

**Rapport annuel d'activités
Du Centre National de
Référence de la
Toxoplasmose**

2013

**Année d'exercice
2012**

SOMMAIRE

Résumé analytique	4
1- Mission – Organisation du CNR	
1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés	7
1.2 Description détaillée de l'équipe	7
1.3 Description détaillée des locaux et de l'équipement	7
1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification	7
2- Activités d'expertise	
2.1. Capacités techniques du CNR	10
2.2 : Activités d'expertises de l'année 2012	10
2.2.1 Expertise apportée par le Pôle Souches	10
a) Nombre de souches ou prélèvements	
b) Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats	
c) Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué	
d) Analyse de l'évolution des tendances en termes d'activités	
2.2.2 Expertise apportée par le Pôle Sérologie	13
2.2.3 Expertise apportée par le Pôle Biologie Moléculaire	13
3.1 Expertise en matière de techniques et réactifs	14
3.2 Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la toxoplasmose	16
3.3 Enquête sur les pratiques et les méthodes utilisées en diagnostic moléculaire	16
3- Activités de surveillance	
3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	17
a) Réseau de partenaires	
b) Définition de l'échantillon de souches isolées	
c) Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents	
d) Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS	
e) Décrire les collaborations avec des réseaux ou partenaires nationaux	
3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	25
a) Définition de l'échantillon de souches testées	
b) Définitions utilisées pour exprimer la résistance	
c) Résultats : distribution en fonction des critères pertinents	

3.3 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux	25
3.4 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens	27
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	27
4. Alerte	30
a) Procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal, les événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année	
b) Descriptif des phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année pour la réactovigilance	
5- Activités d'information, de formation et de conseil	
a) Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires	31
b) Guides élaborés	37
1- Guide concernant la sérologie toxoplasmique	
2- Guide concernant la pratique de la biologie moléculaire	
c) Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR	37
1- Rétro-information aux partenaires	
2- Diffusion aux professionnels	
d) Activités de conseil aux professionnels	39
e) Activités d'expertises	40
6- Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	
6a : Activités de recherche	41
6a- 1 : Pôle Epidémiologie	
6a- 2 : Pole Souche	
6a-3 : Pole Sérologie	
6a-a : Pôle Biologie Moléculaire	
6b : Publications et communications	45
i) Publications nationales	
ii) Publications internationales	
iii) Communications nationales	
iv) Communications internationales	
v) Conférences sur invitations	
vi) Ouvrage	
7- Programme d'activité N+1 et N+2	
7.1 Perspectives du Pôle Epidémiologie	51
7.2 Perspectives du Pôle Souches	52
7.3 Perspectives du Pôle Sérologie	52
7.4 Perspectives du Pôle Biologie Moléculaire	53

Résumé analytique

Présenter, sous forme résumée, les enjeux de santé publique et les axes majeurs de la mission du CNR, les faits marquants, points clefs, et les principaux résultats de l'année 2012 contribuant à la surveillance et à l'alerte.

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. Il a été renouvelé en 2012 pour une durée de 5 ans.

Les principaux objectifs sont une meilleure connaissance épidémiologique de cette maladie en France et une évaluation des pratiques de diagnostic pour tendre à une meilleure standardisation de la prise en charge des patients. Pour répondre à ces objectifs, le CNR, 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. Une réunion annuelle permet aux Laboratoires Coordonnateur et Associés de présenter les résultats de l'année écoulée et de discuter des actions à mener pour l'année à venir ; pour l'année 2012 la réunion s'est tenue le 25 octobre à Paris.

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 20 et 55%, 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, estimée actuellement à 37% (résultats ENP, 2010). Un travail a été mené par l'InVS à partir des données de surveillance des toxoplasmoses congénitales (Toxosurv), des données des ENP réalisées et de modélisation mathématique pour estimer la tendance de l'évolution de la prévalence globale de la toxoplasmose et de son incidence. Les résultats prévoient une baisse continue de l'incidence et de prévalence de la toxoplasmose pour les années à venir. Le CNR essaiera de comprendre cette évolution en étudiant notamment la dynamique du cycle de *T. gondii* et la contamination des diverses catégories d'aliments à travers des programmes de recherche en cours.

