonnateur Pr T. BOURCIER, CHU de Strasbourg. PHRC promu par les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, multicentrique et ouvert, visant à améliorer la prise en charge des infections oculaires graves (uvéites infectieuses et endophtalmies) en caractérisant la réponse inflammatoire et en améliorant la sensibilité diagnostique. Il s'agit d'étudier la réponse immune et inflammatoire chez 400 sujets souffrants d'infections bactériennes, virales et parasitaires. Ces prélèvements seront obtenus grâce à la formation d'un réseau régional regroupant aussi bien les services d'ophtalmologie que les services de microbiologie.
- Programme de recherche France-Colombie (UdS-Colciencias) 2009-2011 sur la Toxoplasmose Oculaire « **Etude des relations entre souches de Toxoplasma et l'inflammation intraoculaire** » coordonnateurs J. Gomez-Marin-E. Candolfi.
- Programme de coopération et de partenariat scientifique France-Amérique Latine ECOS-NORD N°10S01 : « **Virulence, Immunopathologie et toxoplasmose oculaire** » coordonnateurs J. Gomez-Marin-E. Candolfi 2010-2012.
- Allocation de coopération internationale 2010-2012 dans le cadre du doctorat d'Alejandra de la TORRE, doctorant colombien, sur la « **Nouvelles approches thérapeutiques de la Toxoplasmose oculaire** ».

- Trois étudiants en cours de thèse de sciences :

Julie BRUNET (2008, D4 en cours): *Rôle du facteur de transcription UHRF1 dans le contrôle du cycle cellulaire de la cellule infectée par Toxoplasma gondii*

Gaïda KANGO (2008, D2 en cours): *Contrôle de l'expression des gènes de la cellule hôte lors d'une infection par Toxoplasma gondii*.

Arnaud SAUER (2008, D2 en cours): *Rôle des cellules de Müller dans le contrôle de la réponse inflammatoire intraoculaire au cours de la toxoplasmose oculaire.*

Grenoble

- **Polymorphisme phénotypique des souches de *Toxoplasma gondii* de type II isolées de toxoplasmose congénitale.** Les différences de virulence entre les trois génotypes de *T. gondii* sont partiellement connues, mais actuellement il n'y a pas de données sur d'éventuelles différences intra-génotype II, génotype le plus fréquemment retrouvé au cours des toxoplasmoses humaines en France. Notre travail a utilisé des souches fournies par le CNR. Les résultats originaux montrent qu'entre plusieurs souches de type II, il existe des différences dans la capacité à former des kystes dans un modèle cellulaire humain in vitro (HFF). Plus précisément, parmi les 4 souches étudiées dans ce travail, les 2 souches responsables d'une toxoplasmose congénitale asymptomatique génèrent un nombre de kystes significativement inférieur aux deux souches responsables d'atteinte clinique. L'existence de telles différences pourrait avoir une application en clinique: identification de marqueurs avec valeur prédictive d'atteinte congénitale symptomatique ou non.

Enfin, deux demandes de PHRC national ont été attribuées en 2009 dans le cadre de l'évaluation de protocoles thérapeutiques sur la toxoplasmose congénitale. Ces PHRC sont menés en **collaboration avec le CNR et la majorité des centres du réseau sont impliqués dans ces programmes**, notamment en référant le plus précocément les diagnostics de toxoplasmose (séroconversion maternelle puis diagnostic de toxoplasmose congénitale). **Plusieurs membres du CNR dont le Coordonnateur sont fortement impliqués en tant que membres des comités de pilotage de ces deux PHRC qui débiteront en 2010.**

PHRC TOXOGEST : Essai clinique, randomisé, multicentrique comparant l'efficacité et la tolérance d'un traitement prénatal par l'association pyriméthamine et sulfadiazine *versus* spiramycine pour réduire la transmission verticale de *Toxoplasma gondii* après primo-infection pendant la grossesse.

Promoteur de l'essai : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (PHRC 2009)

Investigateur Coordonnateur : Pr Laurent Mandelbrot

APHP Hôpital Louis Mourier, Service de Gynécologie-Obstétrique – Université Paris 7 Diderot -

Objectif principal :

Comparer l'efficacité du traitement prénatal, débuté dès le diagnostic de séroconversion toxoplasmique, par l'association pyriméthamine-sulfadiazine, *versus* la spiramycine, sur la réduction de transmission materno-fœtale de l'infection par *Toxoplasma gondii*.

Objectifs secondaires :

- Décrire les effets indésirables et comparer leur fréquence dans les deux groupes de traitement

- Etudier l'effet du délai de mise en place du traitement anténatal sur le risque de transmission

Méthode :

Essai clinique, randomisé, selon deux groupes parallèles, sans insu, multicentrique, national.

PHRC TOSCANE : Etude multicentrique, randomisée de non infériorité de deux stratégies thérapeutiques chez des enfants atteints de toxoplasmose congénitale.

Promoteur de l'essai : Centre Hospitalier Universitaire de Dijon (PHRC 2009)

Investigateur Coordonnateur : Pr JB Gouyon, Service Néonatalogie, CHU Dijon

Centre d'Investigation Clinique : CHU Lyon

Objectif principal :

Evaluer l'intérêt préventif sur les rétinoblastomes d'un traitement de 12 mois (au lieu de 3 mois comme dans d'autres pays Européens) chez les enfants atteints de toxoplasmose congénitale non sévère.

