



INSTITUT  
DE VEILLE SANITAIRE

Surveiller, alerter, prévenir

# **RAPPORT ANNUEL d'ACTIVITES**

## **CNR TOXOPLASMOSE**

**Année 2011**

Pr I. VILLENA

Coordonnateur du CNR Toxoplasmose

Laboratoire de Parasitologie

Hôpital Maison Blanche

45, rue Cognacq Jay

51092 REIMS CEDEX

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>2</b>
<b>1/ INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
1-1 Contexte du CNR de la Toxoplasmose.....	4
1-2 Les missions :.....	5
a) Missions de contribution à la surveillance :.....	5
b) Mission d’alerte :.....	6
c) Mission de conseil :.....	6
1-3 Résumé: Faits marquants du CNR de la toxoplasmose (année 2011). .....	7
1-4 Organisation du CNR Toxoplasmose: (Liste de laboratoires du réseau, Annexe 1).....	9
a) Organigramme global.....	10
b) Organigramme par laboratoire .....	11
1-5 Locaux et Equipements .....	15
a) Description des locaux (Laboratoire Coordonnateur et Laboratoires Associés) : .....	15
b) Description des équipements :.....	18
1-6 Démarche qualité des laboratoires du CNR:.....	19
<b>2/ ACTIVITES D’EXPERTISE .....</b>	<b>22</b>
2-1 Capacités techniques du CNR .....	22
a) Liste des techniques de référence et recommandées par le CNR: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux .....	22
b) Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles .....	25
c) Collections de matériels biologiques : souches, antigènes ou immun-sérums de référence, ... ..	25
2-2 Activités d’expertise de l’année 2011 .....	27
a) Décrire le nombre de souches ou prélèvements réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (typage phénotypique, génotypique ...) .....	27
b) Décrire le nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats.....	28
c) Décrire le nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués.....	29
d) Analyse de l’évolution des tendances en termes d’activités.....	29
<b>3/ ACTIVITES DE SURVEILLANCE .....</b>	<b>34</b>
3-1 Surveillance de l’évolution et des caractéristiques des infections.....	34
a) Réseau de partenaires .....	34
b) Définition de l’échantillon de souches isolées.....	35
c) Analyse de la distribution des différents types d’agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances .....	35
d) Contribution à la surveillance nationale en interface avec l’InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune).....	39
e) Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux dans les domaines suivants : santé animale, alimentaire, environnement.....	43
3-2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux .....	43
a) Définition de l’échantillon de souches testées :.....	43
b) Définitions utilisées pour exprimer la résistance :.....	43

<b>3-3 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux .....</b>	<b>43</b>
<b>3-4 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens .....</b>	<b>44</b>
<b>3-5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance .....</b>	<b>44</b>
<b>4/ ALERTE .....</b>	<b>46</b>
a) décrire la procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal .....	46
b) descriptif des phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année .....	46
c) analyse des tendances et du fonctionnement du système .....	46
<b>5/ ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL .....</b>	<b>48</b>
<b>5-1 Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires, .....</b>	<b>48</b>
<b>5-2 Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion) .....</b>	<b>53</b>
a) Guide concernant la sérologie toxoplasmique : .....	53
b) Guide concernant la pratique de la Biologie Moléculaire : .....	53
<b>5-3 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR : .....</b>	<b>54</b>
a) Rétro-information aux partenaires : .....	54
b) Diffusion aux professionnels : conférences, Site web .....	54
<b>5-4 Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...) .....</b>	<b>55</b>
<b>5-5 Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...) .....</b>	<b>55</b>
<b>6/ TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR ...</b>	<b>56</b>
<b>6-1 Pôle Épidémiologie : .....</b>	<b>56</b>
a) Etude de la circulation dans l'environnement des protozoaires pathogènes (incluant <i>T. gondii</i> ) pour l'homme à transmission alimentaire/hydrique .....	56
b) Pathogénicité de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	56
<b>6-2 Pôle Souches: .....</b>	<b>57</b>
a) Structuration spatiale des génotypes de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	57
b) Isolement et génotypage des toxoplasmes de la viande de cheval importée .....	57
<b>6-3 Pôle Sérologie: .....</b>	<b>58</b>
<b>6-4 Pôle Biologie moléculaire: .....</b>	<b>59</b>
<b>7/ LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....</b>	<b>60</b>
<b>8/ PROGRAMME D'ACTIVITE N+1 .....</b>	<b>61</b>
<b>8-1 Perspectives du Pôle Epidémiologie: .....</b>	<b>61</b>
<b>8-2 Perspectives du Pôle souches: .....</b>	<b>62</b>
<b>8-3 Perspectives du Pôle Sérologie: .....</b>	<b>62</b>
<b>8-4 Perspectives du Pôle Biologie Moléculaire: .....</b>	<b>62</b>

# CNR Toxoplasmose

## 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 étaient 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, laboratoire coordonnateur (Reims), qui est en charge du Pôle Epidémiologie, est entouré de 3 Laboratoires Associés animant 3 Pôles d'activités : Pôle Souches (Limoges), Pôle Sérologie (Strasbourg) et Pôle Biologie moléculaire (Montpellier). 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. Le CNR de la Toxoplasmose a été renommé pour la période 2012-2016 en proposant une poursuite des mêmes missions et selon la même organisation en réseau (Annexe 1).

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 en France a varié considérablement depuis 30 ans avec une baisse de prévalence régulière. Les dernières données de séroprévalence (données de l'enquête nationale périnatale de 2003, publiées dans le BEH de 2008) faisaient état d'une séroprévalence de 43,8% chez les femmes en âge de procréer. De nouvelles données devraient être disponibles au cours de l'année 2012, résultant de la dernière enquête périnatale menée fin 2010 (données non encore disponibles selon l'InVS).

Généralement bénigne pour l'homme, cette maladie peut cependant être grave dans certaines circonstances :

1/ Chez la femme enceinte, où une primo-infection toxoplasmique peut être transmise au fœtus atteint de toxoplasmose congénitale (TC) pouvant entraîner de graves séquelles. Les formes inapparentes paraissent les plus fréquentes à l'heure actuelle mais leur pronostic évolutif demeure incertain (risque de choriorétinites 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. Depuis 2007, le CNR en collaboration avec l'InVS a instauré une surveillance de cette maladie au niveau national avec notifications des cas de TC via un réseau de laboratoires publics et privés pratiquant le diagnostic de cette affection (mission du Laboratoire coordonnateur Pôle Epidémiologie).

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 expliquait la très forte incidence de la toxoplasmose observée dans les années 1980-90 au cours du SIDA. Depuis les années 2000, avec l'introduction des nouvelles chimiothérapies anti-virales (anti-rétroviraux en combinaison), une diminution des cas est observée (avec souvent découverte du statut VIH en même temps qu'est posé le diagnostic de la toxoplasmose dite opportuniste). 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 (mission du Laboratoire Associé Pôle Souches).

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 des objectifs 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 sont rédigés par le CNR et diffusés à l'ensemble des professionnels de santé (missions des Laboratoires associés Pôle Sérologie et Pôle Biologie moléculaire).

### 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.

#### **a) 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 (LNR)

« 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 impliqués dans la transmission de la maladie).

Un Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma est intégré au CNR de la Toxoplasmose, avec un partenariat entre le Pôle Epidémiologie et le Pôle Souches (inclusion des souches collectées dans le cadre du CNR dans le CRB). Avec le Pôle Epidémiologie, ce CRB 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. Il est mené par différents laboratoires membres du CNR, sous la responsabilité du Laboratoire coordonnateur.

#### ***b) 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.

#### ***c) 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 anténatal de la toxoplasmose congénitale.

### 1-3 Résumé: Faits marquants du CNR de la toxoplasmose (année 2011).

Les activités de surveillance de la toxoplasmose congénitale se sont poursuivies en 2011, avec la notification des cas diagnostiqués en 2011 par l'ensemble des membres du réseau Toxosurv (50 laboratoires en France, majoritairement des laboratoires de parasitologie de CHU). Cette déclaration des cas basée sur le volontariat, permet d'avoir une surveillance active de la maladie. L'analyse des cas de l'année N-1 est faite l'année N (année du rapport). Les cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués par le réseau en 2010 ont été analysés en 2011 par le Laboratoire Coordonnateur avec un programme statistique développé spécifiquement pour cette application (sous le logiciel STATA) et selon un plan d'analyses validé par l'InVS. Ces résultats d'analyses sont adressés aux membres du CNR et du réseau Toxosurv et à l'InVS, ils décrivent le réseau de surveillance, l'épidémiologie de l'affection (caractéristiques des infections), les performances du diagnostic (en période anté et/ou postnatale) 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 sont suivis au cours du temps pour connaître l'évolution de la maladie. En 2010, une diminution du nombre de cas notifiés est observée (244 cas vs 266 en 2009) mais avec la même proportion de cas symptomatiques (18 cas) et asymptomatiques (189 cas) que pour les années antérieures; par ailleurs 12 interruptions médicales ont été dénombrées (11 interruptions pour raison médicale et 1 mort foetale).

**La prévalence globale de la toxoplasmose congénitale observée en France en 2010 est de 2,9 pour 10 000 naissances et la prévalence des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués à la naissance est de 1.6 pour 10 000 naissances. La létalité liée à la toxoplasmose congénitale est de 4,9 % (en diminution par rapport à celle observée l'année 2010 pour les cas diagnostiqués en 2009, mais à peu près équivalente aux années antérieures) et la morbidité globale représente 8,7 %.**

Une enquête sur l'exhaustivité du recueil sera envisagée si cette baisse était à nouveau constatée en 2012 (lors de l'analyse des cas notifiés par le réseau en 2011).

Ce système de surveillance est unique en Europe de part le relevé (quasi-exhaustif) de l'ensemble des cas de toxoplasmoses congénitales diagnostiqués en France (métropole et DOM-TOM). Des données épidémiologiques relatives à la surveillance des toxoplasmoses congénitales de l'année 2009 ont été adressées à l'ECDC via l'InVS en début d'année 2011 ; celles relatives à l'année 2010 l'ont été en avril 2012.

Aucune alerte concernant des cas groupés de toxoplasmose acquise n'a été faite en 2011, contrairement à la TIAC décrite en 2010.

Un objectif important contribuant à la surveillance et le cas échéant à l'alerte réside dans la collecte des souches responsables de toxoplasmose et leur caractérisation génotypique. Le nombre de prélèvements adressés au Pôle Souches du CNR a augmenté par rapport à l'année précédente (207 vs 187 en 2010, soit +9,2%). Cette augmentation concerne les extraits d'ADN de produits pathologiques alors que le nombre de souches isolées est en baisse. En 2011, sur les 207 prélèvements reçus, 55% proviennent de cas de toxoplasmose congénitale, 28,9% de toxoplasmoses systémiques de patients immunodéprimés, 11,1% de cas de toxoplasmoses oculaires. Les prélèvements provenant de cas de toxoplasmoses systémiques chez des patients immunocompétents restent rares (6 patients).

La sensibilité de la technique PCR multiplex 15 microsattellites (MS) a été évaluée sur les ADN extraits de produits pathologiques à une détection d'ADN toxoplasmique au-dessous de 33 ct en PCR quantitative.

Le génotypage confirme la prédominance du type II (84% des 125 patients, 93,5% des cas de toxoplasmoses congénitales), la stabilité du génotype III (4%), plus fréquent lors de contaminations hors du territoire métropolitain. L'influence géographique se retrouve dans l'isolement des génotypes différents des types II et III : « Africa 1 » (2 cas) chez des patients africains, « Caribbean » (2 cas dont un chez un patient guadeloupéen), « Amazonian » chez 2 patients contaminés à partir de viande de gibier en Guyane. Des génotypes atypiques

divers ont été retrouvés chez des patients en Guyane, et pour la première fois en Polynésie française.

Un nouveau cas de toxoplasmose sévère avec souche atypique a été observé après consommation de viande de cheval importée d'Amérique du Sud (Argentine). Ceci porte à 6 le nombre de cas observés au CNR, avec, le plus souvent, une symptomatologie sévère. Le CNR de la toxoplasmose (Laboratoire Coordonnateur) et le Laboratoire National de Référence en santé animale (Maisons-Alfort) ont interpellé en octobre 2011 la Direction Générale de l'Alimentation pour mener une enquête exploratoire sur ce type de viande auprès des services impliqués dans les plans de contrôle sur les viandes de cheval importées. Des travaux sont en cours visant à la meilleure détection des toxoplasmes dans les viandes. Un plan de surveillance des viandes chevalines à plus large échelle (tels ceux conduits en 2007 et 2009 sur les viandes ovines et bovines consommées en France) devrait être proposé en collaboration avec la DGAL pour l'année 2013.

Par ailleurs, lors de sa mission de surveillance des génotypes de souches de *Toxoplasma gondii* isolées de cas humains de toxoplasmose en France, le Pôle Souches a identifié une sur-représentation d'un génotype de *Toxoplasma gondii* en 2010 : un génotype multilocus identique avec 15 marqueurs MS et appartenant au type II a été identifié chez 13 patients atteints de toxoplasmose (12 toxoplasmoses congénitales et 1 primo-infection de l'immunodéprimé). Grâce au fort pouvoir de discrimination de la méthode de typage, le CNR pense qu'il s'agit d'une seule et même souche. Etant donné la période de contamination des cas et le lieu de résidence de plus de la moitié des patients, les fruits de mer (huîtres par exemple) pourraient être à l'origine de la contamination par cette souche de *Toxoplasma gondii*. Le CNR a sollicité l'expertise de l'InVS pour confirmer cette hypothèse par une enquête épidémiologique avec interrogatoire des patients. Toutefois, l'InVS n'a pas souhaité mener un travail d'investigation sur un seul événement de ce type; si ce même clone avait été retrouvé lors des analyses génotypiques en 2011, une enquête épidémiologique aurait été conduite. Ce phénomène n'a pas été observé par la suite.

Les souches recueillies dans le cadre du CNR sont conservées au sein du CRB Toxoplasma multi-site (Reims et Limoges), ce CRB est certifié depuis janvier 2010 selon la norme spécifique aux CRB (NF S 96 900), assurant l'assurance qualité de ce CRB. Des échanges ont lieu avec les chercheurs du CNR mais également de la communauté internationale.

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 Pôles en charge de ces activités ont continué leurs travaux d'expertises en réseau avec l'appui de leurs Laboratoires-Supports

Le Pôle Sérologie a terminé l'évaluation des trousseaux diagnostiques pour les IgG et les IgM disponibles sur le marché, en testant les réactifs sur des panels de sérums bien caractérisés (grâce à la Biothèque constituée par ce Pôle depuis le début du CNR en faisant appel à l'ensemble des membres du CNR pour envoi de sérums) permettant d'évaluer la sensibilité et la spécificité des réactifs proposés par les différents fabricants. Certaines données sont en cours de publication (résultats d'évaluation portant sur les réactifs d'agglutination et sur les coffrets d'avidité), d'autres encore confidentielles (méritant parfois d'être confirmées) sont en annexe du rapport d'activités.

L'activité du Pôle Biologie moléculaire a été principalement concentrée sur l'évaluation des méthodes de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose, ainsi que d'actions en vue de l'homogénéisation des méthodes :

En vue de l'objectif d'homogénéisation des méthodes de diagnostic moléculaire à un niveau national, le Pôle a proposé en 2011 des seuils de sensibilité/détection minimum qui devraient être atteints par les laboratoires membres du CNR. Ces seuils ont été définis grâce à des contrôles de qualité externes réalisés au sein du Pôle. Une autre étude a été faite en 2011 afin d'une part d'affiner ce seuil, d'autre part de proposer des seuils en toxoplasmes par mL, qui permettraient de faire le lien avec le Contrôle de Qualité National. Cette étude a révélé de grandes disparités dans les limites de sensibilité des techniques dès lors qu'on



prenait en compte les pratiques pré-analytiques (volume de liquide amniotique analysé), obligeant à prendre fortement ces aspects en compte dans l'établissement de futures recommandations.

Par ailleurs, des échantillons "standard" lyophilisés, destinés à réaliser une gamme "standard" de quantification, ont été mis à disposition de la communauté nationale avec un protocole standard d'utilisation, participant à l'objectif d'élaboration d'un matériel biologique de référence. Cette action avait en vue l'objectif d'homogénéisation (i) des performances de sensibilité de la PCR (en fonction du seuil défini plus haut) et (ii) de la quantification des charges parasitaires.

Le Contrôle de Qualité National en Diagnostic prénatal de la toxoplasmose a été renouvelé pour la dixième fois en 2011, sous l'égide du CNR. Une des nouveautés a été d'inclure d'une part une souche isolée à partir d'une toxoplasmose congénitale récente (type II); d'autre part d'inclure des échantillons de plasma. Les résultats montrent encore une excellente sensibilité globale de la PCR-Toxoplasma en France, mais continuent d'attirer l'attention sur la vigilance à accorder à cet examen, puisque cette année, des faux positifs ont été relevés. L'évaluation d'une trousse commerciale de PCR-Toxoplasma a été réalisée de manière multicentrique et en comparaison avec des méthodes "maison"; d'après les résultats obtenus, ce nouveau kit montre un niveau de performance satisfaisant (article en cours). De plus, une étude comparative multicentrique a été réalisée fin 2011-t 2012 sur les performances (en termes de sensibilité et de reproductibilité) de différentes méthodes d'extraction de l'ADN de toxoplasme à partir du liquide amniotique.

Une autre des missions importantes du CNR concerne la formation et l'information des professionnels de santé dans le domaine d'expertise du CNR. Les formations relatives à la toxoplasmose sont nombreuses et réalisées par l'ensemble des laboratoires membres du CNR soit lors d'enseignements aux étudiants des professions de santé, soit lors de conférences pour les professionnels de santé. Le CNR organise avec ses membres une journée annuelle d'échanges sur les résultats des expertises menées lors de l'année écoulée et sur les activités de l'année à venir. Les enquêtes ponctuelles faites par les différents Pôles font l'objet de retour détaillé aux membres du CNR. Les résultats de la surveillance des toxoplasmoses congénitales sont diffusés à l'ensemble des laboratoires participants (réseau Toxosurv). Un site internet du CNR de la Toxoplasmose est disponible et permet la mise en ligne des principaux résultats de surveillance et d'expertise menés par le CNR.

Pour l'année 2012, une modification du site permettra un accès réservé aux professionnels avec diffusion de documents plus spécialisés et techniques sur les évaluations des trousse de diagnostic et les recommandations en terme de pratique de diagnostic.

Dans cette optique de formation et d'information, des guides ou recommandations sont émis par le CNR. Un guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques a été élaboré par les membres du CNR sous forme d'un article (Feuillets de Biologie, 2011) et de logigrammes à destination des laboratoires de Biologie Médicale qui sont en charge du diagnostic sérologique de la toxoplasmose, ce guide est accessible sur le site du CNR ([http://www.chu-reims.fr/CNR toxoplasmose](http://www.chu-reims.fr/CNR_toxoplasmose)).

Un premier volet de recommandations sur le diagnostic de la toxoplasmose congénitale par biologie moléculaire, destiné aux professionnels de santé, a été rédigé par le Pôle Biologie moléculaire et mis en ligne sur le site du CNR. Un deuxième volet de recommandations plus technique a été abordé sur l'intérêt de l'examen du placenta pour le diagnostic de toxoplasmose congénitale et les pratiques concernant ce diagnostic. Il a été adressé aux membres du CNR.

Les membres du CNR ont participé en 2011 à 31 publications et 30 communications.

#### 1-4 Organisation du CNR Toxoplasmose: (Liste de laboratoires du réseau, Annexe 1).

### **a) Organigramme global**

Le CNR Toxoplasmose fonctionne en réseau, en s'appuyant sur les laboratoires déjà fortement impliqués dans le diagnostic, l'épidémiologie, le traitement de la toxoplasmose et reconnus pour leur domaine d'excellence dans la toxoplasmose. Un Laboratoire Coordonnateur et des Laboratoires Associés (reconnus pour leur mission d'expertise dans un domaine d'activité ciblée) assistés par un groupe de travail (Laboratoires Supports) sont inclus dans cette organisation. L'ensemble des Laboratoires impliqués dans ce CNR ont proposé la structuration suivante dès 2006:

Un Laboratoire Coordonnateur (CHU Reims), travaillant en lien étroit avec l'InVS.