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 sont les plus fréquentes à l'heure actuelle mais leur pronostic évolutif demeure incertain (risque de chorioretinites ultérieur). La fréquence et la gravité des toxoplasmoses congénitales ont conduit à la mise en place d'un programme national de dépistage sérologique systématique chez la femme enceinte, avec émission de recommandations de prévention par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. 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.

En 2012, 199 cas de toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiqués en France ; la prévalence globale de la toxoplasmose congénitale observée en France est autour de 2 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 2,7 % (en diminution par rapport aux années antérieures) et la morbidité globale représente 15 % (en augmentation par rapport à l'année 2010).

Les données de surveillance des toxoplasmoses congénitales en France sont transmises par l'InVS à l'ECDC, celles de l'année 2011, analysées en 2012, seront transmises en 2013. Il faut souligner que ces données de surveillance 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).

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 nouveaux 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 et tend même à augmenter sans que des données consolidées ne soient encore disponibles (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, la surveillance de l'émergence de génotypes atypiques est l'une des missions du Laboratoire Associé Pôle Souches. Un mode de contamination par consommation de viande de cheval importée apparaît émerger à la source de cas graves de toxoplasmose. Ces cas sont mieux recensés depuis que le CNR est en place et une collaboration avec le LNR « Parasites transmis par les aliments » tend à évaluer ce risque notamment par un plan de contrôle mené fin 2012 sur les viandes chevalines importées.

Le nombre de prélèvements adressés au pôle souche du CNR est en baisse de 34% par rapport à l'année précédente (135 vs 207 en 2011). Cette baisse s'explique en partie par un report du recueil des prélèvements de la fin d'année 2012 au début 2013 et par le fait qu'en raison de la sensibilité de la technique de génotypage direct définie en 2011, le Laboratoire associé a proposé à ses correspondants de n'adresser au CNR que les extraits ADN ayant été amplifiés en PCR avec un ct inférieur à 33. La proportion de souches par rapport aux extraits d'ADN de produits pathologiques continue à baisser (47.4% en 2012).

Le type II avec ses variants reste prédominant, même si sa proportion est légèrement plus faible (82% vs 84% en 2011) que les années précédentes en raison d'un plus grand nombre relatif de cas de toxoplasmoses acquises hors du territoire métropolitain. Le génotype III reste rare (2% des cas). Des génotypes « Africa 1 » ont été retrouvés dans 4 cas (origine africaine probable dans 3 cas), dont un cas de toxoplasmose congénitale sévère. Sept souches ont pu être isolées en Guyane Française, correspondant à des génotypes « Amazonian ». Parmi les autres souches atypiques, une nouvelle souche provenant de Polynésie Française et 2 nouveaux isolats dont le génotype fait penser à une contamination par un aliment importé d'Amérique du Sud ont été identifiées. Des cas groupés (sans isolement de souche) ont été observés chez 22 militaires en mission en Guyane Française. Une enquête épidémiologique menée en collaboration avec la CIRE Antilles-Guyane a incriminé de jeunes chats présents sur le site militaire.

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.

Le Laboratoire Associé Pôle Sérologie a fait un signalement de réactovigilance (faux positifs en IgG de certains kits de diagnostic commercialisés) au cours de l'année 2012.

Le groupe de travail a terminé l'évaluation des coffrets des IgG et IgM sur un panel de sérums tout-venant composé de 200 sérums négatifs, 169 sérums IgG+ et IgM- et 47 sérums IgG et IgM+ (soit au total 415 sérums) sur des trousseles ELISA, ELFA ou CLIA sur divers automates. Les résultats des évaluations des réactifs pour les tests d'agglutination et des réactifs pour l'évaluation de l'avidité ont été publiés en 2012.

Un guide d'interprétation des sérologies toxoplasmiques a été élaboré par les membres du CNR sous forme d'article 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 internet du CNR de la Toxoplasmose.