Méthode :

Essai clinique, randomisé, selon deux groupes, sans insu, multicentrique, national.

7/ LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Liste des publications et communications des différents Pôles (ou Laboratoires Associés), classées par ordre alphabétique. Les membres du CNR de la Toxoplasmose apparaissent surlignés

Publications nationales

ANCELLE T., YERA H., TALABANI H., LEBUISSON A., THULLIEZ P., DUPOUY-CAMET J. Comment réduire le coût du dépistage de la toxoplasmose chez la femme enceinte ? Rev Epidemiol Santé Publique, 2009; 57,:411-117.

SMATI M., TAILLE C., MENOTTI J., LE BRAS J., HOUZE S. [Contribution of *Toxoplasma gondii*-specific PCR for the diagnosis of disseminated toxoplasmosis in a non-HIV and non-grafted adult patient.] Med Mal Infect, 2010 Feb 19.

Publications internationales

2010

ESCOFFIER P., PARIS L., BODAGHI B., DANIS M., MAZIER D., MARINACH-PATRICE C. Pooling aqueous humor samples : bias in 2D-LC-MS/MS strategy? J Proteome Res, 2010, 9, 789-797.

VILLENA I., ANCELLE T., DELMAS C., GARCIA P., BREZIN A., THULLIEZ P., WALLON M., KING L., GOULET V. and the National Reference Centre on Toxoplasmosis. Congenital toxoplasmosis in France in 2007 : first results from a national surveillance system. EuroSurveillance, accepté Mars 2010.

WALLON M., FRANCK J., THULLIEZ P., HUISSOUD C., PEYRON F., GARCIA-MERIC P., KIEFFER F. Accuracy of real time Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* on amniotic fluid. Obstetric and Gynecology, 2010 (in press).

2009

AFONSO E., THULLIEZ P., GILOT-FROMONT E. Local meteorological conditions,dynamics of seroconversion to *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*) and oocyst burden in a rural environment. Epidemiol Infect, 2009, 7, 1-9

AJZENBERG D., YERA H., MARTY P., PARIS L., DALLE F., MENOTTI J., AUBERT D., FRANCK J., BESSIERES M.H., QUINIO D., PELLOUX H., DELHAES L., DESBOIS N., THULLIEZ P., ROBERT-GANGNEUX F., KAUFFMAN-LACROIX C., PUJOL S., RABODONIRINA M., BOUGNOUX M.E., CUISENIER B., DUHAMEL C., DUONG T.H., FILISETTI D., FLORI P., GAY-ANDRIEU F., PRATLONG F., NEVEZ G., TOTET A., CARME B., BONNABAU H., DARDE M.L.,VILLENA I. Genotype of 88 *Toxoplasma gondii* isolates associated with toxoplasmosis in immunocompromised patients, and correlation with clinical findings. J. Infect. Dis., 2009, 199 : 1155-1167.

AJZENBERG D., YERA H., MARTY P., PARIS L., DALLE F., MENOTTI J., AUBERT D., FRANCK J., BESSIERES M.H., QUINIO D., PELLOUX H., DELHAES L., DESBOIS N., THULLIEZ P., ROBERT-GANGNEUX F., KAUFFMAN-LACROIX C., PUJOL S., RABODONIRINA M., BOUGNOUX M.E., CUISENIER B., DUHAMEL C., DUONG T.H., FILISETTI D., FLORI P., GAY-ANDRIEU F., PRATLONG F., NEVEZ G., TOTET A., CARME B., BONNABAU H., DARDE M.L.,VILLENA I. *Toxoplasma* strain nomenclature reply (Reply to Gomez-Marin). J Infect Dis, 2009, 200, 1012-1013.

ANCELLE T., YERA H., TALABANI H., LEBUISSON A., THULLIEZ P., DUPOUY-CAMET J. How can the cost of screening for toxoplasmosis during pregnancy be reduced ? Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique, 2009; 6, 411-417.

AUBERT D., VILLENA I. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne region, France. Mem I Oswaldo Cruz, 2009, 104, 290-295.

BAHIA-OLIVEIRA L.M., DARDÉ M.L., AMENDOEIRA M.R. *Toxoplasma gondii* centennial anniversary: 100 years of research to celebrate all over the world. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009;104,129-131.

BECK H.P., BLAKE D., DARDE M.L., FELGER I., PEDRAZA-DIAZ S., REGIDOR-CERRILLO J., GOMEZ-BAUTISTA M., ORTEGA-MORA L.M., PUTIGNANI L., SHIELS B., TAIT A., WEIR W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. Int J Parasitol, 2009, 39,175-189.

BESSIERES M.H., BERREBI A., CASSAING S., FILLAUX J., CAMBUS J.P., BERRY A., ASSOULINE C., AYOUBI J.M., MAGNAVAL J.F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009,104, 389-392.

BOUGDOUR A., MAUBON D., BALDACCI P., BASTIEN O., ORTET P., BARALE J.C., PELLOUX H., MENARD R. HAKIMI M.A. Drug-inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. J Exp Med, 2009, 206, 953-966.