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

Trois Laboratoires Associés, responsables d'un pôle d'activités, avec un responsable par pôle :

ML. Dardé, Responsable du Pôle Souches : Epidémiologie moléculaire et Chimiosensibilité (CHU Limoges).

E. Candolfi, Responsable du Pôle Sérologie (CHU Strasbourg).

P. Bastien, Responsable du Pôle Biologie Moléculaire (CHU Montpellier).

Des Laboratoires Supports (n= 16) constituant 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= 30), constitués par l'ensemble des laboratoires qui ont manifesté leur souhait de participer aux activités du CNR, ils sont notamment en première ligne pour la mission d'alerte sur l'apparition de cas groupés. Ces laboratoires de CHU 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 sont, à un échelon local, référents pour les laboratoires hospitaliers et privés dont ils sont un interlocuteur constant.

Total ETP affecté CNR Toxoplasmose :	6,38	
Biologistes :		
PU-PH	1,05	ETP
MCU-PH/ PH/ AHU:	2,5	ETP
Techniciens/ Ingénieur :	1,9	ETP
Secrétariat :	0,53	ETP
Attaché de Recherche Clinique:	0,4	ETP

**b) 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)
VILLENA Isabelle	PU-PH,	CHU /Université Reims	0,25
AUBERT Dominique	MCU-PH	CHU /Université Reims	(Pôle souches)
CHEMLA Cathy	PH	CHU Reims	0,05
DUBOIS Laurence	Secrétaire	CHU Reims	0,20
ORTIS Naïma	Technicienne	CHU Reims	0,10
GEERS Régine	Technicienne	CHU Reims	0,05
DELMAS Christelle	ARC	CHU Reims/ InVS	0,40
<b>Laboratoires Supports</b>			
DARDÉ Marie-Laure	PU-PH	Université Limoges/CHU	0,05
ANCELLE Thierry	MCU-PH	Université Paris 5 /Cochin	0,10
PRATLONG Francine	MCU-PH	Université Montpellier/CHU	0,10
MARTY Pierre	PU-PH	Université Nice/CHU	0,10
FERRET Nicole	PH	CHU Nice	0,05
FAVENNEC Loïc	PU-PH	Chu Rouen	0,05
FILLAUX Judith	MCU-PH	Université Toulouse/CHU	0,10
CARME Bernard	PU-PH	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	0,10
SIMON Stéphane	Technicien	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	0,05

Soit au total : 1,75 ETP

Biologistes :	PU-PH	0,55	ETP
	MCU-PH	0,30	ETP
	PH	0,10	ETP
Attaché Recherche Clinique :		0,40	ETP
Techniciens :		0,20	ETP
Secrétariat :		0,20	ETP

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

Pr. M L Dardé, Responsable

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance (organisme payeur)	Temps consacré (ETP)
DARDÉ Marie-Laure	PU-PH	Université Limoges/CHU	0,10
AJZENBERG Daniel	MCU-PH	Université Limoges/CHU	0,20
RIABI Homayoun	Technicien	CHU Limoges/InVS	0,50
DEMOMENT Jacques	Animalier	CHU Limoges	0,20
TARRADE Christine	Secrétaire	CHU Limoges	0,05
<b>Laboratoires Supports</b>			
AUBERT Dominique	MCU-PH	CHU /Université Reims	0,10
DUPUIS Emilie	Technicienne	CHU Reims	0,05
DEMAR Magali	Médecin, PH	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	0,10
SIMON Stéphane	Technicien	Université Antilles-Guyane/CH Cayenne	0,05

Soit au total : 1,30 ETP

Biologistes :	PU-PH	0,10	ETP
	MCU-PH	0,30	ETP
	PH	0,10	ETP
Techniciens/Animalier :		0,75	ETP
Secrétariat :		0,05	ETP

Laboratoire Associé Pôle Sérologie (CHU/Université Louis Pasteur Strasbourg)  
Pr E. Candolfi, Responsable

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance	Temps consacré (ETP)
CANDOLFI Ermanno	PU-PH	ULP de Strasbourg	0,10
VILLARD Odile	MCU-PH	ULP de Strasbourg	0,20
FILISSETTI Denis	MCU-PH	ULP de Strasbourg	0,03
LANG Cécile	Ingénieur	ULP de Strasbourg	0,15
BACHMANN Michèle	Secrétaire	ULP de Strasbourg	0,15
LIENHARDT Elisabeth	Technicien	ULP de Strasbourg	0,20
HOFFMANN Estérina	Bibliothécaire	ULP de Strasbourg	0,10
Laboratoires Support			
CIMON Bernard	MCU-PA	Angers	0,10
PELLOUX Hervé /FRICKER HIDALGO Hélène	PU-PH/PH	Grenoble	0,10
FRANCK Jacqueline/ R.PIARROUX	MCU-PH/PU-PH	Marseille	0,10
POMARES Christelle	AHU	Nice	0,10
HOUZE Sandrine	PH	Paris-Bichat	0,10
PARIS Luc	PH	Paris-Pitié Salpêtrière	0,10
GODINEAU Nadine	PH	Paris-Saint-Denis	0,10

Soit au total : 1,60 ETP

Biologistes :	PU-PH	0,20	ETP
	MCU-PH/PA	0,35	ETP
	PH	0,35	ETP
	AHU	0,10	ETP
Ingénieur :		0,15	ETP
Techniciens :		0,20	ETP
Secrétariat :		0,25	ETP

Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire (CHU Montpellier)

Pr P. Bastien, Responsable

Nom Prénom	Fonctions	Appartenance	Temps consacré (ETP)
BASTIEN Patrick	PU-PH	CHRU Montpellier	0,10
STERKERS Yvon	MCU-PH	CHRU Montpellier	0,10
VARLET-MARIE Emmanuelle	Praticien-Attaché	CHRU Montpellier	0,20
Secrétaire	Secrétariat	CHRU Montpellier	0,03
Laboratoires supports			
DALLE Frédéric	PU-PH	CHU de Dijon	0,05
PACOT Anne LAMY / Agnés	Technicien	CHU de Dijon	0,10 total
PELLOUX Hervé	PU-PH	CHU de Grenoble	0,05
BRENIER-PINCHART Marie-Pierre	MCU-PH	CHU de Grenoble	0,05
Technicienne	Technicien	CHU de Grenoble	0,05
DELHAES Laurence	MCU-PH	CHRU de Lille	0,10
NAJI Filomena	Technicien	CHRU de Lille	0,10
VAUQUIER Michèle	Technicien	CHRU de Lille	0,10
YERA Hélène	MCU-PH	AP-HP Paris- Cochin	0,10
MENOTTI Jean	MCU-PH	AP-HP St-Louis	0,05
PAUTET Thierry	Technicien	AP-HP St-Louis	0,05
TOUAFEK Feriel	Praticien-Attaché	AP-HP Pitié-Salpêtrière	0,10
FILISSETTI Denis	MCU-PH	CHU de Strasbourg	0,05
Technicienne	Technicien	CHU de Strasbourg	0,05
CASSAING Sophie	MCU-PH	CHU de Toulouse	0,05
DUTHU E.. / GISQUET S. / BANS V.	Technicien	CHU de Toulouse	0,10 total
ROBERT-GANGNEUX Florence	MCU-PH	CHU de Rennes	0,10
Technicienne	Technicien		0,05

Soit au total : 1,73 ETP  
 Biologistes : PU-PH 0,20 ETP  
                   MCU-PH/PA 0,90 ETP  
 Techniciens : 0,60 ETP  
 Secrétariat : 0,03 ETP

### 1-5 Locaux et Equipements

#### **a) Description des locaux (Laboratoire Coordonnateur et Laboratoires Associés) :**

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)

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

- Locaux universitaires (locaux de recherche, surface : 220m<sup>2</sup>). Ces locaux regroupent des pièces de culture cellulaire, biologie moléculaire. (Réalisation des génotypages PCR RFLP, mise au point tests de chimiosensibilité)

- Locaux hospitaliers (800m<sup>2</sup> dont surface dédiée au CNR : 100 m<sup>2</sup>). 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.

Le tableau ci-dessous détaille ces pièces :

Secteur	N° pièce	Niveau	Surface	Fonction
Bureaux	27106	1	20 m <sup>2</sup>	Responsable CNR Toxoplasmose
	27105	1	10 m <sup>2</sup>	Praticien responsable Chimiosensibilité
	27103	1	13 m <sup>2</sup>	Praticien Pôle Epidémiologie
	26101	2	20 m <sup>2</sup>	Secrétariat CNR
Diagnostic moléculaire	26007	RdC	22 m <sup>2</sup>	Pièce technique Pré-amplification et mix
	27008	RdC	18 m <sup>2</sup>	Pièce technique Amplification et Post-amplification (PCR en temps réel)
Diagnostic Sérologique	26206	1	65 m <sup>2</sup>	Pièce technique (contrôles des sérologies et fabrication antigènes)
CRB Toxoplasma	26001	RdC	15 m <sup>2</sup>	Zone de cultures cellulaires, isolement, entretien et multiplication souches, Tests de Chimiosensibilité
	26002	RdC	15 m <sup>2</sup>	Zone de stockage cryotubes
Animalerie	27001	RdC	42 m <sup>2</sup>	Inoculation prélèvements pathologiques, recueil souches, production antigènes

Laboratoire Associé Pôle Souches : (CHU Limoges)

Adresse : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Dupuytren, CHU de 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 m<sup>2</sup> 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.

Le tableau ci-dessous détaille ces pièces :

Secteur	Niveau	Surface	Fonction
CNR/CRB Toxoplasma	ss CHU	10 m <sup>2</sup>	Enregistrement dans logiciel spécifique de gestion de banque
Bureaux	ss CHU	15 m <sup>2</sup>	Responsable Pôle Souches
	ss CHU	9 m <sup>2</sup>	Responsable génotypage
	ss CHU	12 m <sup>2</sup>	Réception, secrétariat
Laboratoires CHU	ss CHU	10 m <sup>2</sup>	Traitement des souches
	ss CHU	12 m <sup>2</sup>	Stockage azote
	ss CHU	12 m <sup>2</sup>	Séquenceur
Laboratoire Faculté	4ème	3x12 m <sup>2</sup>	Génotypage

La partie chimiosensibilité des souches est réalisée dans les locaux du Laboratoire Coordonnateur (CHU de Reims).

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

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

Le Laboratoire a intégré le plateau technique de microbiologie (PTM) inauguré en octobre 2010. L'organisation du PTM a permis une mutualisation du personnel non médical et des équipements pour la réalisation des analyses. La réalisation des analyses est dévolue aux UF-STAP (Secteurs Techniques d'Activités Partagées) prestataires de service des disciplines et disposant des moyens techniques et des effectifs pour en garantir la qualité.

Pour le STAP Sérologie: La mutualisation des compétences techniques (15 ETP techniciens) et des équipements (9 automates : Liaison, Architect i 1000 et i 2000, BEP 2000 et BEP 3, Evolis, Mini Vidas, AxSym, Etimax).

Le STAP Biologie moléculaire (16 ETP) est dédié à la détection, la quantification et au séquençage du génome de pathogènes humains par technique de PCR. Il dispose de 16 appareils de PCR dont 8 en temps réel et d'un séquenceur 4 capillaires.

Le laboratoire dispose aussi d'une animalerie agréée et d'un laboratoire de cultures cellulaires.



Le tableau ci-dessous détaille ces pièces :

Secteur	N°pièce	Niveau	Surface m <sup>2</sup>	Fonction
Pré et post analytique	1 à 10	RDC	200	Préanalytique et post analytique
Sérologie 400 m <sup>2</sup>	15	RDC	12	Validation biologique
	12	RDC	40	Centrifugation aliquotage
	14	RDC	110	Sérologie automatisée
	18 à 21	RDC	90	Sérologie automatisée (IF, WB, Agglu, ELISA..)
	30 à 32	RDC	85	Chambres froides réactifs et échantillons
	27 et 33	RDC	115	Stockage et gestion sérums et souches
Bio Mol 700 m <sup>2</sup>	214 à 218	2	60	Bureaux validation
	209	2	27	Séquençage
	210-211	2	12	PCR nichée
	220 à 222	2	36	Salles de mix
	223-226	2	75	Salles d'extraction
	227-228	2	16	Salle de mise en réaction
	229	2	23	PCR automatisée
	205	2	27	Thermocycleurs
	207	2	24	Révélation
	230	2	12	Biothèque

Laboratoire Associé du Pôle Biologie Moléculaire: (CHU Montpellier)

Adresse : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Montpellier, 39 Avenue Charles Flahault (site Antonin Balmès), 34295 Montpellier Cedex 5, France.

Le Laboratoire est installé sur une surface totale de 1300 m<sup>2</sup> utiles, répartie sur deux étages, et divisée pour trois-quarts en locaux hospitaliers et pour un-quart en locaux universitaires de recherche. Les locaux sont entièrement neufs (déménagement en juillet 2009), modernes et hautement fonctionnels. Il bénéficie d'une implantation au cœur du CHRU de Montpellier, et donc, des moyens logistiques (infrastructures, déchets, nettoyage, fournitures de fluides) apportés par son appartenance au CHRU.

Dans le domaine particulier des activités du CNR, le laboratoire possède les locaux et équipements en adéquation avec les missions proposées.

Le secteur de diagnostic moléculaire proprement dit (C.H.U.) occupe environ 70 m<sup>2</sup>.

L'équipe de recherche CNRS-Université Montpellier 1 "Biologie moléculaire des Protozoaires parasites" occupe environ 330 m<sup>2</sup>.

Le tableau ci-dessous détaille ces pièces.

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

Les locaux spécifiques au diagnostic moléculaire :

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 box) en surpression, dédiées à la phase pré-amplification, une salle en dépression dédiée à la post-amplification, et un bureau.

Les locaux sont conformes au GBEA et aux recommandations classiques pour cette activité, et même davantage. Des mesures très strictes de confinement et de séparation y sont imposées : organisation en trois locaux géographiquement séparés (préparation des ADN, préparation des mélanges réactionnels, étape post-amplification) avec sas d'entrée ; surpression dans les pièces pré-amplification et dépression dans les pièces post-amplification ; respect du sens du flux ; personnel autorisé ; séparation complète des matériels, blouses, consommables et réactifs ; sur-blouses, sur-chaussures ; autres mesures classiques de prévention des contaminations. De plus, ce plateau de biologie moléculaire bénéficie de deux aires distinctes dédiées à la pré-amplification : l'une réservée à la routine, l'autre au développement (en particulier les activités du CNR).

#### ***b) Description des équipements :***

Le CNR dispose des équipements nécessaires pour les études sérologiques : automates de sérologie diversifiés couvrant le panel des techniques actuellement sur le marché et techniques manuelles, et pour les études en biologie moléculaire : PCR temps réel et PCR conventionnelle couvrant le panel des techniques actuellement sur le marché. 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 des Pôles Epidémiologie et Souches disposent de hottes PSM et d'animaleries agréées (zone A2) pour le recueil et l'entretien des souches et de cryoconservateurs à azote liquide sécurisés pour leur stockage (cryoconservateurs sous alarme de température), de séquenceurs pour le génotypage. Ils ont développé un logiciel spécifique à la gestion des souches incluses dans le CRB Toxoplasma avec traçabilité complète des échantillons et des événements. Ils participent à l'élaboration, pilotée par l'Institut Pasteur, d'un logiciel commun à l'ensemble des CRB micro-organismes suite à un appel d'offres IBSA.

Les Laboratoires Associés Pôle Sérologie et Biologie Moléculaire disposent également de hottes PSM et d'animaleries agréées. Certains laboratoires membres du réseau du CNR disposent également d'animalerie, cependant leur nombre tend à diminuer à cause du coût des animaleries et des performances du diagnostic par Biologie Moléculaire.

Les Laboratoires Coordonnateur et Associés seront probablement à l'avenir des centres référents pour l'inoculation à la souris, seule méthode permettant l'isolement de souches de toxoplasmes. Le nombre d'animalerie agréées en France étant en diminution, un certain nombre de laboratoires membres du CNR envoient leurs prélèvements positifs en Biologie Moléculaire vers ces laboratoires pour inoculation à la souris permettant la récupération des souches et leur intégration au CRB.

#### Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire :

Le laboratoire possède un plateau technique performant, comportant

- 1 thermocycleur en temps réel Roche® ; deux thermocycleurs classiques;
- 1 automate d'extraction d'ADN Roche®
- une unité de culture (niveau P2), et une enceinte confinée de niveau P3, équipée respectivement de 3 et 2 postes de sécurité microbiologiques;
- quatre appareils d'électrophorèse en champ pulsé ;
- de nombreux équipements courants : cuves et générateurs pour électrophorèse, station de prises de vues numériques avec analyseur d'images, centrifugeuses, étuves à CO<sub>2</sub>, microscopes, balances, bains secs, bain-marie, pH-mètres, fours à hybridation, congélateurs (- 20°C et - 80°C), containers de cryo -conservation, chambre noire...

Laboratoire Associé Pôle Sérologie : voir descriptif avec locaux

#### 1-6 Démarche qualité des laboratoires du CNR:

La certification selon la norme CRB NF S96900 obtenue en janvier 2010 pour le CRB Toxoplasma associé au CNR (laboratoire Coordonnateur , Reims et laboratoire associé Pôle Souches, Limoges) a été maintenue lors d'audit de suivi en 2011.

Le Dr Foudrinier (PH, laboratoire coordonnateur Reims) est 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 IBSA. Etant donné l'intrication étroite entre les activités de CRB Toxoplasma et du Pôle Souches du CNR Toxoplasme, cette démarche qualité du CRB retient sur le niveau de qualité du CNR.

#### Laboratoire Coordonnateur CNR : (CHU Reims)

Un PH (Dr Foudrinier) est Responsable Qualité, elle est titulaire d'un DU de Qualité (Marseille, diplôme 2007). Ce PH assure la qualité des procédures instaurées dans le laboratoire qui a déjà bénéficié de 5 audits internes qualité (dont certains réalisés par des auditeurs externes à la structure du CHU). Deux techniciennes ont suivi une formation à l'audit et procèdent à des audits internes des différents secteurs diagnostic. Le calendrier proposé pour l'accréditation du laboratoire selon la norme ISO 1589 est intégré au calendrier plus général du Pôle de Biologie du CHU de Reims.

La procédure de validation des méthodes appliquée au Pôle de Biologie prend en compte les préconisations du guide de validation des méthodes en biologie médicale, notamment i) pour la portée flexible standard : documentation bibliographique concernant la sensibilité et la

spécificité et mise en oeuvre de tests de fidélité (répétabilité et reproductibilité) ; ii) pour la portée flexible étendue : en plus de la documentation bibliographique, mise en oeuvre de tests de validation de la sensibilité, de la spécificité, de fidélité (répétabilité et reproductibilité), étude de l'influence et maîtrise des paramètres critiques, ainsi qu'approche de la justesse par exploitation des évaluations externes de la qualité s'il y a lieu. L'ensemble de ces procédures est en cours d'application.

Ainsi 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 (rythme annuel) : contrôle européen (QCMD) pour le diagnostic de la toxoplasmose par biologie moléculaire.
- Une validation interne des méthodes est en cours selon les recommandations publiées dans le guide de validation en biologie médicale du COFRAC pour les analyses de la Toxoplasmose (Vidas G, M, avidité et Agglutination – ADHS ICM-ICA). Une validation de méthodes pour ces analyses a été effectuée au cours d'un stage de Master 2 Professionnel ISQB (Instrumentation Scientifique et Qualité dans les Bio-industries). Elle sera étendue aux analyses en Biologie Moléculaire.
- Un contrôle de qualité interne commercial journalier pour les techniques ELISA (Vidas G)
- Un contrôle de qualité interne pour l'ADHS et deux contrôles de qualité internes pour ICM-ICA .

Par ailleurs, le Laboratoire est déjà agréé pour le diagnostic anténatal de la toxoplasmose et dispose d'une animalerie agréée par les Services Vétérinaires.