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 (notamment par diffusion d'une gamme « standard » de quantification). C'est aussi ce Laboratoire Associé qui est en charge du Contrôle de Qualité national en Diagnostic prénatal de la Toxoplasmose (pour la onzième fois en 2012). Il incluait de nouveau une souche isolée à partir d'une toxoplasmose congénitale récente. 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, ce sont des faux négatifs qui ont été relevés.

De plus, les méthodes, au lieu de s'homogénéiser, tendent vers une diversification supplémentaire résultant des appels d'offres des différents CHU, confirmant ainsi l'intérêt de se fonder exclusivement sur l'évaluation des performances des différentes méthodes. Par ailleurs, les données continuent de mettre en évidence un réel besoin d'une méthode de quantification standardisée, sujet d'étude actuel du Pôle BM du CNR.

Enfin, l'enquête nationale associée à ce CQ montre l'irruption des méthodes de PCR en kit et l'extension des méthodes d'extraction automatisées, deux faits nouveaux qui appuient l'importance de l'évaluation des méthodes comme mission de ce Pôle.

1 Missions & organisation du CNR

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés (voir [Annexe 1](#))

1.2 Fournir une description détaillée de l'équipe en renseignant notamment les items suivants : (voir [Annexe 2](#))

- Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés
- Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur
- Organigramme

1.3 Fournir une description détaillée des locaux et de l'équipement (du CNR et laboratoires associés) en renseignant notamment les items suivants : surface, plan, principaux équipements. (voir [Annexe 3](#)).

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

1-Démarche qualité Laboratoire Coordonnateur « Pôle Epidémiologie » (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'ANSM (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 ainsi 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 .
- Un suivi de la mise en place de ces pratiques est effectué par le biais d'audits internes réguliers. Une Revue de Direction est effectuée périodiquement (2 par an) au niveau

du Pôle de biologie avec prise en compte des différentes évolutions dans les différents services du Pôle.

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

2-Démarche qualité Laboratoire associé « Pôle Souches » (Limoges)

Le Laboratoire du Pôle Souches est engagé dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189 pour la biologie médicale. Le calendrier prévisionnel de la démarche d'accréditation inclut l'accréditation du Pôle Souches du CNR

Le Centre de Ressources Biologiques dont la responsabilité est partagée entre le Laboratoire Associé Pôle Souches et le laboratoire Coordonnateur est certifié selon la norme NF S 96900 depuis janvier 2010 avec un renouvellement en janvier 2013. Dans ce cadre, une revue de direction est effectuée annuellement (au mois de janvier) en présence des responsables du CRB (Pr Dardé, Pr Villena), des responsables opérationnels de site (Dr Ajzenberg, Dr Aubert), du responsable qualité du CRB (Dr Foudrinier) et des représentants des 4 institutions engagées (CHUs Limoges-Reims et Universités Limoges-Reims) ; au cours de cette réunion les indicateurs qualité de l'année écoulée sont présentés et les objectifs de la politique qualité pour l'année à venir du CRB sont fixés.

3- Démarche qualité Laboratoire associé « Pôle Biologie Moléculaire » (Montpellier)

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. Depuis 2010, sa démarche est intégrée dans celle plus globale du LBM (Laboratoire de Biologie Médicale) de l'ensemble du CHU de Montpellier visant à l'accréditation du Laboratoire en 2016 (norme ISO 15189).

Des réunions Qualité ont lieu de façon mensuelle entre tous les biologistes du laboratoire, le RQA 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.

4- Démarche qualité Laboratoire associé « Pôle Sérologie » (Strasbourg)

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'antibiologie, 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.
- Des contrôles de qualité externe qui s'ajoutent à celui de l'ANSM (une fois par an) : i) UK National External Quality Assessment Service For Microbiology (London) (4 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 IgG, IgM et avidité des IgG, immunofluorescence et les immunoblots.
- 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.

Le CNR a décidé de recenser les contrôles externes de qualité disponibles pour les analyses sérologiques de la toxoplasmose en demandant à chacun des membres la liste des contrôles effectués au sein de leur structure et leur degré de satisfaction vis à vis de ces évaluations externes de la qualité (EEQ) (recueil en cours).