CARME B., AJZENBERG D., DEMAR M., SIMON S., DARDÉ M.L., MAUBERT B., DE THOISY B. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. Vet Parasitol, 2009, 163 132-135.

CARME B., DEMAR M., AJZENBERG D., DARDÉ M.L. Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. Emerg Infect Dis, 2009, 15, 656-658.

CHIQUET C., MAURIN M., THURET G., BENITO Y., CORNUT P.L., CREUZOT-GARCHER C., ROUBEROL F., PECHINOT A., LINA G., ROMANET J.P., BRON A., VANDENESCH F., FOR THE FRENCH INSTITUTIONAL ENDOPHTHALMITIS STUDY GROUP : LAFONTAINE P.O., PASSEMARD M., MOREAU-GAUDRY V., PALOMBI K., DENIS P., GAIN P., NEUWIRTH C., CROIZÉ J., ETIENNE J., BOISSET S., TRISTAN A., CARRICAJO A., AUBERT G., DALLE F., BONNIN A., LEBEAU B., PELLOUX H., DE MONTBRISON F., PICOT S., RABERIN H., TRAN MANH SUNG R. Analysis of diluted vitreous samples from vitrectomy is useful in eyes with severe acute postoperative endophthalmitis. Ophthalmology, 2009, 116, 2437-2441.

DELHAES L., MRAZ J.C., FRÉALLE E., DURAND-JOLY I., MAGRO L., AJZENBERG D., DARDÉ M.L., DEI-CAS E., YAKOUB-AGHA I. Severe pulmonary toxoplasmosis after allo-SCT in two patients: from *Toxoplasma* genotyping to clinical management. Bone Marrow Transplant, 2009, Jul 13. [Epub ahead of print].

DUBEY J.P., JENKINS M.C., KWOK O.C., ZINK R.L., MICHALSKI M.L., ULRICH V., GILL J., CARSTENSEN M., THULLIEZ P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Iowa and Minnesota using four serologic tests. Vet Parasitol, 2009;161, 330-334.

ELBEZ-RUBINSTEIN A., AJZENBERG D., DARDÉ M.L., COHEN R., DUMETRE A., YERA H., GONDON E., JANAUD J.C., THULLIEZ P. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection and Review. J

Infect Dis, 2009,199, 280-285.

FILISSETTI D., COCQUERELLE V., VILLARD O., CANDOLFI E. Placental testing for *Toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. Pediatric Infectious Disease Journal, sous presse.

FRICKER-HIDALGO H., BULABOIS C.E., BRENIER-PINCHART M.P., HAMIDFAR R., GARBAN F., BRION J.P., TIMSIT J.F., CAHN J.Y., PELLOUX H. Diagnosis of toxoplasmosis after allogenic stem cell transplantation : results of DNA detection and serological techniques on 70 patients. Clin Infect Dis, 2009, 48, 9-15.

GARCIA-MERIC P., FRANCK J., DUMON H., PIARROUX R. Management of congenital toxoplasmosis in France : current data. Presse Médicale, 2009, 17 Nov (Epub ahead of print).

GARWEG J., CANDOLFI E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis ; facts and possible clues. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009,104, 211-220.

GAY-ANDRIEU F., FRICKER-HIDALGO H., SICKINGER E., ESPERN A., BRENIER-PINCHART M.P., BRAUN H.B., PELLOUX H. Comparative evaluation of the Architect Toxo IgG, IgM and IgG Avidity assays for anti-*Toxoplasma* antibodies detection in pregnant women sera. Diagn. Microbiol Infect Dis, 2009, 65, 279-287.

GILOT-FROMONT E., AUBERT D., BELKILANI S., HERMITTE P., GIBOUT O., GEERS R., VILLENA I. Landscape, herd management and within-herd seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in beef cattle herds from Champagne-Ardenne, France. Veterinary Parasitology, 2009, 161, 36-40.

HALOS L., THÉBAULT A., AUBERT D., THOMAS M., PERRET C., GEERS R., ALLIOT A., ESCOTTE-BINET S., AJZENBERG D., DARDÉ M.L., DURAND B., BOIREAU P., VILLENA I. An innovative survey underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France. Int J Parasitol, 2009, 40, 193-200.

KIEFFER F., THULLIEZ P., KASSIS M., RIGOURD V., MAGNY J.F. Prenatal treatment for congenital toxoplasmosis. Arch Pediatr, 2009;16:885-887.

KÖHLER S., RÖBLER D., HORNAUER S., UPMEIER B., FRANCK J., LIESENFELD O. Neutralization assay to resolve discrepancies between positive results in new highly sensitive anti-*Toxoplasma gondii* IgG assays and negative results in reference tests. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2010, 29, 359-363.

LACHAUD L., CALAS O., PICOT M.C., ALBABA S., BOURGEOIS N., PRATLONG F. Value of 2 IgG avidity commercial tests used alone or in association to date toxoplasmosis contamination. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 64, 267-274.

LAHMAR I., ABOU-BACAR A., ABDELRAHMAN T., GUINARD M., BABBA H., BEN YAHIA S., KHAIRALLAH M., SPEEG-SCHATZ C., BOURCIER T., SAUER A., VILLARD O., PAFAFF A.W., MOUSLI M., GARWEG J., CANDOLFI E. Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. J Infect Dis, 2009, 199, 1239-1244.