#### Laboratoire Associé Pôle Souches :

Le Laboratoire du Pôle Souches est engagé dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 1589 pour la biologie médicale. Le calendrier prévisionnel de la démarche d'accréditation inclut l'accréditation du Pôle Souches du CNR. Elle devra être facilitée par la certification selon le référentiel AFNOR NF 96-900 obtenu en 2010 pour le CRB *Toxoplasma* accolé au Pôle Souches.

Par ailleurs, le Laboratoire est déjà agréé pour le diagnostic anténatal de la toxoplasmose et dispose d'une animalerie agréée par les Services Vétérinaires.

#### Laboratoire Associé Pôle Sérologie:

Le Pôle de biologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg regroupe l'ensemble des laboratoires de biologie médicale (14 laboratoires).

Pour assurer sa démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189, conformément aux obligations faites aux laboratoires d'analyses, le Pôle de biologie dispose d'un groupe de travail associant tous les biologistes responsables de la qualité et les cadres de santé. Ce Groupe Qualité du Pôle de Biologie est dirigé par un biologiste. Il est assisté de 2 ingénieurs qualité constituant le bureau de ce groupe.

Le Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale associé à la Bactériologie, l'Hygiène Hospitalière et la Virologie forment le Plateau Technique de Microbiologie. Au sein de cette structure, le groupe de travail qualité est constitué des responsables qualité de chaque composante, des cadres de santé et de 2 techniciens qualifiés en qualité.

Le Laboratoire de parasitologie et de mycologie médicale est engagé dans une démarche d'accréditation pour ses pratiques analytiques. Le « diagnostic biologique de la toxoplasmose » est une portée d'accréditation privilégiée avec mise en place de groupes de pilotage pré et post analytique, analytique, hygiène /sécurité, informatique, métrologie, commandes et ressources humaines. Les phases pré et post analytiques sont finalisées.

Les trois biologistes de sérologie assistés des techniciens ont initié la démarche qualité qui a conduit à mettre en place :

- Un système de signalement des non conformités et réclamations avec suivi des actions menées en vue d'améliorer le fonctionnement du laboratoire et de répondre aux attentes des clients.
- es contrôles de qualité externe qui s'ajoutent à celui de l'AFSSAPS (une fois par an en moyenne) : i) UK National External Quality Assessment Service For Microbiology (London) (3 fois par an) et ii) Centre Toulousain pour le Contrôle de la qualité en Biologie (CTCB) (3 fois par an)
- Une validation des méthodes, pour chaque analyse employée au sein du laboratoire, selon les recommandations publiées dans le guide de validation en biologie médicale du COFRAC.
- Un contrôle de qualité interne commercial journalier pour les techniques ELISA, immunofluorescence et ELISA IgG avidité.
- Un suivi de la mise en place de ces pratiques est effectué par le biais d'audits internes et externes réguliers.

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

#### Laboratoire Associé Pôle Biologie moléculaire

Le LPM du CHU de Montpellier 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. L'ensemble du personnel du Laboratoire est sensibilisé et travaille à la démarche Qualité à son niveau et dans son domaine. Des réunions ont lieu sur un rythme mensuel à bimestriel selon la catégorie de personnel concernée. Un "diagnostic Qualité" effectué en mars 2011 s'est révélé très positif pour l'ensemble de la Démarche.

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. Il organise lui-même le CQE national dans ce domaine, auquel il participe de façon objective et anonymisée.

Le LPM est globalement engagé dans une démarche d'accréditation (au mieux à l'horizon 2016).

Par ailleurs, le Laboratoire-Support de Toulouse a reçu l'Accréditation COFRAC (norme ISO 1589) depuis Septembre 2006 (numéro 1-1769), pour :

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

Ce laboratoire membre du CNR (Laboratoire Support dans deux Pôles) a mis en 2011, par l'intermédiaire de son RAQ (Dr C. Roques), à disposition ses procédures et référentiels qualité et piloter un groupe de travail comprenant des membres des Laboratoires Coordonnateur et Associés ainsi que des membres du réseau du CNR. Cette disposition permettra une avancée plus rapide de la démarche d'accréditation obligatoire des laboratoires de biologie médicale.

## 2/ ACTIVITES D'EXPERTISE

### 2-1 Capacités techniques du CNR

#### **a) Liste des techniques de référence et recommandées par le CNR: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux**

##### Techniques de typage :

Les techniques de typage des souches ou ADN parasites par des techniques de biologie moléculaire reposent sur une PCR multiplex 15 marqueurs microsatellites (MS). Des techniques de PCR-RFLP (3 marqueurs) et de séquençage peuvent être rajoutées pour certaines souches atypiques. La technique PCR multiplex permettant d'amplifier lors d'une seule PCR les 15 marqueurs microsatellites a été développée en 2010 et validée par publication en 2010 (Ajzenberg et al. JCM, 2010). Elle a fait l'objet en 2011 d'une comparaison avec les résultats des techniques de PCR-RFLP (11 marqueurs) et de séquençage utilisées par d'autres équipes (Khan et al., PNAS, sous presse). Cette comparaison a montré le plus grand pouvoir discriminant des microsatellites, bien adapté aux études épidémiologiques.

Le seuil de sensibilité de cette technique sur les ADN extraits de produits pathologiques a été évalué par PCR quantitative à un ct inférieur à 33 cycles.

##### Technique d'évaluation de la sensibilité aux anti-toxoplasmiques :

L'évaluation de la chimiosensibilité des souches de *T. gondii* permet d'estimer la résistance des souches de *T. gondii* vis-à-vis de la sulfadiazine (SDZ), basée sur l'évaluation optique des foyers de parasite et d'un dosage immuno-enzymatique en fonction de concentrations croissantes de SDZ.

En 2008, une étude menée en collaboration entre les équipes rémoises et parisiennes (Meneceur et al, 2008), a permis de mettre en évidence la résistance de certaines souches de toxoplasme, par des CI50 (Concentrations Inhibitrices) élevées à la SDZ. En effet sur 16 souches étudiées, 13 présentaient des CI50 comprises entre 3 et 18,9 mg/L, considérées ainsi comme sensibles, alors que 3 souches, dites résistantes, présentaient des CI50 supérieures à 50 mg/L. Ces données intéressantes nécessitent le développement d'une méthode de mesure de la chimiosensibilité, permettant de cribler l'ensemble des souches, conservées au CRB Toxoplasma, la méthode d'évaluation de la chimiosensibilité effectuée par le Pr. Derouin utilisant des cellules fibroblastiques MRC-5, ayant une croissance cellulaire limitée à une quinzaine de jours.

Notre laboratoire a donc transposé la méthode existante sur MRC-5 (cellules de culture primaire), en utilisant des cellules Vero (lignée cellulaire) se révélant ainsi comme un support de choix pour une standardisation (reproductibilité facile). Cette transposition de méthode est actuellement en cours d'évaluation. Pour valider notre technique, nous avons, dans un premier temps, établi la CI50 à la SDZ, pour des souches de *T. gondii* décrite dans la méthode du Pr Derouin (Meneceur et al, 2008).

##### Techniques pour le diagnostic sérologique (pratique du diagnostic et interprétation des résultats) :

- Une liste des techniques de diagnostic sérologique de la toxoplasmose ainsi que des responsables au sein des laboratoires experts CNR a été élaborée et est disponible sur le site internet du CNR.

- Le Laboratoire Associé et les Laboratoires Supports 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 ». Toutes les techniques utilisant des méthodes ELISA sont disponibles au sein du Laboratoire Associé et des Laboratoires 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-blot) et ont la capacité d'avoir recours au dye-test (laboratoire des CHU de Marseille et Limoges).

- Une biothèque permettant de réaliser les évaluations des réactifs utilisés dans le diagnostic sérologique de la toxoplasmose est constituée par l'ensemble des membres du réseau et centralisée au laboratoire de Parasitologie du CHU de Strasbourg. La constitution de la biothèque conformément aux critères déterminés en 2006 (voir rapport 2007) a été achevée avec caractérisation et aliquotage de tous les sérums en 3 panels distincts selon les critères ci-dessous :

- Panel 1 : permettant l'estimation de la sensibilité et de la spécificité des IgG et des IgM constitué de sérums négatifs pour les IgG et les IgM, de sérums positifs en IgG (entre 10 et > 250 UI/mL) et négatifs en IgM et enfin de sérums positifs pour les 2 isotypes. L'ensemble de ces sérums provient d'une population globale issue de donneurs de sang aux ETS de Strasbourg.

- Panel 2 : destiné à analyser la détectabilité et la spécificité des techniques comportant « taux limite » présentant des IgG proches du seuil de positivité par l'une des techniques employées et des IgG positives ou négatives par une autre technique et des sérums négatifs en IgG et IgM toxoplasmiques et « d'autres pathologies » virales, bactériennes et d'immunitaires, pathologies potentiellement interférentes. toxoplasmique par les techniques de référence et source de résultats faussement positifs.

- Panel 3 : destiné à évaluer les techniques de diagnostic précoce avec datation d'une séroconversion toxoplasmique qui comporte d'une part, des sérums issus de dossiers de séroconversions toxoplasmiques (chaque dossier comportant deux ou trois sérums dont le premier sérum (négatif). Ces dossiers permettront d'étudier la capacité de détection précoce des IgG et des IgM toxoplasmiques dans l'évaluation d'une technique de datation et d'autre part, des sérums de toxoplasmoses chroniques caractérisés par la présence d'IgG positives et/ou des IgM positives avec un sérum ayant une antériorité positive de un an. Cette étude permettra d'évaluer la sensibilité de détection des IgM toxoplasmiques et de l'avidité des IgG toxoplasmiques.

La déclaration de la biothèque auprès du CPP a été effectuée auprès des services compétents des HUS (Direction de la Recherche Clinique).

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 d'activité du CNR (2010). D'autres résultats sont en cours (voir partie Expertise du Pôle Sérologie). Lorsque l'évaluation des réactifs pour le diagnostic sérologique sera terminée, le Pôle Sérologie communiquera à l'ensemble des membres du CNR les résultats et une communication sera faite à l'ensemble des professionnels de santé (Laboratoires d'analyses de biologie médicale).

Un guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques et conduite à tenir a été validé par le groupe de travail du Pôle Sérologie et les membres du réseau permettant une harmonisation des pratiques, il a été publié en 2011 (Feuillets de Biologie, 2011,208, 43-49) et mis en ligne sur le site Internet du CNR en 2011.

Techniques pour le diagnostic par biologie moléculaire (pratique du diagnostic et interprétation des résultats) :

- Une liste des techniques de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose ainsi que des responsables au sein des laboratoires experts CNR a été élaborée et est disponible sur le site internet du CNR.

- Le Laboratoire Associé et les Laboratoires Supports correspondant au Pôle Biologie Moléculaire disposent de techniques « maison » ou spécifiquement développées au sein des laboratoires membres du réseau du CNR. L'accès à ces techniques est plus restreint dans le cadre du diagnostic moléculaire 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.

- Le Pôle "Biologie Moléculaire" dispose 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).

Par ailleurs, tous les Laboratoires de ce Pôle font preuve d'une expertise dans le domaine du diagnostic moléculaire de la Toxoplasmose. Tous maîtrisent la PCR en temps réel, qu'ils pratiquent en routine dans leur activité hospitalière, sous forme de techniques "maison" ou spécifiquement développées au sein des laboratoires.

L'organisation en réseau de ce Pôle permet l'accès à une panoplie de techniques importante et essentielle pour les études comparatives : deux types de cibles ADN, cinq paires d'amorces, cinq types de thermocycleurs, trois types d'extracteurs automatisés, sondes FRET et TaqMan,...

- Le Laboratoire Associé a développé le Contrôle National de Qualité en biologie moléculaire pour le diagnostic de cette affection. L'ensemble des laboratoires membres du réseau participe à ce contrôle qui a lieu annuellement, leur permettant une évaluation de leur pratique diagnostique. En 2010, une extension des compétences de ce Pôle lui a permis de collaborer au QCMD (contrôle de qualité européen), en fournissant notamment les matrices à évaluer (sang total et liquides amniotiques) et le matériel infectieux (souche de toxoplasme en quantité connue).

- Le Laboratoire Associé a fabriqué une gamme étalon qu'il peut distribuer aux laboratoires membres du réseau ; leur permettant de s'étalonner pour la détermination de la charge parasitaire présente dans un échantillon (PCR quantitative).

- La recommandation de pratiques et de techniques/méthodes de diagnostic moléculaire fait partie des objectifs de ce Pôle. Ainsi, des recommandations relatives au diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale ont été rédigées en 2011 par le Pôle Biologie Moléculaire, validées par l'ensemble des membres du réseau et mises sur le site internet du CNR en 2011. Des recommandations pratiques sur les techniques à mettre en oeuvre pour l'étude du placenta entrant dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale ont été rédigées en 2011 et adressées à l'ensemble des membres du réseau.

Néanmoins, le nombre et la complexité des techniques utilisées (toutes "artisanales") impliquent soit des études comparatives poussées soit des conférences de consensus a minima avant de pouvoir parvenir à des recommandations dans le domaine (voir Partie Expertise et Activités de formation/liste des guides)



**b) Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles**

15 marqueurs microsatellites (site de Limoges – Ajzenberg et al. JCM 2010) : voir Tableau 1.

Marqueur MS	Chromosome	Motif répété	taille, bp
TUB2	IX	[TG/AC] <sub>n</sub>	287-291
W35	II	[TC/AG] <sub>n</sub> [TG/AC] <sub>n</sub>	242-248
TgM-A	X	[TG/AC] <sub>n</sub>	203-211
B18	VIIa	[TG/AC] <sub>n</sub>	156-170
B17	XII	[TC/AG] <sub>n</sub>	334-366
M33	IV	[TC/AG] <sub>n</sub>	165-173
IV.1	IV	[TG/AC] <sub>n</sub>	272-282
XI.1	XI	[TG/AC] <sub>n</sub>	354-362
M48	Ia	[TA/AT] <sub>n</sub>	209-243
M102	VIIa	[TA/AT] <sub>n</sub>	164-196
N60	Ib	[TA/AT] <sub>n</sub>	132-157
N82	XII	[TA/AT] <sub>n</sub>	105-145
AA	VIII	[TA/AT] <sub>n</sub>	251-332
N61	VIIb	[TA/AT] <sub>n</sub>	79-123
N83	X	[TA/AT] <sub>n</sub>	306-338

Tableau 1 : Liste des marqueurs microsatellites utilisés au CNR Toxoplasmose pour le génotypage des souches et extraits ADN.

**c) Collections de matériels biologiques : souches, antigènes ou immun-sérums de référence,...**

1- Collection de souches :

- Description : nombre de souches, caractérisation

	Souches	ADN	TOTAL
2011	85	122	207
2010	106	82	188
2009	108	81	189
2002-2008	464	322	786
<b>TOTAL</b>	763	607	1370

Tableau 2 : Nombre de souches et d'ADN toxoplasmiques adressés au CNR.

Le génotypage a été possible pour 1045 des 1370 prélèvements (76,3%), soit 52,9% (321/607) des extraits ADN provenant de produits pathologiques et 95,4% (728/763) des souches isolées sur souris.

A cette collection appuyée sur l'activité du CNR, s'ajoute une collection de souches d'origine animale provenant de l'activité de recherche qui contient actuellement 232 souches provenant de la faune domestique mais également de la faune sauvage.

- 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 du biologiste responsable de l'isolement, sont destinées à être disponibles pour des projets scientifiques. Elles sont intégrées à la structure Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma. Depuis 2011, des critères quantitatifs d'intégration au CRB (au minimum 40 kystes toxoplasmiques des cerveaux de souris) ont été ajoutés. Le site Internet du CRB avec catalogue (<http://www.toxocrb.com>) expose 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. Le CRB Toxoplasma a été certifié en 2010 selon la norme NF 96-900S. L'audit de surveillance réalisé en 2011 a maintenu cette certification.

### 2- Antigènes :

Le Laboratoire Coordonnateur procède à la fabrication d'antigènes solubles et figurés de *T. gondii* issus de la souche RH. Ces antigènes sont produits par inoculation intra péritonéale à des souris de la souche RH, recueil de l'ascite produite, traitement des toxoplasmes par trypsination et formol avant validation technique pour l'antigène figuré. Pour l'antigène soluble, l'étape de recueil des tachyzoïtes est suivie par une trypsination puis des cycles de congélation/décongélation avant validation.

Ces antigènes peuvent être mis à la disposition des membres du CNR désireux de tester des sérums par techniques d'agglutination (ADHS, agglutination directe de haute sensibilité) de même principe que le test commercialisé par Biomérieux (Toxoscreen®). Plus largement, ces antigènes peuvent être fournis à divers laboratoires de recherche pour des études épidémiologiques. Dans ce cadre, le laboratoire coordonnateur étant associé au Laboratoire National de référence en santé animale (P. Boireau, Maisons Alfort) sous la forme d'une unité sous contrat ANSES (USC Epitoxo) depuis 2010, à ce titre il fournit des antigènes pour les enquêtes épidémiologiques menées sur les diverses espèces animales, hôtes intermédiaires de *T. gondii*. Il est également amené à collaborer pour le diagnostic de la toxoplasmose chez diverses espèces animales sur demande du LNR ou de LVD.

### 3- Sérums et matériel biologique de référence :

#### Laboratoire Associé du Pôle Sérologie

Ce Laboratoire contribue à la constitution d'une sérothèque destinée à l'expertise de réactifs. Cette sérothèque est alimentée par l'ensemble des membres du réseau du CNR Toxoplasmose (description plus haut).

#### Laboratoire Associé du Pôle Biologie Moléculaire

Ce Laboratoire procède à la fabrication et distribution de matériel biologique dit "étalon" (ADN, témoins positifs, gammes, échantillons artificiels) destiné à être envoyé (i) en priorité aux membres du groupe de travail en vue de l'évaluation et de la standardisation du diagnostic moléculaire; (ii) dans un second temps aux membres du réseau du CNR avec le même objectif; (iii) dans le futur ce matériel pourra être fourni aux biologistes désireux d'améliorer ou de mettre en place ce diagnostic moléculaire

Le Laboratoire Associé a développé le Contrôle National de Qualité en biologie moléculaire pour le diagnostic de cette affection. Ce CNQ est distribué à l'ensemble des laboratoires membres du CNR annuellement, leur permettant une évaluation de leur pratique diagnostique. Depuis 2010, une extension des compétences de ce Pôle lui a permis de collaborer au QCMD (contrôle de qualité européen), et de fournir les matrices à évaluer (sang total et liquides amniotiques) et le matériel infectieux (souches de toxoplasme en quantité connue et de géotypes différents).

## 2-2 Activités d'expertise de l'année 2011

### 2-2-1 Expertise apportée par le Pôle Souches

**a) 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 réalisé (typage phénotypique, géotypique ...)**

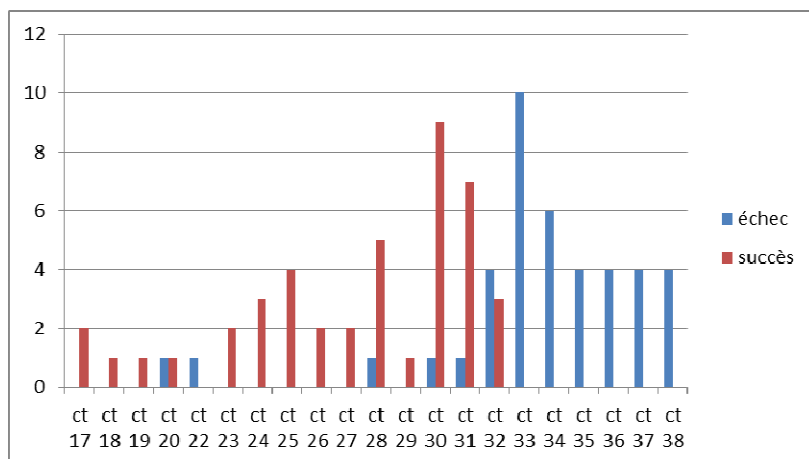
Nature de prélèvements	Géotypage direct sur ADN 2011			Géotypage souches 2011		
	succès	échec	total direct	succès	échec	total souches
Sang / Moelle osseuse	17	13	30	5	0	5
LCR	9	9	18	0	0	0
Cerveau/Moelle épinière	5	1	6	1	0	1
Poumons/LBA	4	3	7	2	0	2
Humeur aqueuse/Vitré	8	13	21	0	1	1
placenta	4	8	12	41	3	44
sang du cordon	0	0	0	5	0	5
tissus fœtaux	2	1	3	0	0	0
Liquide amniotique	15	9	24	25	2	27
Divers	1	0	1	0	0	0
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>57</b>	<b>122</b>	<b>79</b>	<b>6</b>	<b>85</b>

Tableau 3 : Prélèvements reçus au CNR Toxoplasmose en 2011 et succès du géotypage.