Par ailleurs, le CNR a lancé une démarche de mise en place d'évaluation externe de la qualité pour les analyses sérologiques où il n'existe pas de contrôles externes commercialisés (voir objectifs 2013).

2 Activités d'expertise

2.1 Décrire les capacités techniques du CNR (voir Annexe 4)

2.2 Activités d'expertise de l'année 2012:

2.2.1 Expertise apportée par le Pôle Souches

- a) Nombre de souches ou prélèvements (ou fiches de données) réceptionnées, identifiées, caractérisées et leur provenance (LABM, laboratoires hospitaliers...) en distinguant leur origine le cas échéant (France, étranger) et le niveau de caractérisation réalisé (type phénotypique, génotypique ...):

Le nombre de prélèvements adressés au pôle souche du CNR est en baisse de 34% par rapport à l'année précédente (135 vs 207 en 2011). Cette baisse s'explique en partie par un report du recueil des prélèvements de la fin d'année 2012 au début 2013 et par le fait qu'en raison de la sensibilité de la technique de génotypage direct définie en 2011, nous avons proposé à nos correspondants de n'adresser au CNR que les extraits ADN ayant été amplifiés en PCR avec un ct inférieur à 33. La proportion de souches par rapport aux extraits d'ADN de produits pathologiques continue à baisser (47.4% en 2012) traduisant la difficulté d'accès à des animaleries pour de plus en plus des correspondants et le remplacement progressif des inoculations à l'animal par des PCR.

	Souches	ADN	TOTAL
2012	64	71	135
2011	85	122	207
2010	106	82	188
2009	108	81	189
2002-2008	464	322	786
TOTAL	827	678	1505

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

- En 2012, les 135 prélèvements reçus correspondent à 115 patients : 76 (66,1%) cas de toxoplasmose congénitale, 21 (18.2%) cas de toxoplasmoses systémiques de patients immunodéprimés, 9 (7.8%) toxoplasmoses oculaires, 9 (7.8%) toxoplasmoses systémiques chez des patients immunocompétents.

Nature des prélèvements 2012	Génotypage direct 2012			Génotypage souches 2012		
	succès	échec	<i>total direct</i>	succès	échec	<i>total souches</i>
Sang / Moelle osseuse	8	8	16	7	1	8
LCR	5	0	5	0	0	0
Cerveau/Moelle épinière	2	0	2	0	0	0
Poumons/LBA	5	1	6	0	0	0
Humeur aqueuse/Vitré	5	4	9	0	0	0
placenta	6	2	8	36	1	37
sang du cordon	0	1	1	3	0	3
tissus fœtaux	1	0	1	0	0	0
Liquide amniotique	12	8	20	16	0	16
Divers	2	1	3	0	0	0
Total	46	25	71	62	2	64

Tableau 2 : Prélèvements reçus au CNR Toxoplasmose en 2012 et succès du génotypage.

Sur les 135 prélèvements reçus en 2012, le génotypage a été possible dans 80% des cas, soit 65% (46/71) pour les extraits d'ADN provenant de produits pathologiques et 97% (62/64) pour les souches isolées sur souris. La proportion de souches par rapport aux extraits d'ADN de produits pathologiques continue à baisser (47.4% en 2012 contre 58.93% en 2011). Conformément au niveau de sensibilité défini en 2011 pour les extraits ADN, les échecs de génotypage correspondent à des produits pathologiques très pauvres en toxoplasmes (correspondant en PCR quantitative à des ct >33).