LAHMAR I., GUINARD M., SAUER A., MARCELLIN L., ABDELRAHMAN T., ROUX M., MOUSLI M., MOUSSA A., BABBA H., PAFAFF A.W., CANDOLFI E. Murine neonatal infection provides an efficient model for congenital ocular toxoplasmosis. Exp Parasitol.Epub, 2009 Sep 13.

MC LEOD R., KIEFFER F., SAUTTER M., HOSTEN T., PELLOUX H. Why prevent, diagnose, and treat congenital toxoplasmosis ? Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009, 10, 320-344.

MAUBON D., THUROT-GUILLOU C., RAVEL C., LECCIA M.T., PELLOUX H. *Leishmania killicki* imported from Tunisian desert. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15, 1864-1865.

MENOTTI J., GARIN Y.J., THULLIEZ P., SÉRUGUE M.C., STANISLAWIAK J., RIBAUD P., DE CASTRO N., HOUZÉ S., DEROUIN F. É., MONTFORT A., DE BADTS B., DOUIN-ECHINARD V., MARTIN P.G., IACOVONI J., NEVOIT C., THERVILLE N., GARCIA V., BERTRAND M.A., BESSIERES M.H., TROMBE M.C., LEVADE T., BENOIST H., SÉGUI B. FAN stimulates TNF(alpha)-induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response. *J Immunol*, 2009,183, 5369-5378.

MENOTTI J., GARIN Y.J., THULLIEZ P., SÉRUGUE M.C., STANISLAWIAK J., RIBAUD P., DE CASTRO N., HOUZÉ S., DEROUIN F. Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF 146527 genomic repeat. *Clin Microbiol Infect*, 2009 Jun 6. [Epub ahead of print].

MONTFORT A, DE BADTS B, DOUIN-ECHINARD V, MARTIN PG, IACOVONI J, NEVOIT C, THERVILLE N, GARCIA V, BERTRAND MA, BESSIERES MH, TROMBE MC, LEVADE T, BENOIST H, SÉGUI B. FAN stimulates TNF(alpha)-induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response. *J Immunol*. 2009;183(8):5369-78. Epub 2009 Sep 28.

RICHOMME C., AUBERT D., GILOT-FROMONT E., AJZENBERG D., MERCIER A., DUCROT C., FERTÉ H., DELORME D., VILLENA I. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet Parasitol*, 2009, 164, 296-300.

ROBERT-GANGNEUX F., YERA H., D'HERVE D., GUIGUEN C. Congenial toxoplasmosis after a preconceptional or periconceptional maternal infection. *Pediatr, Infect Dis J*, 2009, 28, 660-661.

SAUER A., LAHMAR I., SCHOLLER M., VILLARD O., SPEEG-SCHATZ C., BRUNET J., PFAFF A., BOURCIER T., CANDOLFI E. Development of murine models of ocular toxoplasmosis and preliminary results of ocular inflammatory transcriptome. *J Fr Ophtalmol*, 2009, 32, 742-749.

SAUVAGE V., AUBERT D., ESCOTTE-BINET S., VILLENA I. The role of ATP-Binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, 167, 81-94.

SCHMID A., SAUVAGE V., ESCOTTE-BINET S., AUBERT D., TERRY C., GARNOTEL R., VILLENA I. Molecular characterization and expression analysis of a P-glycoprotein homologue in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, 163, 54-60.

SENEGAS A., VILLARD O., NEUVILLE A., MARCELLIN L., PFAFF A.W., STEINMETZ T., MOUSLI M., KLEIN J.P., CANDOLFI E. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon-gamma-induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofoetal interface. *Int J Parasitol*, 2009, 39, 481-487.

SOUSA S., AJZENBERG D., MARLE M., AUBERT D., VILLENA I., CORREIA DA COSTA J., DARDÉ M.L. Selection of polymorphic peptides from GRA6 and GRA7 sequences of *Toxoplasma gondii* strains to be used in serotyping. *Clin Vaccine Immunol*, 2009,16, 1158-1169.

STERKERS Y., VARLET-MARIE E., CASSAING S., BRENIER-PINCHART M.P., BRUN S., DALLE F., DELHAES L., FILISSETTI D., PELLOUX H., YERA Y., BASTIEN P. Multicentric comparative proficiency study for the molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* using different PCR methods. *Accepté avec révisions dans Journal of Clinical Microbiology*.

STERKERS Y., VARLET-MARIE E., MARTY P., BASTIEN P. On behalf of the ANOFEL *Toxoplasma*-PCR Quality Control Group. Diversity and evolution of methods and practices for the

molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France : a four years survey. Clin Microbiol Infect, 2009 Nov 2. [Epub ahead of print].

TALABANI H., ASSERAF M., YERA H., DELAIR E., ANCELLE T., THULLIEZ P., BRÉZIN A.P., DUPOUY-CAMET J. Contributions of immunoblotting, real-time PCR and the Goldmann-Witmer coefficient to diagnosis of atypical toxoplasmic retinochoroiditis. J Clin Microbiol, 2009; 47, 2131-2135.

YERA H., FILISSETTI 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, 47, 3881-3886.