Sur les 207 prélèvements reçus en 2011, le géotypage a été possible dans 53% des cas (65/122) pour les extraits d'ADN provenant de produits pathologiques et dans 93% des cas (79/85) pour les souches isolées sur souris.

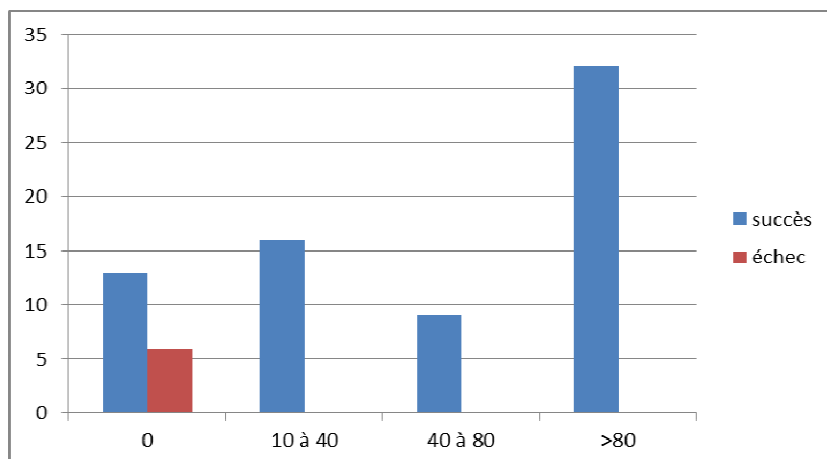
Pour les extraits ADN, les échecs de géotypage correspondent à des produits pathologiques très pauvres en toxoplasmes (correspondant en PCR quantitative à des ct >32). Avec un seuil de ct à 32, le taux de réussite est de 88,7%. Ceci nous a conduit à proposer en 2011 à nos correspondants de n'adresser au CNR que les extraits ADN ayant été amplifiés en PCR avec un ct inférieur à 33.

Figure 1 : Taux de réussite du géotypage direct sur des extraits ADN provenant de produits pathologiques en fonction des ct observés en PCR quantitative (n=84).



Pour les souches, un bilan de la richesse des cerveaux de souris en nombre de kystes a été réalisé en 2011. Il a permis de mettre en évidence que les 6 échecs étaient observés pour des cerveaux de souris dans lesquels l'observation microscopique n'a pas permis de mettre en évidence de kystes de toxoplasmes. Le génotypage a cependant été possible dans 13 cas sur 19.

Figure 2 : Taux de réussite du génotypage des souches en fonction de la richesse en kystes de toxoplasme du cerveau de souris.



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

Actuellement, nous évaluons la chimiosensibilité à la sulfadiazine sur toutes les souches multipliées au CRB Toxoplasma ce qui nous permettra d'effectuer des études statistiques du nouveau modèle développé.

Les résultats préliminaires sont reportés dans le tableau 4 :

La valeur des souches classées intermédiaires est en cours d'évaluation, notamment avec l'exploitation statistique d'un plus grand nombre de résultats d'IC50.

CRB code	Sensibilité (µg/mL)	Conclusion
RH	<50	Sensible
TgA 103001	>1000	Résistant
TgA 00001	<50	Sensible
TgH 00006	489,8	Intermédiaire
TgH 32005A	244,7	Intermédiaire
TgH 42001A	34,8	Sensible
TgH 32006A	>1000	Résistant
TgA 32132	<25	Sensible
TgH 00008	<50	Sensible
TgH 32114A	Faible croissance chimiosensibilité à refaire car peu de foyers en témoin. Modification du ratio de départ	
TgA 00009		
TgH 39027A		
TgA 00008		
TgA 00007		
TgH 24011A		
TgH 37003A	242,8	Intermédiaire
TgA 32134	44,2	Sensible
TgA 32139	82,7	Sensible
TgH 18021A	ct faible 1-2 foyers / champs	
TgA 32133	120	Intermédiaire
TgA 18005	224,4	Intermédiaire
TgH 22017B	≈25	Sensible
TgH 32118A	ct faible 1-2 foyers / champs	

Tableau 4 : Tests de chimiosensibilité sur les souches adressées au CNR.

Nous avons aussi répondu en 2011 à une demande du CHU de Saint-Etienne pour une évaluation de la sensibilité d'une souche (STE- 003 PHI) isolée d'un patient décédé avec suspicion d'échec thérapeutique, une sensibilité intermédiaire a été retrouvée.

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

En 2011, sept souches du CRB provenant des collectes dans le cadre du CNR ont été distribuées :

- 4 pour des activités de recherche (TgH18021, TgH 18007, TgH18009, TgH 18028),
- 3 pour la mise au point du contrôle de qualité national en PCR toxoplasmose (TgH 25040, TgH 25032, TgH 25025).

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

Le nombre de prélèvements adressés au CNR pour génotypage en 2011 a augmenté de 9,2% par rapport à 2010. Cette augmentation concerne uniquement les extraits ADN (+32,8%) alors que le nombre de souches est en régression (-19.8%). La baisse du nombre de souches reflète la diminution des capacités d'inoculation aux souris au sein des CHU et la tendance à considérer que la PCR peut remplacer cette inoculation pour la majorité des indications.

## 2-2-2 Expertise apportée par le Pôle Sérologie

Le groupe de travail a terminé l'évaluation des coffrets des IgG et IgM sur un panel de tout-venant (dit 1bis) composé de 199 sérums négatifs, 169 sérums IgG+ et IgM- et 47 sérums IgG et IgM+ soit au total : 415 sérums sur des trousse ELISA, ELFA ou CLIA sur divers automates : Evolis<sup>®</sup> (BioRad), Liaison<sup>®</sup> (DiaSorin), Access<sup>®</sup> (Siemens), Centaur<sup>®</sup> (Bayer), Cobas<sup>®</sup> (Roche) et Architect<sup>®</sup> (Abbott).

Les résultats préliminaires et confidentiels sont résumés sous forme de tableaux et figures ci-jointes (annexes Pôle Sérologie 1,2,3). Nous avons rajouté les résultats obtenus avec les réactifs sur les automates AxSym<sup>®</sup> (Abbott), Vidia<sup>®</sup> et Vidas<sup>®</sup> (BioMérieux) expertisés sur le précédent panel 1.

La constitution de nouveaux panels se poursuit et permettra d'évaluer les prochains réactifs (panel 1bis complet, panels 2 bis et 3 bis à compléter par le réseau).

Une enquête sur les séroconversions toxoplasmiques sans IgM ou avec des IgM fugaces a été lancée au sein du réseau du CNR afin d'évaluer la fréquence de ces dossiers et de les regrouper en vue d'une publication.

Les résultats de notre évaluation sur les réactifs d'agglutination sont sous presse dans DMID (publication 2012).

L'article sur l'expertise des coffrets d'avidité est soumis au Journal of Clinical Microbiology.

Les conduites à tenir face à des situations cliniques ou techniques particulières ont été validés (voir annexe Pôle Sérologie 4-5) :

- Conduite à tenir et interprétation des résultats biologiques à la recherche d'une toxoplasmose congénitale
- Conduite à tenir et interprétation des résultats biologiques lors d'une suspicion d'une toxoplasmose oculaire à l'examen du fond d'oeil
- Conduite à tenir et interprétation des résultats biologiques chez un sujet immunodéprimé
- Conduite à tenir face à une discordance pour une même technique sur deux sérums différents pour un même patient (en dehors d'une grossesse ou immunodépression)
- Conduite à tenir face à une discordance entre 2 techniques sur un même isotype sur un même sérum

## 2-2-3 Expertise apportée par le Pôle Biologie Moléculaire

### 1. Expertise en matière de 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 d'une part de définir des seuils minimum de sensibilité à atteindre, et d'autre part, de dégager des méthodes à recommander au niveau national. En-dehors des méthodes d'extraction d'ADN (qui sont aujourd'hui quasiment partout commerciales), il existe très peu de méthodes de PCR-Toxoplasmose commercialisées (trousses). De plus, la plupart de ces trousse apparaissent en retard sur un plan technologique par rapport aux méthodes développées dans les CHU. Les méthodes de PCR sont donc actuellement "artisanales" ("in-house") dans tous les centres de diagnostic en France, ce qui entraîne nécessairement des variations d'efficacité, et peut-être de performances. Ces différences apparaissent surtout dans de faibles concentrations de toxoplasmes (< 10 parasites par 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) Distribution 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 atteint avec la mise à disposition d'échantillons lyophilisés, mimant les échantillons cliniques et élaborés à diverses concentrations de Toxoplasmes.

Des échantillons à diverses concentrations (10 à 10<sup>5</sup> toxoplasmes/mL) ont été fournies en vue d'une auto-évaluation par les laboratoires-supports des performances de leurs propres méthodes. Ces échantillons ont été validés par l'ensemble des Laboratoires-Supports.

Un échantillon à forte concentration ("gamme standard") a été proposé à l'ensemble du réseau avec un protocole standard d'utilisation; cette action avait en vue l'objectif d'homogénéisation (i) des performances de sensibilité de la PCR et (ii) de la quantification des charges parasitaires.

En plus de la "gamme standard", un calibrateur standardisé à 10 toxoplasmes par mL a été proposé pour servir à quantifier chacune des gammes utilisées dans un centre donné et, en définitive, pour servir de gamme unique (ou point de gamme unique pour ceux qui utilisent une technologie qui le permet).

Cependant, le retour des participants a été faible et le suivi de l'adoption de cette mesure par les différents centres a été médiocre : ce travail doit être renforcé en 2012.

b) Participation à la "standardisation" du diagnostic moléculaire

L'objectif ci-dessus y participe déjà pleinement.

De plus, de façon pragmatique, devant l'extrême diversité des méthodes constatées par ses enquêtes, et en lien avec son objectif d'"homogénéisation des performances", le Pôle "Biologie moléculaire" a cherché à définir des seuils minimum de sensibilité à atteindre, qui pourraient être proposés comme "standard" aux laboratoires concernés par ce diagnostic. Les études multicentriques réalisées au sein du GdT en 2009-2010 ont permis d'établir un seuil "consensus" à 0,5 toxoplasmes par prise d'essai de PCR, seuil qui a été communiqué au niveau national en 2011.

Cependant, ce seuil est un premier pas important mais n'est pas tout à fait satisfaisant : (i) il a été défini, pour des raisons techniques, par prise d'essai et non en parasites par mL ; (ii) il pourrait en réalité s'avérer trop élevé.

En septembre 2011, le Pôle Biologie moléculaire a donc réalisé une étude multicentrique visant à établir un seuil de détection en toxoplasmes par mL. Pour cela, il fallait établir le seuil de sensibilité "réel" des différents centres sur liquide amniotique en conditions de routine, donc en tenant en compte les pratiques pré-analytiques des différents laboratoires.

Cette étude préconisait l'utilisation du volume de liquide amniotique utilisé en routine (1,5 à 15 ml selon les laboratoires) car, en pratique, ce dernier influence forcément le seuil de sensibilité. L'étude a montré qu'en effet, le seuil de sensibilité "réel" variait selon les centres de 0,5 à 13 parasites /ml. Toutefois, ce seuil n'était pas nécessairement corrélé au volume de liquide analysé, montrant bien ainsi l'importance des performances intrinsèques de la méthode de PCR.

Une retombée intéressante de cette étude a été également de révéler des différences importantes et insoupçonnées dans l'interprétation et le rendu d'un résultat positif de PCR. Ceci constitue une piste importante de recommandation future. Une autre retombée "secondaire" intéressante concerne une future recommandation sur le volume minimal de liquide amniotique à analyser par examen prénatal.

Cette étude est poursuivie en 2012.

c) L'évaluation d'une trousse commerciale de PCR-Toxoplasma a été réalisée de manière multicentrique et en comparaison avec des méthodes "maison" (coordonnateur = Laboratoire-Support de Strasbourg). D'après les résultats obtenus, ce nouveau kit montre un niveau de performance satisfaisant, avec toutefois des réserves concernant la qualité de la production. Un article contenant les résultats de cette évaluation est en cours d'écriture.

d) Une étude comparative multicentrique a été réalisée fin 2011-début 2012 sur les performances (en termes de sensibilité et de reproductibilité) de différentes méthodes d'extraction de l'ADN de Toxoplasme à partir du liquide amniotique (coordonnateur = Laboratoire-Support de Dijon). L'étude a porté sur une méthode manuelle (QiaAmp DNA Mini kit, Qiagen®) et cinq méthodes automatisées : MagNapture compact, Roche® ; Biorobot EZ1, Qiagen® ; EasyMag, BioMérieux® ; Macherey/Nagel® (adapté à un automate ouvert type TECAN) et 8LX, Bionobis®. Les résultats sont en cours d'analyse.

e) Une étude comparative de trois méthodes de PCR a été réalisée au sein des Laboratoires-Support 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. Un article sur cette étude est actuellement en cours de soumission.

## 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 pour la dixième fois en 2011, sous l'égide du CNR. Il consiste en une gamme de concentrations relativement basses de toxoplasmes, préparées avec le matériel étalon cité ci-dessus. Une des nouveautés a été d'inclure d'une part une souche isolée à partir d'une toxoplasmose congénitale récente; d'autre part d'inclure des échantillons de plasma. Il a été suivi par 29 participants (dont l'ensemble des laboratoires de CHU possédant l'agrément pour le DPN de la toxoplasmose, mais aucun laboratoire privé). Ce CQE concerne toujours exclusivement le DPN (excluant pour l'instant le travail sur le sang et le placenta, moins courant et techniquement beaucoup plus difficile à évaluer). Il reste basé sur une participation volontaire, anonyme et gratuite.

Les résultats montrent toujours une sensibilité globale de la PCR-Toxoplasma en France extrêmement satisfaisante. Toutefois, deux laboratoires ne détectaient pas deux des trois échantillons à 4 toxoplasmes par mL (exigence requise), un laboratoire ne détectait pas 12 toxoplasmes par mL, et un autre laboratoire ne détectait pas 16 toxoplasmes par mL. De plus, pour la première fois depuis 8 ans, deux laboratoires ont déclaré un ou deux faux positifs sur les deux échantillons négatifs. Il est donc indispensable de rester particulièrement vigilant sur l'évaluation de l'ensemble de la technique, ce qui souligne l'absolue nécessité d'une auto-évaluation régulière pour chaque centre (voir plus loin).

Par ailleurs, les données continuent de mettre en évidence un problème au niveau de la quantification absolue, bien que la quantification au sein d'un même centre devienne progressivement fiable. Les résultats sont relativement fiables et en adéquation avec les concentrations attendues pour 13 laboratoires sur au moins une des concentrations, et 11 laboratoires sur les deux concentrations. Six laboratoires ont rendu des quantifications trop éloignées de ce qui avait été envoyé. Ces données montrent une nette amélioration par rapport à 2009. Toutefois, elles soulignent encore le besoin d'une méthode de quantification standardisée, sujet d'étude actuel du Pôle BM du CNR. Le CNR conseille de ne pas rendre de quantification absolue aux cliniciens.

Par ailleurs, le Pôle Biologie moléculaire du CNR est également expert scientifique auprès de l'entreprise Quality Control for Molecular Diagnosis (QCMD, Glasgow, UK) ; cette entreprise privée, qui réalise des contrôles de qualité pour le diagnostic moléculaire de nombreux microorganismes, s'est en effet heurtée à des difficultés nécessitant un support scientifique expert. Elle a contacté le Laboratoire Associé en 2010 afin qu'il partage son savoir-faire en matière de promoteur de Contrôles de Qualité et proposé une collaboration dans ce domaine au niveau européen (80 centres participants). Cette offre d'expertise s'est poursuivie en 2011.



### 3. Enquêtes sur les pratiques et les méthodes utilisées en diagnostic moléculaire

- L'enquête annuelle associée au Contrôle de Qualité national continue de montrer une très lente évolution vers une homogénéisation des méthodes. Mais la diversité des amorces utilisées en PCR reste grande. En 2005, 25 centres utilisaient 15 couples d'amorces sur 3 cibles ADN (Sterkers et al., CMI, 2009). En 2011, 23 centres (sur 27 répondants à ce jour) utilisaient 11 amorces sur les mêmes cibles ADN; par contre, 8 seulement (contre 12 en 2009) des 21 méthodes ciblant l'élément rep529 utilisaient les mêmes amorces (Reischl et al. 2003). A noter que quatre centres ont utilisé la trousse commerciale de PCR Bio-évolution®.

D'autres aspects concernant les méthodes d'extraction d'ADN, le nombre de réactions nécessaires pour le DPN, l'utilisation des témoins négatifs et positifs, les mesures de prévention des contaminations etc. ont été abordés. Deux points notables :

(i) Les méthodes d'extraction automatisées gagnent du terrain (11 centres sur 27).

(ii) Seulement 20 centres utilisent des témoins négatifs (en dépit des recommandations régulièrement énoncées dans le retour d'enquête).

Cette enquête a fait l'objet d'un retour d'information à tous les participants.

- L'enquête extrêmement détaillée réalisée en 2007 et abordant tous les aspects du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en prénatal et néonatal (pratiques pré-analytiques et analytiques, méthodes d'extraction, nombre de réactions nécessaires pour le DPN, utilisation des témoins négatifs et positifs, mesures de prévention des contaminations etc.) a été analysée, et les données de cette enquête ont fait l'objet d'un retour d'information à tous les participants en 2011. Les données de cette enquête n'avaient pas été diffusées antérieurement en raison de l'extrême diversité observée entre les méthodes et de la complexité de l'analyse qui devait en être faite, ainsi que de la difficulté de pouvoir tirer des conclusions à partir de ces données. Cette enquête sert toutefois de référence en ce qui concerne l'évolution et la diversité de ces méthodes pour la définition d'axes de travail concernant la standardisation.

### 4. Recommandations concernant le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

La rédaction de recommandations à destination du site Internet du CNR a été débutée en 2010-2011 (voir le chapitre Formation/ Liste des guides).

### 3/ ACTIVITES DE SURVEILLANCE

#### 3-1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

##### **a) Réseau de partenaires**

- description des partenaires

Les prélèvements, accompagnés de données cliniques et épidémiologiques, sont adressés par les laboratoires de Parasitologie des CHU membres du CNR et par quelques centres hospitaliers non universitaires de métropole et des DOM-TOM.

	2011		Total 2006-2011	
	prélèvements	patients	prélèvements	patients
Amiens	1	1	6	6
Bordeaux	0	0	4	4
Brest	4	3	13	10
Caen	2	2	17	16
Cayenne	7	7	56	50
Dijon	5	3	40	33
Fort de France	1	1	6	5
Grenoble <sup>§</sup>	10	10	58	56
Lille	3	2	24	18
Limoges <sup>§</sup>	1	1	68	51
Lyon	6	5	11	10
Marseille	10	10	43	39
Montpellier	15	10	65	56
Nancy	1	1	3	3
Nantes	12	10	121	108
Nice	0	0	34	30
Paris Bichat**	0	0	1	1
Paris Cochin	17	16	124	117
Paris Institut de Puériculture***	0	0	64	59
Paris Necker	0	0	6	2
Paris Pitié Salpêtrière	34	31	130	125
Paris Saint Antoine	10	9	29	24
Paris Saint Louis	0	0	17	17
Poitiers	1	1	15	13
Pointe à Pitre*	1	1	2	2
Reims <sup>§</sup>	10	10	140	122
Rennes	10	7	36	31
Rouen**	0	0	11	10
Saint Etienne	14	14	15	15
Saint Laurent du Maroni*	0	0	7	5
Strasbourg	11	8	23	20
Toulouse <sup>§</sup>	16	14	131	113
Tours	5	4	33	32
<b>TOTAL</b>	<b>207</b>	<b>180</b>	<b>1354</b>	<b>1202</b>

Tableau 5 : Participation des partenaires du réseau à l'envoi de prélèvements au CNR Toxoplasma 2011 et total depuis la création du CNR

\*: isolement des souches à Limoges

\*\* : isolement des souches à Reims

\*\*\* : fermeture du laboratoire de l'Institut de Puériculture en Septembre 2009.