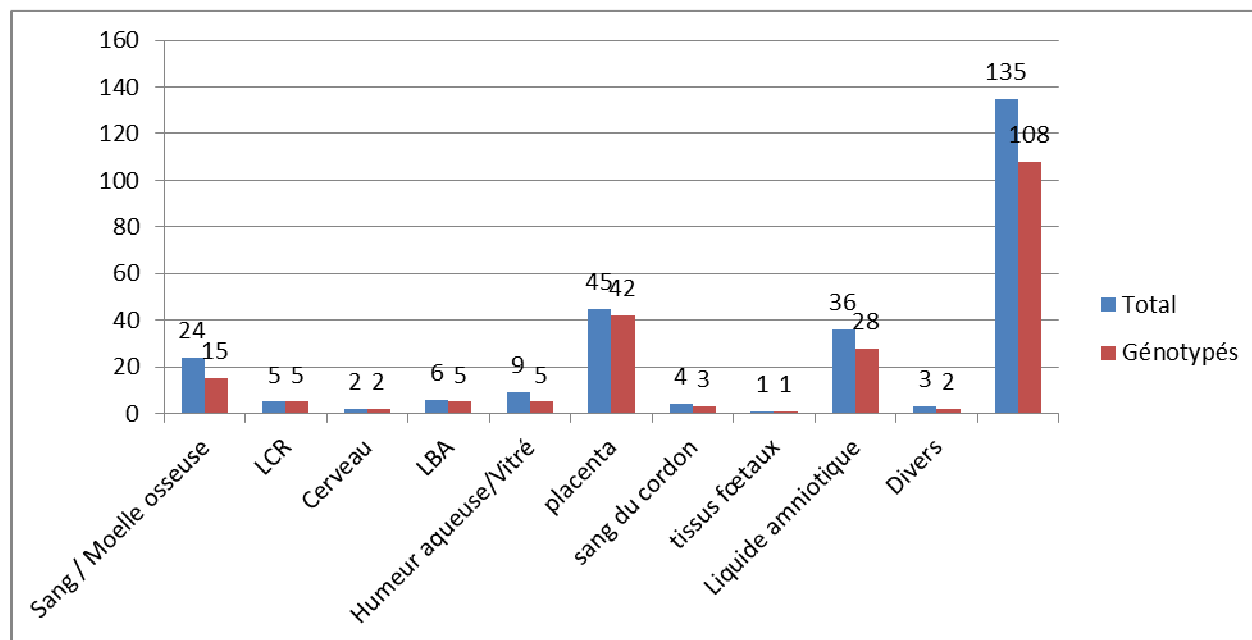


Figure 1 : Taux de réussite du génotypage en fonction de l'origine du prélèvement (extraits ADN de produits et souches obtenues à partir de ces produits pathologiques confondus)

- Le type II avec ses variants reste prédominant, même si sa proportion est légèrement plus faible (82% vs 84% en 2011) que les années précédentes en raison d'un plus grand nombre relatif de cas de toxoplasmoses acquises hors du territoire métropolitain. Le génotype III reste rare (2% des cas). Des génotypes « Africa 1 » ont été retrouvés dans 4 cas (origine africaine probable dans 3 cas), dont un cas de toxoplasmose congénitale sévère. Sept souches ont pu être isolées en Guyane Française, correspondant à des génotypes « Amazonian ». Parmi les autres souches atypiques, nous avons pu analyser une nouvelle souche provenant de Polynésie Française, et 2 nouveaux isolats dont le génotype fait penser à une contamination par un aliment importé d'Amérique du Sud. Pour ces 2 derniers cas (1 toxoplasmose congénitale sévère et une toxoplasmose disséminée chez un patient immunocompétent), on relève comme élément possible de la contamination une consommation de viande de cheval dont on sait qu'elle est majoritairement importée d'Amérique.

- **b) Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats :**

Actuellement, nous évaluons la chimiosensibilité sur toutes les souches multipliées au CRB Toxoplasma ce qui nous permettra d'effectuer des études statistiques du modèle développé. Nous avons aussi répondu en 2011 à une demande du CHU de Saint-Etienne pour une évaluation d'une souche (STE- 003 PHI) qu'ils nous ont envoyé montrant une sensibilité intermédiaire. Nous proposons actuellement aux membres du réseau du CNR d'effectuer les tests de chimiosensibilité à leur demande (sur des souches avec contexte clinique particulier).

Les résultats des tests de chimiosensibilité effectués sur des souches issues du CRB sont reportés ci-dessous:

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	H25	Sensible
TgH 32118A	ct faible 1-2 foyers / champs	

Tableau 3 : Etude de la chimiosensibilité sur des souches isolées de toxoplasmose humaine et animale.