Communications nationales

BRENIER-PINCHART M.P., BERTINI R.L., CESBRON-DELAUW M.F., PELLOUX H. Souches de *Toxoplasma gondii* de type II isolées de toxoplasmose congénitale : phénotype *in vitro*. Journées de la Recherche Médicale, Grenoble, 24-25 avril 2009.

GILOT-FROMONT E., AFONSO E., LELU M., LEMOINE M., RICHOMME C., THORIN J., PONTIER D., PEYRON F., RABILLOUD M., THULLIEZ P., DARDE ML., LANGLAIS M., AUBERT D., ROMAND S., POULLE M.L., RICHAUME A., GEERS R., VILLENA I. Dynamique de *Toxoplasma gondii* à différentes échelles spatiales : la toxoplasmose une fausse endémie. 4^o Edition du Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM), Lyon, 31 Août au 3 Septembre 2009.

JUNG J., VILLARD O., KIRSCHVING M., GEHRES M., STEINMETZ T., CANDOLFI E. Evaluation du nouveau kit platelia Bio-Rad toxo pour la détection des IgG, IgM ET avidité des IgG. SFP, Poitiers, 16 Mai 2009.

MAUBON D., BOUGDOUR A., WONG Y.S., HAKIMI M.A., PELLOUX H. Inhibitions des histones-déacétylases : effets sur *Toxoplasma gondii* et perspectives thérapeutiques. Journées de la Recherche Médicale, Grenoble, 24-25 avril 2009.

MAUBON D., CURT A., BOUGDOUR A., WONG Y.S., HAKIMI M.A., PELLOUX H. Inhibitions des histones-déacétylases : effet sur *Toxoplasma gondii* et perspectives thérapeutiques. Congrès de la Société Française de Parasitologie, Poitiers, 17-18 juin 2009.

SAUER A., SCHOLLER M., VILLARD O., SPEEG-SCHATZ C., CANDOLFI E., BOURCIER T. Régulation de la réponse immunitaire locale au cours d'une toxoplasmose oculaire murine. Société Française d'Ophtalmologie, Paris, 8-11 Mai 2009.

VILLENA I. Actualités sur la surveillance de la toxoplasmose congénitale en France. Communication à l'Association Française des Enseignants en Parasitologie Pharmacie (AFEPP), Paris, 6 janvier 2009.

VILLENA I. Actualités sur la toxoplasmose et surveillance de la toxoplasmose congénitale en France. 6^o Journée Rémoise de Diagnostic Anténatal, Reims 9 Janvier 2009.

Communications internationales

BOUGDOUR A., MAUBON D., BALDACCI P., ORTET P., BASTIEN O., BOUILLON A., BARALE J.C., PELLOUX H., MENARD R., HAKIMI M.A. Drug-inhibition of HDAC3 and epigenetic control of differentiation in Apicomplexa parasites. 10th International Congress on Toxoplasmosis, Kerkrade (Pays-Bas), 19-23 juin 2009.

BRUNET J., PFAFF A.W., CANDOLFI E., MOUSLI M. Epigenetic transcriptional modulation induces host cell cycle arrest at G2 phase in *Toxoplasma gondii* infected cells. Xth Toxoplasma International Congress, Kerkrade (Netherlands), 19-21 Juin 2009.

DARDÉ M.L. Genotypes of *Toxoplasma* and virulence. Institute for Genetics, Köln (Allemagne), 12 janvier 2009.

DARDÉ M.L. (*speaker*), AJZENBERG D., AUBERT D., VILLENA I., on the behalf of the ToxoBS network. A seven-year experience of *Toxoplasma gondii* genotyping in human cases of toxoplasmosis at the Toxoplasmosis French National Reference Centre and the Biological Resource Centre (BRC *Toxoplasma*). Serbparzoon Project Conference: Parasitic zoonosis in present day Europe, focus on South East, Belgrade (Serbie), 18-20 Novembre 2009.

HALOS L., AUBERT D., THÉBAULT A., THOMAS M., PERRET C., GEERS R., ALLIOT A., DURAND B., BOIREAU P., VILLENA I. (*speaker*). Survey of the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in ovine meat in France. Serbparzoon Project Conference: Parasitic zoonosis in present day Europe, focus on South East, Belgrade (Serbie), 18-20 Novembre 2009.

MAUBON D., BOUGDOUR A., WONG Y.S., HAKIMI M.A., PELLOUX H. Drug-inhibition of HDAC activity : effect on the parasite *Toxoplasma gondii* and chemotherapy perspectives. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki (Finlande), 16-19 mai 2009.

SAUER A., LAHMAR I., SCHOLLER M., PFAFF A.W., SPEEG-SCHATZ C., MOUSLI M., GARWEG J., BOURCIER T., CANDOLFI E. Balance of Th17 and T regulatory responses in murine models of ocular toxoplasmosis. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Miami (USA), 3-7 Mai 2009.

SAUER A., LAHMAR I., SCHOLLER M., VILLARD O., PFAFF A.W., SPEEG-SCHATZ C., BRUNET J., MOUSLI M., GARWEG J., BOURCIER T., CANDOLFI E. Balance of Th17 and T regulatory responses in human and murine ocular toxoplasmosis. Xth *Toxoplasma* International Congress, Kerkrade (Netherlands), 19-21 Juin 2009.