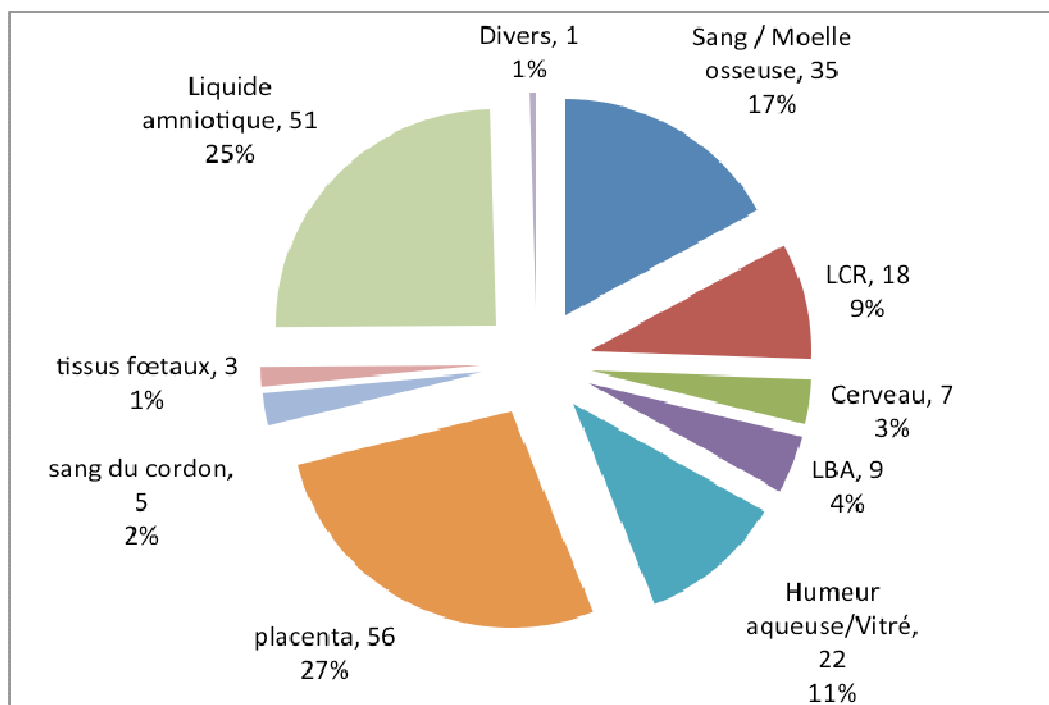
§ : inclusion d'envois depuis 2002 (création du CRB antérieure à celle du CNR)

- Estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau

Les 33 centres assurent une bonne représentativité du territoire métropolitain et des départements français d'outre-mer (Antilles-Guyane). 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 sur la réelle représentativité géographique des prélèvements et la distribution des génotypes à travers la France fait cependant apparaître des zones peu représentées en Aquitaine. Parmi les départements et territoires français d'outre-mer, nous ne disposons pas de données sur l'île de la Réunion (1 seule souche de cette origine isolée à Toulouse). Des souches de Polynésie ont été analysées pour la première fois (envoi par CHU Cochin).

### **b) Définition de l'échantillon de souches isolées**

Figure 3 : Origine des souches et ADN adressés au CNR en 2011



Les 207 prélèvements adressés au CNR correspondent à 180 patients.

### **c) Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances**

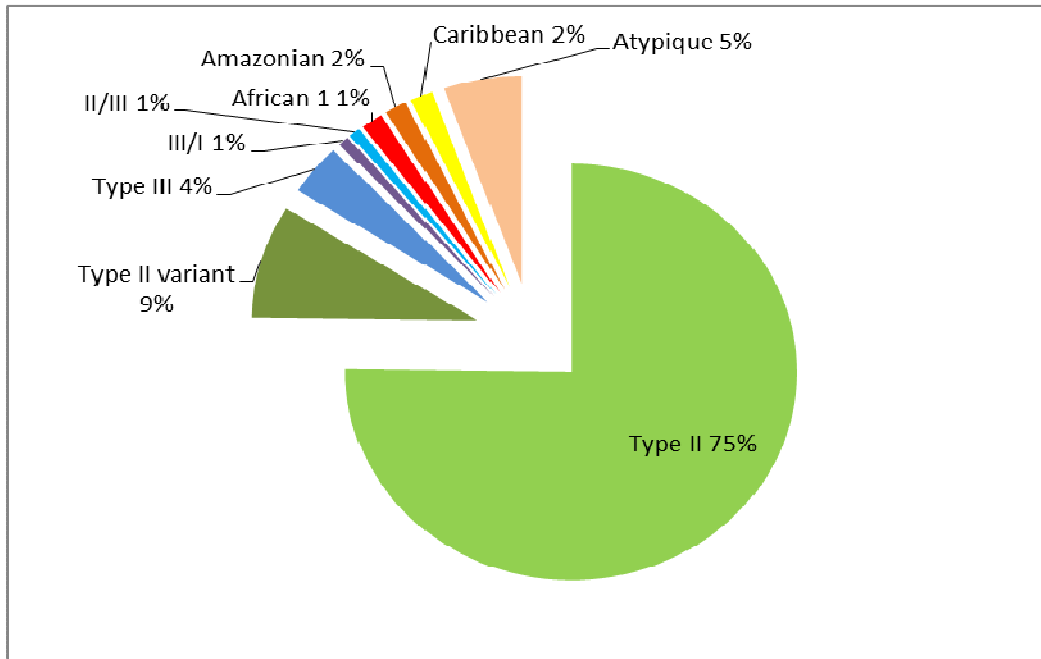
Les formes cliniques d'origine des 207 prélèvements adressés au CNR en 2011 sont les suivantes :

- 116 (55%) prélèvements de cas de toxoplasmose congénitale. Cette proportion est en baisse par rapport aux années précédentes.
- 23 (11,1%) prélèvements de toxoplasmose oculaire de patients immunodéprimés ou immunocompétents ; cette proportion également en baisse pourrait s'expliquer par la demande faite aux correspondants de n'envoyer que des extraits ADN amplifiés en PCR avec un ct <33 (la majorité des prélèvements d'humeur aqueuse ou de vitré ont de très faibles concentrations d'ADN toxoplasmique).

- 60 (28,9%) prélèvements de cas de toxoplasmose systémique de patients immunodéprimés
- 6 (2,9%) prélèvements de cas de toxoplasmose systémique de patients immunocompétents
- 2 (1%) prélèvements sans renseignements cliniques

Le génotypage a été possible pour 125/180 patients (69,4%) (Fig 4, Tableau 6a et 6b).

Figure 4 : Répartition des différents génotypes observés pour 125 patients.



Génotype	T. congénitale	T. immunodéprimés	T. oculaire	T. immunocompétents	Pas de renseignements	Total
Type II	64	24	6	0	0	94
Type II variant	8	2	1	0	0	11
Type III	1	4	0	0	0	5
III/I	0	0	0	0	1	1
II/III	1	0	0	0	0	1
African 1	0	2	0	0	0	2
Amazonian	0	0	0	2	0	2
Caribbean	1	1	0	0	0	2
Atypique	2	2	0	3	0	7
Non amplifié	22	20	12	1	1	56
<b>Total</b>	<b>99</b>	<b>55</b>	<b>19</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>181*</b>

\* : un patient immunodéprimé présente à la fois une toxoplasmose oculaire et une atteinte systémique

Tableau 6 a : Répartition des génotypes par forme clinique chez les 180 patients.

Génotype	Afrique	Amérique du Sud	Caraïbes	Europe hors France	France	Polynésie	Pas de données
Type II/II variant	0	0	0	1 (Suisse)	87	0	17
Type III	1	0	0	0	3	0	1
III/I	0	0	0	0	0	0	1
II/III	0	0	0	0	1	0	0
African 1	2	0	0	0	0	0	0
Amazonian	0	2	0	0	0	0	0
Caribbean	0	0	1	0	0	0	1
Atypique	0	4*	0	1 (Bulgarie)	0	1	1
Non amplifié	3	2	1	0	24	0	24
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>115</b>	<b>1</b>	<b>45</b>

\* : toxoplasmose acquise en France, consommation de viande de cheval d'Argentine.

Tableau 6 b : Répartition des génotypes par origine géographique probable de la contamination.

En 2011, les données remarquables du génotypage sont les suivantes :

- le génotype II (type II et variant) est observé chez 84% des 125 patients pour lesquels le génotypage a été possible, et dans 93,5% des cas de toxoplasmoses congénitales avec les mêmes caractéristiques que d'habitude. Il représente 95,6% des souches isolées des patients probablement infectés en France. Ces différents pourcentages sont très stables depuis le début de la création du CNR. Le type II variant (variations sur la taille des microsatellites définissant le type II) semble correspondre à un phénomène épidémique (voir paragraphe 3.3 et 4)

- La fréquence du génotype III est également très stable (4% vs 4,2% de 2006 à 2010) : sur les 5 patients infectés par ce génotype, l'origine probable de la contamination était le Cameroun dans un cas ; une origine extra-européenne peut être suspectée pour 2 autres patients.

- Les génotypes différents des types II et III sont présentés dans le tableau 7 :

Code CNR	Nature du Prélèvement	Origine géographique	Clinique	Date séroconversion MS	Génotype
TgH 29116A	LCR	Afrique Cote d'Ivoire (France 2010)	HIV / T cérébrale / réactivation		Africa 1
TgH 41005A	LCR	Cap Vert - Portugal	HIV / T cérébrale / Réactivation / Décès		Africa 1
TgH 18049C	sang	Am Sud Guyane	T. disséminée		Amazonian
TgH 18048A	sang	Am Sud Guyane	T disséminée		Amazonian
TgH 18045A	sang	Am Sud Guyane (Camopi)	Adénopathies, fièvre, enfant de 1 an		atypique
TgH 18044A	sang	Am Sud Guyane (Camopi)	Hépatosplénomégalie, adénopathies, fièvre, enfant de 1 an		atypique
TgH 25056A	Liquide amniotique	Europe Bulgarie	T. congénitale	26	Atypique
TgH 13117A	sang	France (cheval Argentine)	T. disséminée (sang, LCR) et oculaire / Primo-infection/ Lupus, corticoïdes		atypique
IgH 3601/A	LBA		HIV / T pulmonaire adénopathies/ Pneumocystose / amélioration complète		Atypique
TgH 18050A	sang	Am Sud Guyane	T. disséminée pulmonaire		atypique
TgH 13119A	Liquide amniotique	Polynésie Utuora Raiatea	T. congénitale sans renseignements cliniques	29	Atypique
TgH 40002A	Placenta	Caraïbes (Guadeloupe)	T. Congénitale asymptomatique	28	Caribbean 2
TgH 36022A	LBA		HIV / T pulmonaire / Pneumocystose		Caribbean 3

Tableau 7 : Génotypes différents des types II et III observés en 2011.

- Les 2 patients infectés par le génotype Africa 1 sont tous deux d'origine africaine (Côte d'Ivoire et Cap Vert). Il s'agit de réactivation chez des patients immunodéprimés comme cela a déjà été décrit dans Ajzenberg et al. 2009.

- Les génotypes Caribbean 2 et 3 ont été retrouvés chez deux patients. Pour l'un d'eux, l'origine guadeloupéenne de l'infection (toxoplasmose congénitale asymptomatique) a été déterminée. Ces génotypes ont été décrits sur la zone côtière de la Guyane et dans les îles des Caraïbes. Au sein de ce groupe « Caribbean », plusieurs génotypes (1, 2, 3) ont été identifiés, avec des virulences expérimentales différentes. Au CNR, 10 souches de ce type ont été retrouvées, sans que l'on puisse déterminer pour l'instant un lien avec les manifestations cliniques (7 patients immunodéprimés, 2 toxoplasmoses congénitales dont une sévère). Un renforcement des études épidémiolo-cliniques sur la toxoplasmose acquise et congénitale serait nécessaire dans ces départements français d'Amérique.

- Deux patients ont été infectés par des génotypes « Amazonian ». Il s'agit de toxoplasmoses acquises disséminées. Les patients ont consommé de la viande de gibier (Maripasoula et Mana).

- Les 7 patients infectés par des génotypes qualifiés d'atypiques correspondent à des infections ayant une origine hors de France métropolitaine :

3 sont des patients infectés en Guyane française mais les souches isolées ne peuvent être pour l'instant regroupées parmi les souches qualifiées d' « Amazonian ». Il s'agit de 2 enfants du même village présentant une forme modérée de toxoplasmose et d'un patient présentant une toxoplasmose pulmonaire.

Un cas de toxoplasmose congénitale observée après infection de la mère en Bulgarie. Il n'existait pas de lésions échographiques lors de l'examen prénatal, mais les données néo et post natales ne sont pas disponibles (enfant perdu de vue).

Un cas correspond à une toxoplasmose congénitale acquise en Polynésie Française, sans renseignements cliniques ; c'est la première souche isolée de ce territoire ; elle confirme la diversité génétique du parasite en fonction de l'origine géographique.

Un patient a été infecté en France, mais l'enquête épidémiologique a révélé qu'il avait consommé de la viande de cheval originaire d'Argentine. Il s'agit d'une toxoplasmose acquise par un patient atteint de lupus, traité par corticoïdes. Il a développé une atteinte systémique (parasite isolé du sang et du LCR) et oculaire. Ce dernier cas est le 6<sup>ème</sup> observé au CNR suite à l'ingestion de viande de cheval originaire d'Amérique. Comme dans d'autres cas, il s'agit d'une toxoplasmose sévère, chez un patient faiblement immunodéprimé (voir encart 1). Un travail de thèse a été entrepris pour isoler les toxoplasmes à partir de la viande de cheval.

- Pour 2 patients, les génotypes isolés peuvent être classés comme des recombinants :

Un génotype III/I isolé d'un lavage broncho-alvéolaire (pas de renseignements cliniques ni épidémiologiques)

Un génotype II/III isolé d'un cas de toxoplasmose congénitale, en zone rurale près d'Amiens.

Encart 1 : cas de toxoplasmoses observés après consommation de viande de cheval importée

Code CNR	Terrain	Forme clinique	Epidémiologie	Souche
TgH 23018	BPCO, corticoïdes	Toxoplasmose pulmonaire, mort	Consommation de cheval Origine Canada probable	atypique
TgH 23028	Grossesse	Toxoplasmose congénitale asymptomatique	Consommation de cheval Origine Brésil probable	atypique
TgH 20005	Grossesse Thyroïdite d'Ashimoto	Réinfection à 7 mois de grossesse Toxoplasmose congénitale sévère	Consommation de cheval Origine Amérique du Sud probable	atypique
TgH 13117	Lupus, Corticoïdes	Toxoplasmose disséminée (sang, LCR) et oculaire	Consommation de cheval Origine Argentine probable	atypique
MAS	Grossesse	Toxoplasmose congénitale sévère (IMG) Mère : adénopathies et asthénie persistant pendant plus de 3 ans	Consommation régulière de viande de cheval. Origine Amérique du Sud probable	atypique

***d) Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)***

Mise en place d'un système de surveillance des toxoplasmoses congénitales en France.

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 la toxoplasmose congénitale, instauré depuis 1978 en France et sans évaluation jusque là. 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 de toxoplasmoses congénitales diagnostiqués sur le territoire national. Un groupe de travail spécifique 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 (V. Goulet, L. King, V. Vaillant) des médecins biologistes représentant des laboratoires publics ou privés effectuant le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (M. Wallon, Lyon, un représentant du laboratoire CERBA), un gynécologue-obstétricien (A. Berrebi, Toulouse), un pédiatre (P. Garcia, Marseille), un ophtalmologue (A. Brézin, Paris) et un médecin épidémiologiste en Santé Publique (C. Binquet, Dijon). Ce groupe a défini les objectifs du

système national de surveillance et confié le développement d'un logiciel de déclaration annuel des cas au Laboratoire Coordonnateur du CNR (CHU Reims) en partenariat avec la Société Epiconcept reconnue pour sa compétence en matière d'analyses informatiques notamment dans le domaine de l'épidémiologie. 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, constitué par les laboratoires spécialisés dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale (n=35 lors de la création, 34 depuis la fermeture de l'Institut de Puériculture) et des laboratoires polyvalents (n=16) dont la fréquence de notification est moindre (Annexe 2).

Les objectifs de ce système de surveillance sont les suivants :

Constituer une base nationale des cas de toxoplasmose congénitale afin d'estimer la prévalence de la toxoplasmose congénitale en France.

Recenser au moins 80 % des cas diagnostiqués en France

Estimer le nombre de toxoplasmoses cliniques sévères à la naissance ou au moment du diagnostic (lésions neurologiques et oculaires)

Produire des tableaux de synthèse, accessibles à tous les acteurs impliqués dans la toxoplasmose en France et régulièrement actualisés.

Suivre les tendances de cette prévalence en pérennisant la notification des cas au cours du temps (analyse des cas tous les ans, réalisée l'année N+ 6 mois afin d'inclure tous les enfants atteints notifiés l'année N -1, compris les cas notifiés en période anténatale).

En 2006, il a été décidé que cette surveillance n'avait pas d'objectif de suivi des toxoplasmoses congénitales et ne pourrait donc pas produire de données sur le nombre de séquelles à long terme dues à la maladie.

Le logiciel spécifique de notification (Toxosurv, Voozanol, Epiconcept<sup>TM</sup>) a été élaboré par la Société Epiconcept (S. Becquerel, G. Desve) en collaboration avec le CNR (C. Pennaforte, I. Villena, C. Delmas, CHU Reims et T. Ancelle, CHU Cochin) et l'InVS (V. Goulet et L. King du DMI). La notification des cas se fait par une application de saisie sécurisée du logiciel Voozanol, à partir de l'anonymisation du cas grâce. Les données individuelles (informations épidémiologiques, cliniques et biologiques) sur les cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en période anténatale et néo- ou postnatale ont été définies et ont permis l'établissement d'une fiche de collecte correspondant aux masques de saisie du logiciel ToxoSurv. Un contrôle des doublons est effectué automatiquement en cas de déclaration d'un même cas par deux laboratoires sur la base du code d'anonymisation.

Les droits d'accès au logiciel de notification sont définis par le Laboratoire Coordonnateur qui enregistre les laboratoires participants au réseau ToxoSurv dans la base. Le recueil des informations saisies dans la base est réalisé par I. Villena, C. Delmas (ARC) et T. Ancelle (Pôle Epidémiologie) qui ont élaboré dès 2006 un programme statistique produit spécifiquement pour l'analyse des résultats (développé sous STATA, Ritme Informatique<sup>TM</sup>). Le logiciel de notification est hébergé par le CHU de Reims et la notification des cas est faite via le site Web (<https://www.chu-reims.fr/notification> de cas).

Ce système de surveillance a été initié en 2006 et recueille annuellement les données des cas de toxoplasmoses congénitales en France (métropole et DOM) depuis 2007.

King L., Villena I., Ancelle T., Wallon M., Garcia P., Thulliez P., Goulet V. La toxoplasmose congénitale : mise en place d'un dispositif de surveillance en France. BEH, numéro thématique 8 avril 2008, 122-24.