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.

- c) Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué :

En 2012, 17 souches incluses au Centre de Ressources Biologiques Toxoplasma ont été distribuées pour des activités de recherche. Parmi celles-ci, une seule provenait directement de l'activité du CNR.

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

Le nombre de prélèvements adressés en 2012 au pôle souche du CNR a baissé de 34.3% par rapport à l'année précédente (135 vs 207 en 2011). Cette baisse s'explique en partie par un report du recueil des prélèvements de la fin d'année 2012 au début 2013 et par le fait qu'en raison de la sensibilité de la technique de génotypage direct définie en 2011, nous avons proposé à nos correspondants de n'adresser au CNR que les extraits ADN ayant été amplifiés en PCR avec un ct inférieur à 33. La proportion de souches par rapport aux extraits d'ADN de produits pathologiques continue à baisser (47.4% en 2012 contre 58.93% en 2011) traduisant la difficulté d'accès à des animaleries pour de plus en plus des correspondants 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 200 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[®] (BioRad), Liaison[®] (DiaSorin), Access[®] (Siemens), Centaur[®] (Bayer), Cobas[®] (Roche) et Architect[®] (Abbott).

Les résultats préliminaires et confidentiels ont été présentés aux membres du CNR lors de la réunion annuelle et certains résultats ont été publiés dans le rapport d'activités 2012. La constitution des panels se poursuit pour permettre d'évaluer les réactifs en terme de spécificité dans des populations ciblées (séroconversions, taux limite en IgG, interférences avec autres pathologies et infections chroniques avec IgM résiduelles).

- 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 a conduit à la rédaction d'un article à paraître dans le Journal of Clinical Microbiology prochainement (accepté en cours de révision) :

Toxoplasma seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicentre study.

H. FRICKER-HIDALGO, B. CIMON, C. CHEMLA, M.L. DARDE, L. DELHAES, C. L'OLLIVIER N. GODINEAU, S. HOUZE, L. PARIS, D. QUINIO, F. ROBERT-GANGNEUX, O. VILLARD, I. VILLENA, E. CANDOLFI, H. PELLOUX . And the network from the French National Reference Center for Toxoplasmosis ¹³

- Les résultats de notre évaluation sur les réactifs d'agglutination sont parus en 2012 :

Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis.

VILLARD O, CIMON B, FRANCK J, FRICKER-HIDALGO H, GODINEAU N, HOUZE S, PARIS L, PELLOUX H, VILLENA I, CANDOLFI E; and the network from the French National Reference Center for Toxoplasmosis.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Jul;73(3):231-235 (IF : 2.448)

- L'article sur l'expertise des coffrets d'avidité menée au sein du Pôle en 2011-2012, est paru début 2013 :

Comparison of four commercially available avidity tests for *Toxoplasma*-specific IgG antibodies

VILLARD O, BREIT L., CIMON B, FRANCK J, FRICKER-HIDALGO H, GODINEAU N, HOUZE S, PARIS L, PELLOUX H, VILLENA I, CANDOLFI E; and the French National Reference Center for Toxoplasmosis.

Clin. Vaccine Immunol. 2013 20(2) : 197-204.

- Les conduites à tenir face à des situations cliniques ou techniques particulières ont été validées au sein du CNR , certaines ont été incluses dans le rapport d'activités 2011 (annexe 5 Pôle Sérologie) ; elles feront l'objet d'un article de synthèse en 2013 :

- 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

Le Pôle "Biologie moléculaire" continue à travailler en réseau avec l'appui de 9 laboratoires-Supports, se réunissant en moyenne trois fois par an.

3.1. 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 trousses apparaissent en retard sur un plan technologique par rapport aux méthodes constamment 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.

Le Pôle a étendu l'action démarrée en 2011 consistant à fournir des échantillons à diverses concentrations (10 à 10⁵ toxoplasmes/mL) à tous les laboratoires français qui en faisaient la demande en vue d'une auto-évaluation 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 distribué 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.