VILLENA I., ANCELLE T., DELMAS C. and the National Centre of Reference for Toxoplasmosis Group. Surveillance system of congenital toxoplasmosis in France. Serbparzoon Project Conference: Parasitic zoonosis in present day Europe, focus on South East, Belgrade (Serbie), 18-20 Novembre 2009.

VUJANIC M., IVOVIC V., VILLENA I., KLUN I., YEAR Y., BOBIC B., NIKOLIC A., ZIVKOVIC T., DJURKOVIC-DJAKOVIC O. Molecular diagnosis of human *Toxoplasma* infection : increased sensitivity after bioassay. Serbparzoon Project Conference: Parasitic zoonosis in present day Europe, focus on South East, Belgrade (Serbie), 18-20 Novembre 2009.

YERA H. Molecular diagnosis and identification of human zoonotic parasites. Serbparzoon Project Conference: Parasitic zoonosis in present day Europe, focus on South East, Belgrade (Serbie), 18-20 Novembre 2009.

8- PROGRAMME D'ACTIVITE 2009-2010

8.1 Perspectives du Pôle Epidémiologie

- Le système national de déclaration des cas de toxoplasmoses congénitales mis en place en 2007 avec notification via le site Web du CNR de la toxoplasmosose par le réseau ToxoSurv ou via les fiches de notification adressées aux laboratoires authentifiés, sera renforcé par des relances trimestrielles auprès de l'ensemble des laboratoires participants (n=51). Des informations courtes concernant les modalités de surveillance sont transmises au réseau via des « newsletters » élaborées par le CNR Coordonnateur (voir Annexes). Elles seront régulièrement diffusées en 2010 pour sensibiliser les laboratoires du réseau à la notification des cas en vue d'améliorer l'exhaustivité du recueil.

Une première analyse des résultats de la notification effectuée en 2009 (fermeture de la base au 30 mars 2010) sera faite au mois d'avril sous le nouveau programme d'analyse STATA par le CNR Coordonnateur pour vérifier les fiches et demander des compléments d'informations aux centres si nécessaire (contrôle des incohérences, données manquantes...) avec demande de réponses avant septembre. Cette première analyse sera présentée à tous les membres du CNR lors de la réunion annuelle du CNR (programmée les 25 et 26 septembre 2010 à Limoges). Elle sera également diffusée aux membres du réseau Toxosurv. Le cas échéant, les centres notifiant les cas pourront nous interpeller pour rectifier ou compléter des données.

Une nouvelle analyse sera faite par le centre coordonnateur en octobre pour être présentée et validée par l'InVS en collaboration avec le comité de Pilotage « Toxosurv » au cours du dernier trimestre 2010. Une comparaison des notifications des trois années (2007-2009) sera faite afin de suivre les tendances de cette affection et pour répondre aux objectifs de surveillance des maladies infectieuses mis en place par l'InVS avec les différents CNR.

- La collaboration initiée en 2009 avec l'Agence de Biomédecine sera poursuivie pour comparer les niveaux de déclaration des cas de toxoplasmoses congénitales en période anténatale (comparaison des données de la base de surveillance Toxosurv 2008 avec les données adressées par les centres de diagnostic prénatal à l'Agence.

- Le système d'information aux professionnels de santé sera développé et structuré avec accès direct via le site Web du CNR. Un accès libre à toutes personnes est pour l'instant en place pour la consultation de ce site. Les guides de bonnes pratiques en matière de diagnostic sérologique et par biologie moléculaire seront diffusés aux professionnels de santé.

- Les études visant à mieux connaître l'épidémiologie de la toxoplasmosose animale se poursuivront via des collaborations avec les différents partenaires cités ou de nouveaux partenaires (par exemple, collaboration avec la Roumanie au sein d'un programme Européen EGIDE pour un plan de surveillance viande ovine en 2010) et en lien avec le Pôle Souches.

8.2 Perspectives du Pôle Souches

- Mise au point d'une PCR multiplex avec 15 microsatellites pour améliorer la discrimination des génotypes.

- Etudier à l'aide de 15 microsatellites une sélection de souches françaises issues de toxoplasmoses congénitales pour comprendre l'épidémiologie locale (flux génétiques, distribution des génotypes multilocus à travers la France)

- Meilleure définition des génotypes atypiques, collaboration avec des chercheurs des USA (C. Su, JP Dubey) étudiant les génotypes par 10 marqueurs PCR-RFLP pour essayer de définir des groupes au sein de ces génotypes atypiques.