Résultat du système de surveillance pour l'année 2011 : Annexe 3

Le Laboratoire Coordonnateur fournit tous les ans à l'InVS un rapport synthétique sur les cas notifiés au cours de l'année N-1, ainsi en 2011 les données d'activités de surveillance des toxoplasmoses congénitales pour l'année 2010 ont été transmises (Annexe 3). Ce rapport est présenté et diffusé (de manière détaillée) à l'ensemble des membres du réseau du CNR au cours de la réunion annuelle du réseau. En outre, une réunion du comité de pilotage



« Toxosurv » est organisée annuellement par l'InVS permettant une présentation des données du système de surveillance de l'année écoulée avec discussion entre les membres sur les objectifs de surveillance pour l'année à venir. Cette réunion a eu lieu le 21.11. 2011 et a permis de valider le rapport présenté. Une extraction du rapport (avec données minimales choisies avec l'InVS) est ensuite mise sur le site Internet du CNR. ([http://www.chu-reims.fr/CNR toxoplasmose](http://www.chu-reims.fr/CNR_toxoplasmose))

En 2011, 244 cas de toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiqués en France conduisant à une interruption de grossesse dans 12 cas (11 Interruptions de grossesse pour raison médicale et 1 Mort fœtale in utero) ; 207 enfants sont nés dont 5 présentent une atteinte sévère de la maladie et 13 une atteinte modérée, 189 enfants sont asymptomatiques à la naissance. Un logigramme représente le récapitulatif de ces cas en Annexe 3. Ainsi, la prévalence globale de la toxoplasmose congénitale observée en France est de 2,9 pour 10 000 naissances et la prévalence des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués à la naissance est de 1.6 pour 10 000 naissances. La létalité liée à la toxoplasmose congénitale est de 4,9 % (en diminution par rapport à l'année 2010 mais à peu près équivalente aux années antérieures) et la morbidité globale représente 8,7 % (voir tableau des indicateurs remarquables, Annexe 3).

Ces données de surveillance montrent une légère diminution du nombre de cas par rapport aux années antérieures: 272 cas en 2007, 268 cas en 2008, 266 cas en 2009 et 266 cas en 2010. Toutefois, la proportion entre cas symptomatiques et asymptomatiques est sensiblement la même d'une année sur l'autre.

Cette baisse du nombre de cas nous a interpellé et nous nous sommes demandés si, du fait de la fermeture du laboratoire de l'Institut de Puériculture (Dr P. Thulliez), un certain nombre de cas n'avaient pas été diagnostiqués au sein de laboratoires privés n'appartenant pas au réseau de surveillance identifié (réseau Toxosurv). Nous avons contacté le laboratoire Cerba (parmi les plus gros laboratoires privés en France) pour recueillir le nombre de cas diagnostiqués en période postnatale et nous nous sommes aperçus que ce laboratoire ne notifiait ses cas qu'en période anténatale depuis le début de la surveillance. Nous avons alors demandé à son biologiste référent d'extraire ses données de diagnostic relatives au diagnostic de toxoplasmose congénitale et il s'est avéré que cela ne représentait qu'un faible nombre de cas (inférieur à 5 par an). Les données rétrospectives (2008- 2009-2010) étant trop difficiles à documenter, il a été décidé que ce laboratoire transmettrait ses cas régulièrement en 2012 au laboratoire coordonnateur en charge de les intégrer dans la base de surveillance (via le logiciel Toxosurv), les données pour les cas diagnostiqués en 2011 seront intégrés rétrospectivement.

Les autres laboratoires privés ne diagnostiquent que très rarement des cas de toxoplasmoses congénitales, ces derniers étant souvent référés aux CHU (laboratoires de parasitologie).

Il sera important de suivre ce nombre de cas pour l'année 2011 (données recueillies en 2012) afin de voir si cette tendance à la baisse se confirme. Dans cette hypothèse, pour affirmer cette diminution, le Laboratoire Coordonnateur serait amené à évaluer avec l'InVS l'exhaustivité du recueil des cas après une nouvelle enquête auprès des laboratoires privés. Toutefois, la prévalence globale de la toxoplasmose congénitale est inférieure à celle estimée à partir d'enquêtes anciennes datant de plus d'une dizaine d'années et l'importance du recueil annuel des cas est donc réelle. Ce système de surveillance est d'ailleurs unique en Europe et témoigne de l'importance de la France dans le domaine d'étude de cette affection.

Afin de sensibiliser les différents acteurs de la surveillance, une relance par mail est réalisée par le Laboratoire Coordonnateur, trimestriellement pour les 35 laboratoires spécialisés (notifiant via le Web) et semestriellement pour les autres (1-2 cas par an). De plus, une newsletter est rédigée par le Laboratoire Coordonnateur et adressée par mail à tous les

correspondants du réseau « Toxosurv », elle présente les informations recueillies dans l'année écoulée (et notamment le logigramme sur la sévérité de la toxoplasmose congénitale) et rappelle les impératifs du système de surveillance (Annexe 4). L'ensemble des résultats est transmis aux membres du réseau Toxosurv et des données sont extraites et mises en ligne sur le site Internet du CNR (données Web).

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

Le laboratoire coordonnateur du CNR Toxoplasmose (Reims) est laboratoire associé à l'ANSES pour la parasitologie (USC Epitoxo), le LNR (laboratoire national de référence) a en charge la surveillance des zoonoses d'origine animale et à ce titre est en charge de collecter les échantillons d'origine animale et ceux issus de l'alimentation. Les isolats sont transmis pour caractérisation au Pôle souches du CNR.

Le pôle souche du CNR (Limoges) analyse les souches isolées des produits animaux soit dans le cadre d'études spécifiques sur une espèce animale (viande de mouton ou de bœuf via des plans de surveillance organisés avec la DGAL), soit dans le cadre d'une enquête épidémiologique suite à des cas humains groupés.

3-2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

**a) Définition de l'échantillon de souches testées :**

Les souches actuellement testées pour l'étude de la résistance sont celles précédemment étudiées avec le modèle de cellules MRC5 (Menecoeur et al., 2008). Des souches isolées dans le cadre de collaborations avec des laboratoires de santé animale et des souches humaines isolées dans le cadre du CNR sont également testées pour accroître le nombre de souches étudiées afin de définir la résistance chez *T. gondii*.

Par ailleurs, des souches isolées de patients peuvent être testées sur demande en fonction de critères cliniques d'inefficacité thérapeutique. En 2011, le CNR a estimé une sensibilité intermédiaire pour une souche isolée d'un patient immunodéprimé décédé de toxoplasmose cérébrale.

**b) Définitions utilisées pour exprimer la résistance :**

Les définitions utilisées pour exprimer la résistance nécessite un nombre conséquent de souches. Une première estimation pourra être réalisée avant le début de l'été 2012.

3-3 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Emergence limitée dans le temps d'un clone de *Toxoplasma gondii* de type II chez des patients atteints de toxoplasmose en 2010:

Lors de sa mission de surveillance des génotypes de souches de *Toxoplasma gondii* isolées de cas humains de toxoplasmose en France, le pôle souches du CNR de la toxoplasmose a identifié une sur-représentation d'un génotype au sein du type II en 2010.

Ce génotype multilocus identique avec 15 marqueurs MS et appartenant au type II a été identifié chez 13 patients atteints de toxoplasmose (12 toxoplasmoses congénitales et 1 primo-infection de l'immunodéprimé). Le fort pouvoir de discrimination ( $D=0.997$ ) des 15 marqueurs microsatellite permet de conclure que, si des isolats ont exactement le même génotype multilocus, il y a 99,7% de chance que ces isolats correspondent à une seule et même souche. A partir des informations dont dispose le CNR, il est apparu que l'infection toxoplasmique de ces patients par cette souche a été limitée dans le temps dans une période comprise approximativement entre le 15 décembre 2009 et le 20 février 2010. Une datation plus précise cas par cas pourra être obtenue auprès des correspondants du réseau du CNR toxoplasmose. Plus de la moitié des patients (7/13) résidaient à l'époque des faits dans 3 départements limitrophes et bordant la façade atlantique du Nord-ouest de la France : Morbihan, Loire-Atlantique et Vendée. Quatre patients résidaient en Haute-Vienne, Tarn, Seine et Marne, Marne. Le CNR ne dispose pas à l'heure actuelle d'information sur le département de résidence de deux patients mais cette information pourra être précisée par les correspondants du réseau du CNR.

Etant donné la période de contamination des cas et le lieu de résidence de plus de la moitié des patients, nous suspectons les fruits de mer (huîtres par exemple) à l'origine de la contamination par cette souche de *Toxoplasma gondii*. Le CNR toxoplasmose a sollicité l'expertise de l'InVS pour confirmer cette hypothèse par une enquête épidémiologique visant à l'interrogatoire des patients en recherchant la notion de consommation de fruits de mer pour tous les patients pendant la période incriminée et également la notion de séjour dans un des 3 départements bordant la façade atlantique du Nord-ouest de la France (Morbihan, Loire-Atlantique et Vendée) pour les quatre patients résidant en Haute-Vienne, Marne, Seine et Marne, et Tarn pendant cette période.

### 3-4 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Le CNR est le seul réseau de surveillance de l'épidémiologie des souches de toxoplasmes existant dans le monde. Les chercheurs du CNR pôle souches collaborent avec des équipes internationales pour apporter leur expertise dans ce domaine (en 2009 : Turquie, Algérie, Pays-Bas, Finlande ; en 2010 : Tunisie, Italie, Danemark ; en 2011 : Serbie, Italie). L'équipe du laboratoire coordonnateur (Pôle épidémiologie) collaborent également à diverses enquêtes épidémiologiques notamment en Roumanie et Serbie et au Burkina Faso.

Un logiciel de saisie (ToxoSurv, Voozadoo) des cas de toxoplasmose congénitale a été élaboré par la Société Epiconcept en collaboration avec le CNR Pôle Epidémiologie et l'InVS. Voozadoo, de part sa modularité, son ouverture et les technologies utilisées permet l'extraction et la transmission de données ou la mise à disposition de données sous les formes suivantes :

- En ligne : Transmission via Voozadoo, l'InVS peut avoir accès à des informations agrégées via un compte dédié et sécurisé. La sécurisation des transferts est assurée par le serveur Web (protocole https).
- Extraction de données agrégées ou de fichiers à plat anonymisés (Feuilles excel, fichier texte, pdf..). Le niveau de sécurisation des transferts dépend de la nature des données (individuelles ou agrégées).
- Intéropérabilité / Web services : Les technologies utilisées dans Voozadoo (en particulier l'exploitation native de fichiers Xml) permettent une mise en place naturelle d'interfaces pour un transfert automatique et sécurisé de données standardisées.

Ce type d'architecture correspond à celle mise en place pour les échanges avec l'ECDC pour alimenter la base TESSy - cf machine to machine interface to TESSy  
[www.ecdc.europa.eu/.../0907\\_TER\\_TESSy\\_Web\\_Service\\_Technical\\_Documentation\\_1.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/.../0907_TER_TESSy_Web_Service_Technical_Documentation_1.pdf)

Les données de surveillance sont transmises par l'InVS, les données de surveillance des toxoplasmoses congénitales de l'année 2009 ont été transmises en mars 2011 et celles de l'année 2010 l'ont été en avril 2012. Ces données recueillies en France sont les seules données valides et solides pour l'Europe, les autres états membres n'envoyant que des données parcellaires de surveillance (absence de recueil exhaustif des cas au niveau national).

### 3-5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Un rapport visant à une évaluation du programme national de dépistage de la toxoplasmose congénitale a été mené par l'HAS en 2009 à la demande de la DGS, avec notamment la participation de 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 publiées en octobre 2009 indiquent la décision de ne pas modifier la surveillance sérologique telle que pratiquée à l'heure actuelle en attendant d'avoir des données consolidées du système de surveillance et des données sur l'efficacité des traitements proposés dans le cadre de cette affection.

Ainsi, deux PHRC nationaux visant à évaluer les traitements proposés dans la prévention de la toxoplasmose congénitale ou dans les schémas thérapeutiques proposés aux enfants atteints ont été initiés :

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-foétale 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 (avec appui du laboratoire de Parasitologie, Pr Peyron, Dr wallon)

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.

Un article a été publié en 2011 sur la méthodologie de cet essai (Thérapie, 2011, voir Annexe Publications).

Pour ces deux PHRC, I. Villena s'est impliquée en tant que co-investigateur faisant partie du comité de pilotage de chacun de ces PHRC, prenant en charge la coordination des laboratoires de parasitologie impliqués dans ces programmes. Il est important de noter que la majorité des laboratoires membres du CNR de la Toxoplasmose participent à ces PHRC en association avec les services médicaux (Gynécologie-Obstétrique et Pédiatrie) de leur CHU directement impliqués. Ces deux PHRC ont démarré en 2010 et font l'objet de réunions régulières par les comités de suivi. Un bilan annuel des inclusions est présenté aux membres du CNR lors de la réunion annuelle.

## 4/ ALERTE

### **a) décrire la procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal**

Le Laboratoire Coordonnateur met à disposition ses moyens logistiques et les techniques biologiques nécessaires à l'investigation sur demande des Cire ou de l'InVS en cas de suspicion de cas groupés ou de TIAC. Le Laboratoire Coordonnateur peut mandater un ou plusieurs Laboratoires Supports ou membres du CNR pour participer aux investigations. D'autre part, les Laboratoires du CNR qui repèreraient des cas groupés ou des phénomènes inhabituels (comme des cas avec tableau clinique grave ou souches ou ADN toxoplasmiques de génotype inhabituel de celui observé couramment en France) les signaleraient au Laboratoire Coordonnateur qui en informera l'InVS. Le Laboratoire Associé Pôle Souches serait étroitement associé à ces investigations pour le génotypage des souches responsables de ces cas groupés.

Le Laboratoire Associé Pôle Souches pourrait également lancer l'alerte en cas de dérive des génotypes observés en France. Le Laboratoire Coordonnateur relayerait l'alerte à l'InVS et à tous les membres du CNR de la Toxoplasmose ainsi qu'aux laboratoires du réseau Toxosurv qui prennent part aux diagnostics de la toxoplasmose en France. Le cas échéant une information pourrait être faite vers l'ensemble des LBM effectuant des analyses diagnostiques de la toxoplasmose.

### **b) descriptif des phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année**

- Une alerte a été faite à l'InVS sur une émergence limitée dans le temps d'un clone de *Toxoplasma gondii* de type II (II variant) chez des patients atteints de toxoplasmose fin 2009-début 2010. L'hypothèse d'une contamination liée à la consommation de fruits de mer est émise. Cette information a été retransmise à l'InVS en novembre 2011, sans que l'InVS ne souhaite mener un travail d'investigation sur un seul événement de ce type. Pour l'InVS, si ce même clone avait été retrouvé en 2011, une enquête épidémiologique aurait été menée.

- Aucune TIAC ou épisode de cas groupés n'a été signalé au cours de l'année 2011.

- Un nouveau cas de toxoplasmose sévère acquise par consommation de viande de cheval (originaire d'Argentine) a été observé en 2011. Le patient était peu immunodéprimé (Lupus traité par corticothérapie) et a développé une atteinte systémique (parasite isolé du sang et du LCR) et oculaire (voir Chapitre Activités d'expertise). Ce cas étant le 6ème rapporté après consommation de viande de cheval importé, le CNR et le LNR (Maisons-Alfort) ont interpellé en octobre 2011 la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL, Bureau des Zoonoses et de la Microbiologie Alimentaire) pour mener une enquête exploratoire sur ce type de viande auprès des services impliqués dans les plans de contrôle sur les viandes de cheval importées (de façon réglementaire, 3% des lots importés sont contrôlés pour des analytes différents de la recherche de toxoplasmes). Le LNR devrait récupérer au cours de l'année 2012 des prélèvements des lots contrôlés afin de procéder à la détection du parasite pour estimer la prévalence du portage et essayer de caractériser les souches présentes (analyse génotypique). Un plan de surveillance à plus large échelle devrait être proposé en collaboration avec la DGAL pour l'année 2013.

### **c) analyse des tendances et du fonctionnement du système**

Le système pour gérer des alertes a été éprouvé lors de deux épisodes : en 2008-2009 avec la détection de cas groupés à Montpellier ayant conduit à une enquête menée avec la Cire du Languedoc Roussillon sans identification de la source de contamination (rapport de l'InVS mis en ligne sur le site internet du CNR) puis en 2010 avec l'investigation d'une TIAC avec la Cire Midi-Pyrénées ayant conduit à l'identification de la source de contamination

(viande ovine) (rapport de l'InVS mis en ligne sur le site internet du CNR). Le système pour la gestion des alertes fonctionne bien mais il faut constater que ces alertes sont peu nombreuses et qu'il est très difficile de détecter une TIAC à Toxoplasma du fait du caractère habituellement asymptomatique de l'infection.

## 5/ ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

### 5-1 Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires.

#### CHU Bichat

##### Enseignement :

- Etudes pharmaceutiques, Faculté de Pharmacie Paris Descartes : 4<sup>e</sup> année, 5<sup>e</sup> année
- Bioforma, FCM, Faculté de Pharmacie Paris-Descartes, « Infections et grossesse »,
- DES de Parasitologie, Université de Phnom Penh, Faculté de Pharmacie, Fondation Mérieux,

#### CHU Cochin

##### Enseignement :

Cours « Toxoplasmose » D1, Faculté de médecine Paris Descartes  
DES de Parasitologie Mycologie : Faculté de Pharmacie (Centre Nord) et Faculté de Médecine Paris 5 (Centre Odéon), ED (5h).  
Certificat de Microbiologie, Parasitologie et Maladies Infectieuses : Faculté de Médecine Paris 5, cours (1h) et ED (3h)

#### CHU Dijon

##### Enseignement :

Deuxième cycle (2<sup>eme</sup>, 3<sup>eme</sup>) des Etudes Médicales, Faculté de Médecine, Dijon  
DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie), Dijon  
Cours à l'Ecole de Sages-femmes

##### Formation

Interne en DES niveau 1 ; Thème : Comparaison de différentes techniques d'extraction de l'ADN toxoplasmique dans les échantillons de liquide amniotique.

#### CHU Grenoble

##### Enseignement :

Deuxième cycle (3<sup>eme</sup>, 4<sup>eme</sup>, 5<sup>eme</sup>, 6<sup>eme</sup> années), Etudes Médicales, Faculté de Médecine, Grenoble  
DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie), Grenoble  
UE « diagnostic in vitro ». Master "Ingénierie pour la Santé et le Médicament", Université Joseph Fourier, Grenoble  
UE « Physiopathologie des Maladies Transmissibles », UE Bio 42b, Master Sciences du Vivant, Université Joseph Fourier, Grenoble  
UE « Infectiologie », UE Bio 4416, Master "Sciences du Vivant", Université Joseph Fourier, Grenoble  
UE L2 Biotech, UE Bio 243, école des Biotechnologies, Université Joseph Fourier, Grenoble  
Diplôme d'Université « Thérapeutiques anti-infectieuses », Faculté de Médecine, Grenoble  
EPU aux professionnels de santé (généralistes, biologistes)



## CHU Lille

### Enseignement :

Cours magistraux, TP et ED : DCEM1 et DESS de Parasitologie Mycologie environ 15h.

## CHU Limoges

### Enseignement :

- DCEM 1 Médecine
- DES Parasitologie-Mycologie Médicale

### Formation

Accueil de stagiaires au CNR pôle souches : 2 stagiaires de Serbie venues dans le cadre d'un programme EGIDE mené par le Laboratoire coordonnateur du CNR (Reims, France - Pr Villena) et le Laboratoire National de Référence pour la toxoplasmose en Serbie (Belgrade - Pr Djurkovic).

### Expertise :

Expert auprès de l'ECDC (ML Dardé)  
Expert AFSSAPS (ML Dardé)

## CHU Marseille

### Enseignement :

- DES de Parasitologie et mycologie médicale
- Module de Parasitologie en L2 Licence de santé des Etudes Médicales
- DCEM2, module 7
- M2 : Santé publique, société, développement
- DU de Santé humanitaire
- DU de Biologie moléculaire
- DU de Surveillance épidémiologique

## CHU Montpellier

### Enseignement :

Deuxième cycle (3ème, 4ème, 5ème années) des Etudes Médicales, Faculté de Médecine, Montpellier

DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie), Montpellier

Toxoplasmose et grossesse : Cours magistral et Enseignement Dirigé à l'Ecole de sages-femmes

Toxoplasmose : Cours magistral au DU de Parasitologie et Mycologie en pratique médicale  
Enseignement Module Intégré E: Pédiatrie, Gynécologie-Obstétrique (2<sup>ème</sup> cycle des études médicales) : Prévention, diagnostic et suivi des infections per-placentaires et du per-partum : le bon usage des examens biologiques

### Formation

Toxoplasmose et grossesse : actualités.

Formation BIOFORMA Action agréée N°2011-296 jeudi 1<sup>er</sup> décembre 2011.

### Mémoires et thèses

- Test d'avidité des IgG spécifiques dans le diagnostic de la toxoplasmose : comparaison des techniques Platelia® Biorad et Architect® Abbott.

GENIS Nina, poste d'étudiant de 5<sup>ème</sup> année de Pharmacie demandé dans le cadre du CNR toxoplasmose pôle "Epidémiologie". Mémoire de stage de 5<sup>ème</sup> année de Pharmacie, soutenu en mars 2011.

- Toxoplasmoses congénitales au CHRU de Montpellier de 2006 à 2010 : suivis des mères et des enfants.

DEWALS Lorea. Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Sage-femme, UFR de Médecine de l'Université de Montpellier I, soutenu en mai 2011.

- Master 2 recherche : Mamadou Keita; Thème : Optimisation du diagnostic de la Toxoplasmose par PCR en temps réel : Mise au point d'un contrôle interne d'inhibition de la PCR.

- Poste d'étudiant 5<sup>ème</sup> Année Pharmacie (obtenu dans le cadre du CNR Toxoplasmose) : Meryem Bouazzaoui. Thème : Diagnostic moléculaire de la Toxoplasmose : Etude comparative de la méthode d'extraction manuelle utilisée en routine et d'une méthode automatisée. Mémoire de stage de 5<sup>ème</sup> année de Pharmacie.

- Thèse: Apport du western-blot dans le diagnostic néonatal de la toxoplasmose congénitale. Etude de 146 cas nés entre 2002 et 2009 au CHRU de Montpellier.

RIBOT Jennifer. Thèse Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, soutenue le 27 mai 2011.

### CHU Nice

#### Enseignement :

Cours sur la toxoplasmose aux étudiants en Médecine en DCEM 1.

Cours sur la toxoplasmose aux étudiants en première année de l'Ecole de Sages-femmes.

Diplôme Inter-Universitaire (Nice, Marseille, Montpellier) de Médecine Fœtale.

Toxoplasmose pour le Parasitologue. Toxoplasmose suivi pédiatrique.

Clamart Hôpital Antoine Béchère, Université Paris XI : Cours au DU Pathologies infectieuses de la femme enceinte, du fœtus et du nouveau-né : Toxoplasmose, épidémiologie, cycle parasitaire, diagnostic biologique.

#### Formation :

Formation des Internes en DES de Biologie Médicale.

#### Expertise:

Laboratoire relais ABBOTT. Expertise pour les clients ABBOTT travaillant avec la gamme de produits Toxoplasmose par réalisation d'analyses spécifiques et interprétation des résultats obtenus en cas de difficulté d'interprétation.

### CHU Pitié-Salpêtrière, université Pierre et Marie Curie (Paris 6).

#### Enseignement :

- Master M1 santé, parcours Microbiologie

- DU œil et médecine interne

- DU dermatologie tropicale et infectieuse

- DU médecine des voyages et santé des voyageurs

- Cours de parasitologie en DCEM 1, UPMC

- DES de biologie Parasitologie et de Mycologie médicale.

- FMC « infection et grossesse, Organisée par le département de formation continue – Faculté de Pharmacie Université René Descartes- Paris V et agréée par BIOFORMA

## CHU Saint -Louis, université Diderot

### Enseignement :

- Enseignements de Parasitologie de l'UFR médicale de l'Université Paris Diderot pour les étudiants du 2<sup>e</sup> cycle d'études médicales : cours sur le diagnostic moléculaire des parasitoses et des mycoses
- Unité d'enseignement " diagnostic microbiologique " du master Santé de l'Université Paris Diderot : cours sur le diagnostic immunologique et moléculaire des parasitoses et des mycoses
- Formation des internes : cours + formation pratique à la lecture et à l'interprétation des résultats de biologie moléculaire

## CHU Rouen

### Enseignement :

- Enseignements de Parasitologie de l'UFR Médecine et Pharmacie avec :  
Cours toxoplasmose, DCEM1, Faculté de médecine de Rouen  
Cours toxoplasmose 3<sup>ème</sup> année Pharmacie, Faculté de Pharmacie de Rouen  
Cours toxoplasmose, DUT Evreux  
Cours toxoplasmose Institut de formation en soin infirmier chu Rouen

## CHU Reims

### Enseignement :

- Toxoplasmose et grossesse : Cours magistral et Enseignement Dirigé à l'Ecole de sages-femmes
- Cursus médical (DCEM1-DCEM3) Cours sur la Toxoplasmose
- Formation des Internes en Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale avec Cours « Toxoplasmose » dispensé en commun aux Internes de Amiens, Caen, Reims et Rouen.
- M1 Santé: Mécanismes d'invasion et facteurs de virulence chez *T. gondii*; Physiopathologie des interactions cellules-parasite : exemple des Apicomplexa
- M2 Recherche: Stratégies développées par les parasites pour échapper aux défenses de l'hôte; mécanismes de résistance phénotypiques et génotypiques chez *T. gondii* ; Mécanismes d'invasion et facteurs de virulence chez *T. gondii* (D. Aubert, 6h).

### Formation :

Accueil d'une stagiaire (Dr en Pharmacie) du Burkina Faso pour formation aux techniques sérologiques par agglutination, d'isolement des souches de toxoplasmes et de leur caractérisation moléculaire. Cette étudiante est en cours de thèse d'Université (Université Polytechnique de Bobo Dioulasso) qu'elle effectue en collaboration avec le Pr Villena sur le sujet : Apport du laboratoire dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, néonatale et des patients VIH positifs au centre hospitalier universitaire de Bobo Dioulasso / Burkina Faso.

- Accueil de 2 stagiaires de Serbie venues dans le cadre d'un programme EGIDE mené par le Laboratoire coordonnateur du CNR (Reims, France - Pr Villena) et le Laboratoire National de Référence pour la toxoplasmose en Serbie (Belgrade - Pr Djurkovic).

- Accueil stage de recherche M1 (2 étudiants) et M2 (1étudiant)

### Expertise:

Laboratoire relais ABBOTT. Expertise pour les clients ABBOTT travaillant avec la gamme de produits Toxoplasmose par réalisation d'analyses spécifiques et interprétation des résultats obtenus en cas de difficulté d'interprétation.

Expert AFSSAPS au sein de la commission des diagnostics in vitro (I. Villena)  
Expert ANSES : I. Villena, présidente du Comité d'Expertise Spécialisé Microbiologie  
I. Villena, membre du conseil scientifique et comité éditorial pour les revues Spectra Biologie et Annales de Biologie Clinique.

### CHU Rennes

#### Enseignement :

DES de Biologie Médicale : cours (10 h/an) + formation pratique sur cas cliniques (5 h/mois)  
DCEM1 : TP thématique (7 h/an)  
Master 1 (Rennes), UE « Microbiologie fondamentale et Santé : bases expérimentales de la virulence des agents infectieux » (2h).  
Master 1 (Brest), UE « Parasitologie et Mycologie fondamentales et appliquées » (2h)  
Master 2 (Rennes) Domaine « Science, technologie, Santé » mention Biologie, (UE « Interactions cellulaires et moléculaires hôte-pathogène ») (2h)

### CHU Strasbourg

#### Enseignement :

Diplôme Universitaire de Pathologie Tropicale de l'ULP  
Module de Parasitologie en DCEM1  
Module de Maladie Infectieuse en DCEM 2  
Master Vie et Santé, spécialité Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire  
Module optionnel de « Stratégie des examens de laboratoire »  
Externes en médecine et en pharmacie en stage de laboratoire : charge d'encadrement estimée à 20 heures annuelles sur la toxoplasmose,  
DCEM1 et 2 : 4 heures  
DES de Biologie médicale (charge d'encadrement et de formation intégrée estimée à 160 heures annuelles en toxoplasmose)  
Cours à l'École de Sages-Femmes : 2 heures  
Bio Format et FMC de l'ULP  
Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement  
UFR d'Odontologie

### CHU Toulouse

#### Enseignement :

Cours magistraux Ecole de Sages-femmes Toulouse  
Cours magistraux et Enseignement Dirigé au DES de Biologie Médicale  
Cours magistraux et enseignement dirigé DCEM1 UPS, Facultés de Toulouse Purpan et Toulouse Rangueil  
Cours M1 « Physiopathologie des infections »  
Cours M2 Pro « Diagnostics Microbiologiques »

#### Formation :

Thèse :

Réactivation de la toxoplasmose chez les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques, Thèse de Biologie médicale, soutenue par Jérôme Laugé

Formation continue par l'élaboration de dossiers scientifiques au sein du Bureau de la Revue francophone des laboratoires.

Système de formation continue des biologistes pour la toxoplasmose par l'intermédiaire du Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique (CTCB).

### Expertise:

Laboratoire relais ABBOTT. Expertise pour les clients ABBOTT travaillant avec la gamme de produits Toxoplasmose par réalisation d'analyses spécifiques et interprétation des résultats obtenus en cas de difficulté d'interprétation.

### 5-2 Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

#### **a) Guide concernant la sérologie toxoplasmique :**

- Un guide d'interprétation des sérologies toxoplasmique a été élaboré par les membres du CNR sous forme d'un article (Feuillets de Biologie, 2011, voir Annexe Publications) et de logigrammes à destination des laboratoires de Biologie Médicale qui sont en charge du diagnostic sérologique de la toxoplasmose et ce guide est accessible sur le site du CNR toxoplasmose.
- Une évaluation des réactifs d'agglutination a été menée et les résultats sont publiés dans le Diagnostic Microbiology and Infections Disease (2012, sous presse)  
Les résultats de l'évaluation des réactifs de détermination de l'avidité des IgG toxoplasmique ont donné également lieu à une publication soumise à Journal of Clinical Microbiology en 2012.
- Des logigrammes consensuels de prise en charge technique lors de situations cliniques particulières telles que la suspicion d'une toxoplasmose oculaire, la suspicion d'une toxoplasmose congénitale et le cas du sujet immunodéprimé ont été établis pour harmoniser notre pratique au sein des laboratoires experts et ont été diffusés à l'ensemble des membres du CNR par le biais du rapport annuel.
- De même le groupe de travail du pôle de sérologie a défini des conduites à tenir pratiques et techniques dans certaines situations techniques délicates rencontrées dans les laboratoires experts.

#### **b) Guide concernant la pratique de la Biologie Moléculaire :**

- Un premier volet de recommandations sur le diagnostic de la toxoplasmose congénitale par biologie moléculaire, adressé aux professionnels de santé, a été rédigé par le Pôle Biologie moléculaire (D. Filisetti, L-S de Strasbourg, M.P. Brenier-Pinchart, L-S de Grenoble, Y. Sterkers et P. Bastien, L-A Montpellier) avec la participation de I. Villena. Il attire l'attention sur les difficultés et l'interprétation de ce diagnostic et fait le point sur la conduite à tenir recommandée en cas de diagnostic positif ou négatif. Ces recommandations concernent le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, mais il est envisagé dans les années suivantes de les élargir à la toxoplasmose de l'immuno-déprimé. Après validation par l'ensemble du réseau, ce document a été mis en ligne sur le site du CNR.
- Un deuxième volet de recommandations a été abordé ; il s'adresse aux biologistes amenés à réaliser ce diagnostic moléculaire, et doit porter sur les aspects pratiques et techniques. Un document a été réalisé en 2011 sur l'intérêt de l'examen du placenta pour le diagnostic de toxoplasmose congénitale et les pratiques et techniques concernant ce diagnostic (L. Delhaes, L-S de Lille, M.P. Brenier-Pinchart, L-S de Grenoble, D. Filisetti, L-S de Strasbourg, et P. Bastien, L-A Montpellier, avec la participation de I. Villena).
- Le CQE national annuel s'accompagne d'un questionnaire à propos des pratiques et techniques du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose congénitale. Le rendu des résultats a été l'occasion de diffuser les résultats de cette enquête, ainsi que ceux de l'ensemble du CQE.
- L'enquête extrêmement détaillée réalisée en 2007 et abordant tous les aspects du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en prénatal et néonatal (pratiques pré-analytiques et analytiques, méthodes d'extraction, nombre de réactions nécessaires pour le DPN, utilisation des témoins négatifs et positifs, mesures de prévention des contaminations etc.) a été analysée, et les données de cette enquête ont fait l'objet d'un retour d'information à tous les participants en 2011. Les données de cette enquête n'avaient pas été diffusées en raison de l'extrême diversité observée entre les méthodes et de la complexité de l'analyse qui

devait en être faite, et de la difficulté de pouvoir tirer des conclusions à partir de ces données. Elle sert toutefois de référence en ce qui concerne l'évolution et la diversité de ces méthodes pour la définition d'axes de travail concernant la standardisation.

### 5-3 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR :

#### **a) Rétro-information aux partenaires :**

- Une réunion annuelle a lieu chaque année conviant l'ensemble des membres du CNR pour présenter le bilan de l'activité de chacun des Pôles et les perspectives de l'année suivante, cette réunion est l'occasion d'une discussion entre tous les membres du CNR. Elle s'est déroulée le 20.10.2011 à Paris. Le Laboratoire Coordonnateur envoie (par courriel) le compte-rendu de cette réunion ainsi que toutes les présentations effectuées à tous les membres du CNR.

- Il envoie également le rapport d'analyse de la surveillance des toxoplasmoses congénitales en France à tous les membres du CNR et ceux du réseau Toxosurv (incluant l'ensemble des laboratoires correspondants participant à cette surveillance), une fois ce rapport validé avec l'InVS (cette validation a lieu au cours d'une réunion à l'Invs en présence des membres du comité de pilotage de Toxosurv, réunion le 21 novembre 2011).

- Le Pôle souches envoie le compte-rendu individuel du résultat du génotypage pour chaque isolat (souche ou ADN) adressé au CNR ainsi qu'un bilan par listing Excel à chaque nouvel envoi de souches. Les membres adressant des isolats sont associés comme co-auteurs ou remerciements dans les publications du CNR pôle souches.

- Le Pôle Biologie Moléculaire diffuse les résultats des enquêtes menées :

- CQE national annuel et enquête associée : L'enquête annuelle associée au Contrôle de Qualité national en biologie moléculaire a fait l'objet d'un retour détaillé aux participants par voie de courriel.

- Liste détaillée des techniques utilisées par l'ensemble du réseau (de façon à définir des référents pour telle ou telle technique) : diffusion par courriel à tous les participants.

- Analyse des données de l'enquête de 2007 : L'enquête extrêmement détaillée réalisée en 2007, abordant tous les aspects du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose en prénatal et néonatal (pratiques pré-analytiques et analytiques, méthodes d'extraction, nombre de réactions nécessaires pour le DPN, utilisation des témoins négatifs et positifs, mesures de prévention des contaminations etc.) a enfin été analysée en profondeur et cette analyse a fait l'objet en 2011 d'un retour d'information à tous les participants. Cette enquête sert de référence en ce qui concerne l'évolution et la diversité de ces méthodes pour la définition d'axes de travail concernant la standardisation.

#### **b) Diffusion aux professionnels : conférences, Site web**

- Des conférences sont faites par différents membres du CNR lorsqu'ils sont sollicités, ils sont souvent les référents régionaux en matière de diagnostic et de recherche sur la toxoplasmose (voir paragraphe formation et communications).

- Un site internet du CNR a été créé dès la mise en place du CNR (2007) par le Laboratoire Coordonnateur ([http://www.chu-reims.fr/CNR toxoplasmose](http://www.chu-reims.fr/CNR_toxoplasmose)), il est commun à l'ensemble des Laboratoires Associés du CNR Toxoplasmose. Ce site est hébergé par le CHU de Reims et la maintenance est assurée par la direction des services informatiques (DSIT) avec sécurisation des données. Ce site assure la présentation du CNR (organigramme, missions), la diffusion de documents validés par les membres du réseau du CNR (guides d'interprétation, articles publiés par le CNR), les rapports annuels d'activités sont mis en ligne sur le site Internet une fois validés par l'InVS. Des données synthétiques sur la

surveillance de la toxoplasmose congénitale sont mises à jour chaque année, le choix de ces données a été fait en collaboration entre le CNR et l'InVS.

Données disponibles sur le web :

- 1/ définition des cas + réseau Toxosurv
- 2/ nombre de déclaration de TC pour 12 mois et lien BEH
- 3/ indicateurs remarquable : x cas /1000 naissances (calcul selon le nombre de naissances)
- 4/ carte correspondant à la répartition par région
- 5/ Nombre de cas de TC selon le terme de la grossesse lors de l'infection maternelle (diagramme)
- 6/ Nombre de TC selon âge des mères accouchant en France (ratio TC/ Nombre accouchements)
- 7/ Logigramme récapitulatif des cas

Pour répondre à une demande de nombreux laboratoires d'analyses français ou de professionnels de santé (gynécologues obstétriciens en particulier), une liste des techniques de diagnostic sérologique et moléculaire de la toxoplasmose ainsi que des responsables au sein des laboratoires experts du CNR a été élaborée et est disponible sur le site internet du CNR , cette liste a été mise à jour le 01.10.2011.

Afin de déposer sur le site des documents spécialisés réservés aux professionnels de santé, la configuration du site sera revue en 2012 avec mise en place d'un accès réservé. Une version du site sera également traduite en anglais pour accroître sa visibilité.

Un lien vers le site de l'InVS est fonctionnel. Un site web pour le CRB Toxoplasma a été créé en 2008 par le Laboratoire Coordonateur (<http://www.crb.toxo.com>), ce site présente un lien avec le CNR pôle souches.

#### 5-4 Activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)

Le CNR est organisé pour réceptionner tout mail relatif à la surveillance des toxoplasmoses congénitales par la mise en place d'une adresse spécifique ([toxosurv@chu-reims.fr](mailto:toxosurv@chu-reims.fr)) avec réception par I Villena (responsable), T Ancelle (Pôle Epidémiologie) et C Delmas (ARC du CNR); tous les trois visualisent ainsi les messages (qui sont archivés par l'ARC) et répondent aux questions relatives au fonctionnement du système.

En 2011, cette adresse a géré 200 demandes d'information.

Chaque membre du CNR est amené à répondre individuellement pour des avis en matière de diagnostic ou de traitement lorsqu'il est sollicité, ils sont souvent les référents régionaux pour cette affection et à ce titre reçoivent des appels de professionnels de santé ou patients.

#### 5-5 Liste des activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

Expert AFSSAPS: ML Dardé, I. Villena

Expert ANSES: I. Villena, présidente du Comité d'Expertise Spécialisé Microbiologie et co-directeur USC Epitoxo avec P Boireau (LNR Maisons Alfort)

Expert ECDC: ML Dardé

Plusieurs membres du CNR continuent d'être impliqués dans un travail de fond réalisé pour la DHOS concernant les cotations des actes de biologie dans la nomenclature et hors-nomenclature pour la toxoplasmose. Tous les aspects du diagnostic sont considérés (sérologique, moléculaire, inoculation à la souris).

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

### 6-1 Pôle Épidémiologie :

Le Laboratoire Coordonnateur centre ses thématiques de recherche au sein d'une équipe de recherche labellisée par le Ministère (EA3800, Pr Villena) depuis 2006 avec renouvellement en 2011 sur la thématique: «Protozoaires transmis pas l'alimentation: biodiversité et pathogénie», selon une déclinaison en deux volets d'étude :

#### **a) Etude de la circulation dans l'environnement des protozoaires pathogènes (incluant *T. gondii*) pour l'homme à transmission alimentaire/hydrique.**

- Le rapport AFSSA (2005) avait identifié plusieurs domaines d'investigation prioritaires afin d'acquérir les données manquantes pour la réalisation d'une appréciation quantitative du risque de la toxoplasmose liée à l'alimentation. Nous avons participé en collaboration avec le LNR « Parasites transmis par l'alimentation » de l'ANSES à différentes enquêtes épidémiologiques sur les animaux de rente. Nous poursuivrons l'étude des modes de contaminations concernant les viandes de cheval, de porc et d'ovins pour mieux caractériser le risque de contamination humaine. Ainsi, une étude de la mise en évidence et de la caractérisation de *T. gondii* dans des tissus ovins infectés naturellement et expérimentalement a été menée (Thomas M, Anses, Master 2). Ces programmes se déroulent au sein de l'USC Epitoxo (unité de recherche en association avec le LNR, Anses, Maisons-Alfort).