- Séquençage haut débit de certaines souches atypiques provenant du CNR/CRB dans une étude financée par le NIH aux USA (projet D. Sibley)

Aspects organisationnels

- . Améliorer l'acquisition des données cliniques et épidémiologiques associés aux envois des souches
- . Développement du site Web Pôle Souches

8.3 Perspectives du Pôle Sérologie

- Les logigrammes issus du guide d'interprétation sont en cours de réalisation et devraient être validés par le groupe de travail puis par le réseau au cours du deuxième trimestre 2010. Il en ira de même pour la mise en ligne sur le site du CNR du guide d'interprétation à l'usage des biologistes prenant en charge le diagnostic sérologique de la toxoplasmose.
- Une évaluation des différentes trousse disponibles sur le marché pour l'avidité des IgG (Diasorin, Biorad, Abbott et Biomérieux) sur des panels spécifiques de toxoplasmoses évolutives et de toxoplasmoses chroniques est en cours.
- La constitution de nouveaux panels 1, 2 et 3 est en cours de réalisation afin de poursuivre l'analyse des trousse disponibles sur le marché, essentiellement les réactifs sur automates.
- Le pôle Sérologie a été sollicité par la CNAM afin de rédiger un document de proposition de nomenclature pour la prise en charge du diagnostic sérologique de la toxoplasmose (Annexe 5 Pôle Sérologie). Les responsables des 3 autres Pôles d'activités du CNR sont également impliqués dans ce travail. Ce document servira de base à la CNAM pour une prise en charge totale ou partielle des examens biologiques assurant le diagnostic de la toxoplasmose (sérologie et biologie moléculaire).

8.4 Perspectives du Pôle Biologie Moléculaire

- Elaboration d'un matériel biologique de référence.

La production de ce matériel étalon va être affinée et diversifiée : (i) les faibles concentrations continueront à être envoyées pour le CQE national, mais avec un nombre de tubes adapté aux possibilités de détection, prenant en compte la distribution statistique des toxoplasmes dans l'échantillon et des travaux empiriques réalisés en 2009 au sein du Pôle avec ce type de concentrations. (ii) Par ailleurs, de fortes concentrations seront également fournies, de façon indépendante dans le temps, en vue d'une auto-évaluation par les laboratoires français des performances de leurs propres méthodes moléculaires. Ce matériel sera accompagné d'un guide de réalisation pratique et de conseils destinés à augmenter l'efficacité du procédé. (Objectif non atteint en 2009). (iii) Enfin, le même type de matériel sera fondamental dans l'approche d'homogénéisation des pratiques de quantification, seule condition pour pouvoir réaliser et surtout interpréter des études multicentriques au sujet de la charge parasitaire.

- CQE national en DPN de la toxoplasmose

Cette action sera poursuivie. Les faibles concentrations continueront à être privilégiées en 2010 afin de continuer à travailler la sensibilité. D'autres souches que la souche RH (souches de type II et atypiques rencontrées en routine en 2009, obtenues du Pôle Souches) seront également essayées en parallèle afin de se rapprocher davantage des conditions rencontrées en routine.

Des variantes des contrôles de qualité seront également proposées. Ils consisteront (i) d'une part en des concentrations plus fortes destinées à être extraites puis diluées par les laboratoires eux-mêmes, ceux-ci devenant autonomes dans une démarche d'auto-évaluation et (ii) en des concentrations au contraire plus faibles qu'en 2009, mais répétées sur plusieurs échantillons de façon à éliminer le risque de faux négatifs lié à la distribution statistique (Loi de Poisson).

- Evaluations multicentriques des méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

L'objectif d'évaluer et classer les différentes méthodes de diagnostic moléculaire utilisées dans les laboratoires au sein du Pôle a été atteint ; toutefois d'autres évaluations sont prévues afin de proposer une homogénéisation des méthodes à l'ensemble des laboratoires du CNR.

- Evaluation de trousse commerciales pour le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose congénitale en pré-natal

Deux trousse différentes, récemment mises sur le marché, seront évaluées au sein du Pôle en comparaison avec des méthodes "maison" :

- à Strasbourg, évaluation d'un kit commercial utilisable sur plusieurs types d'appareils en temps réel (Monsieur Sébastien Wurtzer, Société BioAdvance).
- à Montpellier, évaluation du récent kit Roche®.

- Evaluation de kits d'extraction d'ADN commercialisés

Deux études de comparaison de kits d'extraction d'ADN commercialisés sont prévues dans les Laboratoires-Support de Dijon (méthode manuelle Qiagen® et automate d'extraction 8LX BIONOBIS®) et de Paris-Pitié (méthode manuelle Qiagen® et automate Magnapure ROCHE®).

- Méthodes diagnostiques innovantes : Le laboratoire de Paris-Pitié a démarré un travail sur l'intérêt de la spectrométrie de masse pour le diagnostic de la toxoplasmose oculaire. Ce travail sera poursuivi en 2010.

- Recommandations / site Internet

La rédaction de recommandations concernant le "Diagnostic Moléculaire de la Toxoplasmose" continue à faire partie des objectifs du Pôle "Biologie Moléculaire" mais a pris du retard en raison de la complexité des analyses et études multicentriques dans ce domaine où quasiment rien n'est standardisé. La stratégie adoptée est de sub-diviser ces recommandations en un nombre de points précis et de rédiger les différents items point par point. Chaque point rédigé et approuvé par les membres du CNR pourra faire l'objet d'une page sur le site du CNR.

Un premier volet de recommandations s'adressera aux biologistes amenés à réaliser ce diagnostic moléculaire. Elles porteront sur les bonnes pratiques de ce diagnostic (prévention des contaminations, témoins d'inhibition, témoins de contamination, nombre de tubes, ...).