- L'étude de la contamination d'autres matrices alimentaires par *T. gondii* est réalisée dans le cadre d'un programme ANR (Alia, Protofood 2010-2013) en complément de celle d'autres protozoaires les plus fréquemment impliqués dans les infections alimentaires (*Cryptosporidium* spp. *Giardia duodenalis*). Les objectifs sont de i) mettre en place une stratégie globale permettant d'extraire ces parasites de mollusques bivalves et de végétaux, de détecter et de caractériser les trois pathogènes ii) mieux appréhender les modalités de contamination des aliments, en étudiant les mécanismes de bioaccumulation et de dépuration des mollusques et la persistance de ces parasites à la surface de matrices végétales; iii) de caractériser l'impact de la cuisson domestique sur la viabilité de ces parasites. Ce programme implique de nombreux partenaires académiques dont certains membres du CNR de la Toxoplasmose (équipe de Rouen et Lille), avec une thèse en cours (Hohweyer J, 2010-2012).

- La partie relative à l'étude de la contamination du sol et à la circulation des oocystes a été étudiée dans le cadre de deux thèses (Afonso E, 2007 et Lelu M, 2010) réalisées avec le soutien d'un programme AFSSET 2006-2009 (Dynamique environnementale de *Toxoplasma gondii*), ces travaux ont permis l'optimisation des méthodes de détection des oocystes de *T. gondii* dans le sol. La dynamique de la contamination environnementale par *T. gondii* sera documentée par une étude plus large de la circulation de la forme oocyste de *T. gondii* dans le sol et l'eau et la contamination des micro-mammifères qui en découlent (Programme AFSSET/ADEME 2010-2013, Thèse Gotteland C et Forin-Viard MA en cours ). L'équipe de Limoges (Pr Dardé) collabore également à ces programmes de recherche.

#### **b) Pathogénicité de *Toxoplasma gondii***

- Nous étudions l'implication d'une ou de protéase(s) parasite(s) dans la pathogénicité de *T. gondii*. La capacité de ce parasite à traverser la matrice extra-cellulaire sera documentée



par l'étude de la régulation de métalloprotéinases matricielles dans un modèle in vitro de cellules monocytaires infestées par *T. gondii* dans le cadre d'un projet Contrat Plan Etat Région (CPER) Champagne-Ardenne 2009-2013 intitulé « Métalloprotéases toxoplasmiques : de la caractérisation à la synthèse d'inhibiteurs sélectifs » au cours d'une thèse d'Université (Bouleau AP, 2011-2013). Une protéase a été identifiée au cours de précédents travaux (thèse Buache, 2007), elle est en cours de purification et caractérisation (par substrats synthétiques et sensibilité aux inhibiteurs), son implication dans l'invasion de *T. gondii* sera recherchée en modèle in vitro, et des inhibiteurs sélectifs seront réalisés par des équipes de Biochimie de la SFR CAP-SANTE (Universités Reims/Amiens) en collaboration sur ce projet.

- Un autre aspect de la pathogénicité réside dans la résistance des souches de *T. gondii* aux anti-toxoplasmiques. Après avoir démontré l'existence de résistances à la sulfadiazine, nous n'avons pas observé, pour les deux cibles thérapeutiques (DHFR et DHPS) et les ABC transporteurs toxoplasmiques explorés, de lien entre résistance et surexpression ou polymorphisme. L'utilisation de la cytométrie en flux pour visualiser la fonctionnalité des ABC a mis en évidence une augmentation de l'efflux de substrats fluorescents liés à l'activité des P Glycoprotéines (famille des ABC) dans les souches résistantes. Afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la résistance aux sulfamides, la ou les protéines impliquées dans la résistance chez *T. gondii* sont caractérisées en étudiant les différences entre profils protéiques des souches sensibles et résistantes (thèse d'Université Doliwa C, 2009-2012). Ce travail se déroule en collaboration avec le Pr Wastling (Université Liverpool) et le Pr Schaeffer (Strasbourg). Pour confirmer l'implication des protéines identifiées par analyse protéomique (publication en cours), une souche de type I et une souche de type II ont été poussées en résistance par pression médicamenteuse avec des doses croissantes de sulfadiazine. Ces souches sont également analysées par protéomique et comparées aux souches trouvées naturellement résistantes.

Un certain nombre de protéines ont été identifiées (confirmation en cours).

## 6-2 Pôle Souches:

### **a) Structuration spatiale des génotypes de *Toxoplasma gondii***

Objectif : comprendre la circulation du parasite à travers la distribution spatiale des génotypes des souches de toxoplasmose congénitale en France.

Partenariat :

Sébastien Devillard - UMR CNRS 5558, laboratoire de biométrie et biologie évolutive de Lyon

Etat d'avancement : analyse en cours

Il n'apparaît pas de structure spatiale de la distribution des génotypes à l'échelle de la France. Cependant une structuration apparaît au niveau régional, dans la région des Pays de Loire posant le problème d'une éventuelle source différente de contamination entre la Vendée et les régions de Nantes et St Nazaire.

### **b) Isolement et génotypage des toxoplasmes de la viande de cheval importée**

Objectif : évaluer le risque de la consommation de viande de cheval

Travail de thèse débuté en octobre 2011.

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. Aizenberg , 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 : Couppie Pierre :
- Centre d'Information et de Soins de l'Immunodeficiency Humaine de Cayenne: Nacher Mathieu
- Laboratoire de Parasitologie / Mycologie : Carne Bernard (CNR pôle épidémiologie)

Centre Hospitalier de l'Ouest guyanais, Guyane française

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

Etat d'avancement :

Inclusions terminées en 2011. Exploitation en cours en 2012.

### 6-3 Pôle Sérologie:

Une nouvelle unité de recherche intitulée "dynamique des interactions hôtes pathogènes" (DHPI) est localisée à l'Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale (IPPTS), siège du pôle Sérologie du CNR. Le laboratoire DHPI se compose de deux équipes ayant la même thématique de recherche : l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant la latence des pathogènes intracellulaires. Les équipes se consacrent plus particulièrement à l'étude des mécanismes transcriptionnels et épigénétiques régissant la latence du VIH-1 (équipe 1) et de *Toxoplasma gondii* (équipe 2). Ces deux pathogènes ont la particularité de former des réservoirs cellulaires et anatomiques infectés de manière latente contre lesquels les stratégies thérapeutiques actuelles sont inefficaces. Comprendre les mécanismes à l'origine du contrôle, par les facteurs cellulaires, de l'expression des pathogènes permettra donc d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans un objectif d'éradication du pathogène et de guérison du patient.

Pour la partie liée à l'étude physiopathologique de la toxoplasmose, nous nous sommes focalisé sur la toxoplasmose oculaire liée à la toxoplasmose congénitale ou acquise. Nous avons mis en place un réseau français et international d'étude sur la toxoplasmose oculaire et sur l'influence de la virulence des souches de *Toxoplasma* dans le déroulement clinique de l'affection. Ces projets sont financés par un PHRC et ECOS-Nord. Ce travail de recherche clinique s'est en partie forgé sur le CNR tant par les laboratoires qui le composent que par les techniques et les schémas d'interprétation de cette affection (voir documents en annexe). D'un point de vue plus fondamental il reprend les données acquises par le pôle épidémiologie et le CRB *Toxoplasma* sur la virulence des souches pour orienter ses travaux. Les premiers résultats indiquent que les souches les plus virulentes, par exemple celle d'origine sud-américaine, sont responsables d'affection oculaires graves, fortement inflammatoire, et qu'elles ont la capacité à modifier le cours de la réponse immune et inflammatoire en modulant des cytokines importante pour la résistance de l'hôte (voir la bibliographie jointe en annexe et tout particulièrement l'article de Sauer et al., (Prevention of

Retinochoroiditis in Congenital Toxoplasmosis: Europe Versus South America. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Feb 18 2011) ainsi que la communication orale de Pfaff AW et al. (Strain-dependent inflammatory response in ocular toxoplasmosis. 11th International Congress on Toxoplasmosis. 25-29 June 2011 ; Ottawa, Canada.)

#### 6-4 Pôle Biologie moléculaire:

##### Tous les laboratoires du Pôle :

- Participation au PHRC National TOXOGEST : Toxoplasmose congénitale. Investigateur principal: L. Mandelbrot, Paris.
- Participation au PHRC national TOSCANE : Etude multicentrique, randomisée de non infériorité de deux stratégies thérapeutiques chez des enfants atteints de toxoplasmose congénitale. Investigateur principal: Pr. JB Gouyon, Dijon.

##### Grenoble

- Participation au PHRC National : Infections oculaires graves (PHRC 3964). Investigateur principal: T. Bourcier, Strasbourg. Investigateurs à Grenoble: Ophtalmologie et Parasitologie –Mycologie du CHU de Grenoble
- Projet BIOLUVE : Etude des HSP et toxoplasmose oculaire. Investigateur principal: Parasitologie –Mycologie et DRCI du CHU de Grenoble
- Recherche fondamentale :
  - Implication de la protéine P43 de *T. gondii* dans la pathogénicité du parasite et évaluation de son rôle potentiel comme cible thérapeutique
  - Etude in vitro et in vivo des microRNA au cours de l'infection par *T. gondii*

##### Montpellier

- Etude rétrospective portant sur l'intérêt de la prise de sang chez le nouveau-né pour le diagnostic d'infections toxoplasmiques tardives passées inaperçues (Sterkers et al., *DMID* 2011, 71:174-6).

##### Rennes

Etude clinique sur le dosage du HLA-G soluble et de cytokines inflammatoires dans des liquides amniotiques (LA) : des taux significativement plus élevés de sHLA-G ont été retrouvés dans des liquides amniotiques issus de fœtus avec toxoplasmose congénitale, comparés à des LA de fœtus non atteints. Ces résultats nous amènent à émettre des hypothèses physiopathologiques sur le rôle du HLA-G comme immunomodulateur dans la toxoplasmose congénitale

## 7/ LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Voir Annexe 6:

- Publications nationales
- Publications internationales
- Communications nationales
- Communications internationales
- Conférences sur invitations

Souligner les noms des auteurs appartenant au CNR.

## 8/ PROGRAMME D'ACTIVITE N+1

### 8-1 Perspectives du Pôle Epidémiologie:

- La surveillance de la toxoplasmose congénitale en France se poursuivra en 2012 avec le même système de recueil des cas diagnostiqués et notifiés par le réseau de laboratoires Toxosurv. L'analyse des résultats sera toujours conduite par le Laboratoire Coordonnateur (I. Villena, ARC du CNR) et le pôle Epidémiologie (T. Ancelle).

Avec le recul de 5 ans des données du système de surveillance des toxoplasmoses congénitales ; le Laboratoire Coordonnateur aidé par les Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie évalueront les pratiques du diagnostic biologique de cette affection (valeur des différentes techniques proposées dans le diagnostic anténatal et postnatal de la toxoplasmose congénitale). Cette évaluation permettra d'obtenir les sensibilités de chacune des analyses biologiques proposées et le poids respectif qu'elles occupent dans le diagnostic (analyses couramment ou peu pratiquées pour le diagnostic). Ceci pourra permettre d'émettre des recommandations quant à l'usage de ces pratiques diagnostiques. Ces résultats seront d'abord présentés et discutés avec les membres du CNR (réunion annuelle du CNR en 2012) puis avec l'InVS (et le Comité de Pilotage « Toxosurv » lors de la réunion de validation en fin d'année 2012).

- En 2012, le Laboratoire Coordonnateur avec l'aide des Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie, envisage de conduire une nouvelle enquête auprès des LBM identifiés en 2006 pour savoir s'ils transmettent bien leurs cas suspects de toxoplasmoses congénitales vers les laboratoires spécialisés et auprès des laboratoires du réseau Toxosurv n'ayant jamais notifié de cas depuis 2006 pour en connaître les raisons (absence réelle de cas diagnostiqué ou transmission vers des laboratoires spécialisés pour confirmation du diagnostic qui est donc notifié par le laboratoire expert avec absence de notification de leur part). Ces enquêtes seront faites afin de s'assurer de l'exhaustivité du recueil, elles paraissent nécessaires si la diminution du nombre de cas constatée en 2010 se poursuivait en 2011.

- Pour actualiser les données épidémiologiques de la toxoplasmose en France, le CNR pourra participer à des études sur demande spécifique de l'InVS, en mettant à disposition ses capacités techniques (études sérologiques par exemple) ou en contribuant à l'estimation du nombre de séroconversions grâce aux données de surveillance acquises depuis 5 ans (travail de l'InVS en collaboration avec le CNR).

- En outre, le Laboratoire Coordonnateur avec l'aide des Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie et en coordination avec le Pôle Biologie Moléculaire, proposera une enquête ponctuelle à tous les laboratoires membres du CNR sur le recensement des toxoplasmoses diagnostiqués chez les patients immunodéprimés. Pour cela un questionnaire avec recueil des données épidémiologiques, des données du diagnostic clinique (toxoplasmose cérébrale, oculaire ou disséminée) et du diagnostic biologique, sera préalablement élaboré avec le Pôle Biologie Moléculaire et soumis à l'InVS pour validation. Cette enquête visera à compléter les données du CapiDc-Inserm et les données recueillies dans le DMI2 (système d'information des centres d'information et de soins sur l'immunodéficience humaine) pour les sujets VIH positifs.

Le Laboratoire Coordonnateur en lien avec le Service Informatique du CHU de Reims va développer son site internet : afin de déposer sur le site des documents spécialisés réservés aux professionnels de santé, la configuration du site sera revue en 2012 avec mise en place d'un accès réservé. Une version du site sera également traduite en anglais pour accroître sa visibilité.

#### 8-2 Perspectives du Pôle souches:

- Démarche d'accréditation du pôle souche du CNR dans le cadre de l'accréditation COFRAC selon la norme 15189.
- Validation des techniques de congélation des souches
- Evaluation de l'impact du génotype sur l'évolution à 5 ans des cas de toxoplasmose congénitale
- Bilan de validation des techniques d'études de la chimiosensibilité

#### 8-3 Perspectives du Pôle Sérologie:

- Poursuite des évaluations des trousse immuno-enzymatiques automatisées pour les IgG et IgM sur les panels plus discriminants :
  - IgG/IgM Biorad/Platelia®
  - IgG/IgM Diasorin/Liaison®
  - IgG/IgM Abbott/Architect®
  - IgG/IgM Roche/Elecsys®
  - IgG/IgM Siemens/Advia Centaur®
  - IgG/IgM Beckmann Coulter/Access®
- Publications prévues :
  - o Séroconversions sans IgM ou IgM fugaces
  - o article sur les réactifs d'avidité sur le site du CNR
  - o modalités de prise en charge des sérums en fonction des problèmes techniques (à destination des laboratoires experts) et des situations cliniques rencontrées à destination de l'ensemble des LABM.

#### 8-4 Perspectives du Pôle Biologie Moléculaire:

##### **1. Elaboration et distribution de matériel biologique de référence.**

Des échantillons lyophilisés à concentration élevée ont été distribués à l'ensemble du réseau du CNR dans le triple but de (i) s'auto-évaluer à l'aide de gammes réalisées selon un protocole dicté; (ii) servir de calibrateur aux gammes de quantification en PCR en temps réel et (iii) homogénéiser la quantification des charges parasitaires en France. Les laboratoires du réseau seront contactés individuellement afin d'évaluer l'intérêt retiré de la distribution de ces échantillons et le suivi des protocoles recommandés.

Par ailleurs, il devient indispensable d'élargir la matrice d'échantillons aux autres milieux biologiques les plus fréquemment rencontrés dans le diagnostic des toxoplasmoses et, donc, de reproduire un tel matériel parasite à partir de sang total, de couche leucocytoplaquettaire, voire de placenta. Cette étape est plus délicate que la première mais bénéficiera du savoir-faire acquis dans les 5 dernières années. Elle permettra d'aborder la question de l'homogénéisation des performances du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose à la naissance et chez l'immunodéprimé, au niveau national.

##### **2. Contrôle de Qualité national en DPN de la toxoplasmose.**

Cette action sera bien entendu poursuivie. Les faibles concentrations continueront à être privilégiées 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) continueront d'être incluses afin de se rapprocher davantage des conditions rencontrées en routine.

Deux CQE seront organisés cette année en France.

##### **3. Gammes de quantification "standard".**

Une variante du contrôle de qualité, citée plus haut, est également proposée. Elle consiste en des concentrations plus fortes destinées à être extraites puis diluées par les laboratoires

eux-mêmes selon un protocole d'utilisation imposé, ceux-ci devenant autonomes dans une démarche d'auto-évaluation.

#### **4. Témoins positifs d'inhibition de la PCR.**

De nombreuses molécules présentes dans les échantillons biologiques (surtout sanguins et tissulaires) peuvent conduire à une inhibition de la PCR. Celle-ci, si elle n'est pas détectée, peut entraîner le rendu de résultats faussement négatifs. La réflexion et les études entamées par le GdT en 2011 sur ce sujet seront poursuivies en 2012-2013 ; à la suite de cela, les témoins positifs considérés comme les plus pertinents devraient pouvoir être proposés au réseau comme témoins "standard".

#### **5. Homogénéisation des performances des méthodes.**

Un "seuil" minimal de sensibilité a été fixé par consensus dans le groupe de travail en 2010 et diffusé en 2011 au niveau national. Comme dit plus haut, ce seuil est un premier pas important mais n'est pas tout à fait satisfaisant : (i) il a été défini à 0,5 génomes de parasite, mais, pour des raisons techniques, par prise d'essai et non en parasites par mL ; (ii) il pourrait en réalité s'avérer trop élevé.

En conséquence : (i) Les laboratoires du réseau seront contactés afin de vérifier si leur auto-évaluation a été correctement réalisée et, éventuellement, satisfaisante. (ii) Le seuil actuel sera re-défini en Toxoplasmes /mL au sein du groupe de travail grâce à des expériences complémentaires. (iii) Un seuil plus fin sera travaillé avec le groupe de travail, puis à nouveau diffusé au niveau national.

#### **6. Comparaison multicentrique de méthodes d'extraction d'ADN.**

Ces études restent rares en raison de la lourdeur de leur organisation.

L'étude comparative multicentrique réalisée fin 2011-début 2012 sur différentes méthodes d'extraction de l'ADN de Toxoplasme à partir du liquide amniotique (coordonnateur = Laboratoire-support de Dijon) et comparant une méthode manuelle et cinq méthodes automatisées sera analysée et ses résultats seront diffusés à l'ensemble de la communauté.

#### **7. Intérêt de l'utilisation du sang total versus couche leucocyto-plaquettaire dans le diagnostic de la toxoplasmose chez l'immunodéprimé.**

La question du diagnostic de la toxoplasmose chez l'immuno-déprimé, lui aussi basé essentiellement sur la biologie moléculaire, devient un souci croissant dans les CHU. L'influence de la matrice utilisée pour ce diagnostic moléculaire sur sa sensibilité est essentielle. Cette question sera abordée par des études in vitro utilisant des échantillons artificiels ainsi que sur des modèles animaux dans des unités de recherche associées au CNR.

#### **8. Recommandations et standardisation des pratiques.**

La rédaction de recommandations concernant le "Diagnostic Moléculaire de la Toxoplasmose" sur le site Internet du CNR 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.

Le Pôle souhaite établir des recommandations "techniques" plus poussées, destinées aux laboratoires spécialisés, visant à une homogénéisation des méthodes de diagnostic par PCR. La stratégie adoptée est de sub-diviser ces recommandations en un nombre maximum de points précis et de rédiger les différents items point par point. Il est important de savoir que plus de 60 paramètres ont été identifiés par le L-A comme intervenant dans la performance de la PCR en temps réel, et ce indépendamment (i) de la méthode d'extraction qui rajoute au moins une inconnue supplémentaire, et (ii) des pratiques pré-analytiques, dont les nombreuses variantes ne reposent sur aucune base scientifique. Il est impossible d'évaluer, de comparer et de fournir des recommandations sur l'ensemble de ces paramètres.

Des sous-groupes de travail ont été définis pour 2012 afin d'établir des recommandations sur les points suivants : examen du sang de cordon, conditions d'acheminement des échantillons, inoculation à la souris, PCR-Toxoplasma chez l'immuno-déprimé. Chaque point rédigé et approuvé par le groupe de travail puis par le CNR pourrait faire l'objet d'une page ou d'un document posté sur le site Internet du CNR.