Un deuxième volet de recommandations, adressé aux professionnels de santé, attirera l'attention sur les difficultés et l'interprétation de ce diagnostic et fera le point sur la conduite à tenir recommandée en cas de diagnostic positif ou négatif. Ces recommandations concerneront en priorité le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, mais il peut être envisagé dans les années suivantes de les élargir à la toxoplasmose de l'immuno-déprimé.

Des recommandations plus poussées visant à une homogénéisation des méthodes de diagnostic par PCR devront attendre la validation d'études comparatives qui s'avèrent complexes. Par exemple, il pourra être proposé des seuils de détection minimum «standardisés» qui serviraient de référence aux différents laboratoires concernés.

Ces recommandations devront être diffusées aux professionnels via le site internet du CNR. Comme cela a été commencé en 2009 pour le recensement des activités de diagnostic proposées par les membres du CNR (en particulier les pratiques pour le diagnostic immunologique), le site pourrait également recenser la diversité des diverses pratiques et méthodes du diagnostic par biologie moléculaire en France.

CONCLUSION

Le CNR de la Toxoplasmose, créé en 2006, a assuré **une structuration en réseau** reposant sur l'ensemble des laboratoires spécialisés dans le diagnostic de la toxoplasmose (acquise, congénitale, de l'immunodéprimé) sur le territoire national (et DOM-TOM). Pour remplir ses différentes missions d'expertise, contribution à la surveillance, alerte, conseils aux professionnels, le CNR s'est structuré autour de **quatre Pôles d'activités**. Ainsi le **laboratoire Coordonnateur** (Pôle Epidémiologie) assisté de **trois Laboratoires Associés** (Pôle Souches, Pôle Sérologie, Pôle Biologie moléculaire), a entrepris depuis sa création, différentes **actions répondant bien aux missions qui lui ont été confiées**. Le réseau du CNR participe activement aux différents travaux et permet d'assurer un enrichissement continu des connaissances dans le domaine de la toxoplasmose.

Le CNR poursuit ses activités toujours en lien avec les laboratoires de son réseau mais aussi avec les laboratoires d'analyses médicales (privés ou publics) exerçant un rôle dans le diagnostic de cette affection (par exemple en faisant participer ces laboratoires à diverses enquêtes afin d'identifier mieux les pratiques de diagnostic) dans le souci d'une aide aux professionnels de santé. Pour répondre à un objectif d'évaluation de la pertinence de la politique de prévention de la toxoplasmose congénitale mis en place depuis 1978 par les autorités, **le CNR de la Toxoplasmose en collaboration avec l'InVS a instauré un système de surveillance** de cette affection sur la base d'une **notification des cas de toxoplasmose congénitale** reposant sur une collaboration avec tous les acteurs impliqués dans ce diagnostic (laboratoires d'analyses médicales spécialisés ou polyvalents en charge de ce diagnostic) soit 48 laboratoires impliqués dans cette surveillance. **La pérennisation de ce système de surveillance est confiée au CNR par recueil des notifications de cas depuis 2007**. L'analyse des résultats permet de suivre les tendances de l'infection, pouvant ainsi contribuer dans les années à venir à la réévaluation de la politique de prévention instaurée en France depuis 1978 (comme préconisé dans le rapport de l'HAS, 2009). Les cas notifiés pendant les deux années d'étude (2007 et 2008) montrent **une stabilité de la maladie avec une prévalence globale de la toxoplasmose congénitale inférieure à celle estimée à partir d'enquêtes anciennes**. Ce système de surveillance est unique en Europe et témoigne de l'importance de la France dans le domaine d'étude de cette affection.

Le CNR poursuit la **collecte des souches responsables de toxoplasmose en vue de leur caractérisation génotypique et de leur conservation**, assurant ainsi les **missions de surveillance** et les cas échéant d'**alerte** qui lui sont confiées. Une alerte concernant des cas groupés de toxoplasmose dans la région de Montpellier (Hérault) a ainsi été relayée à l'InVS qui en a assuré via la CIRE du Languedoc, l'investigation épidémiologique. L'identification d'une souche atypique provenant de viande de cheval importée et probablement à l'origine d'un cas mortel de toxoplasmose a été également signalée. Le CNR collabore entre autres avec le LNR « Parasites transmis par l'alimentation » pour évaluer le niveau de contamination des viandes en France, contribuant à une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la toxoplasmose.

En développant et évaluant les techniques de diagnostic sérologique et moléculaire, le CNR contribue **aux missions de conseils et d'aide** aux laboratoires français en charge de ce diagnostic. Un objectif important est de finaliser des guides d'interprétation des résultats et de proposer des positions de consensus quant aux techniques à mettre en œuvre pour réaliser un diagnostic optimum et fiable. Un lien doit notamment être fait avec les cliniciens en charge de cette affection. En 2009, **le guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques** a été validé par l'ensemble des membres du CNR, ainsi que les deux questionnaires sur les pratiques dans le diagnostic sérologique. Le Contrôle de Qualité en biologie moléculaire a montré une excellente sensibilité et spécificités des méthodes de diagnostic pratiquées par l'ensemble des laboratoires du CNR ayant participé (n=28).

Enfin, le site internet du CNR est un outil important dans la diffusion des informations relatives à cette affection, il est en lien avec le site du Centre de Ressources Biologiques dédié à Toxoplasma.