Le retour des participants ayant été médiocre, le suivi de l'adoption de cette mesure par les différents centres a été renforcé en 2012. En particulier, un engagement ferme d'utilisation de la gamme et de retour d'information au CNR a été demandé aux centres qui renouvelaient la demande. Les résultats de cette action seront évalués sur le moyen terme.

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 Pôle 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 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 2011 et 2012, le Pôle Biologie moléculaire a donc réalisé une étude multicentrique au 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, et en particulier du volume de liquide amniotique utilisé en routine (1,5 à 15 ml selon les laboratoires). 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.

Au final, le Pôle BioMol recommande d'atteindre un seuil de 1 Toxoplasme/mL et confirme son expression en 0,5 Toxoplasme par prise d'essai.

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.

Bien que difficile à valoriser de par sa complexité, cette étude devrait donner lieu à publication ; mais la masse de tâches hospitalières imposées par l'administration rend de plus en plus difficile la valorisation des études..

c) L'évaluation multicentrique d'une trousse commerciale de PCR-*Toxoplasma* en comparaison avec des méthodes "maison" (coordonnateur = Laboratoire-Support de Strasbourg) a été complétée par le recueil des données cliniques issues de chaque centre pour les cas étudiés. Ce recueil rétrospectif s'est avéré très difficile pour certains centres, ralentissant le rythme de l'étude. L'article contenant les résultats de cette évaluation est toujours en cours de rédaction.

d) Une étude comparative multicentrique a également porté sur la **quantification des Toxoplasmes dans le liquide amniotique**, au moyen de la gamme standardisée mise au point au sein du groupe de travail. Là encore, la non-conservation des liquides amniotiques et le non-recueil des données cliniques par certains centres a réduit la cohorte, donc la puissance de l'analyse. Néanmoins, les résultats préliminaires, s'ils confirment l'existence de très basses charges parasitaires, montrent a priori une absence de corrélation avec le pronostic chez l'enfant, ce qui va contre les données publiées jusqu'alors. La publication des résultats est programmée en 2013.

e) Une autre étude comparative multicentrique a évalué les **performances de différentes méthodes d'extraction de l'ADN** de Toxoplasme (en termes de sensibilité et de reproductibilité) à partir du liquide amniotique avec la participation d'un coordonnateur = Laboratoire-support de Dijon et de 3 Laboratoires-supports participants (Grenoble, Paris-Cochin, Paris-Pitié-Salpêtrière).

L'étude a porté sur une méthode manuelle dite de référence (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 échantillons à extraire étaient des liquides amniotiques d'hydramnios testés négatifs en PCR pour la toxoplasmose et ensemencés par une suspension de toxoplasmes à différentes concentrations (concentrations testées = 0, 1, 2.5, 5 et 10 Toxoplasmes par ml). L'ensemble des extractions a été réalisé dans tous les centres sur une même période de deux semaines suivant la préparation des échantillons, afin de limiter la dégradation des toxoplasmes avant extraction. Deux méthodes de PCR ont été utilisées pour la recherche d'ADN de toxoplasmes après extraction (PCR-rep529 en sonde TaqMan sur ABI Prism 7000 et PCR-rep529 en sonde d'hybridation sur LightCycler). De plus, la recherche d'inhibiteurs de PCR a été réalisée dans un centre en utilisant un Contrôle interne de PCR d'une part, et en amplifiant la β globine humaine d'autre part. L'ensemble des PCR a été réalisé le même jour dans les deux centres de façon à limiter la dégradation de l'ADN après extraction. Les résultats montrent que 3 des méthodes automatisées étaient aussi voire plus sensibles que la méthode manuelle. Les 2 autres méthodes automatisées étaient significativement moins sensibles. Ces résultats seront valorisés par une publication avant d'être mis à la disposition du réseau.

f) Toujours dans un cadre multicentrique, un travail a été débuté visant à vérifier les conditions de **conservation de l'ADN de Toxoplasmes** extrait de liquide amniotique au cours des toxoplasmoses congénitales (coordonnateur = Laboratoire-support de Lille). Quelques données manquantes empêchent le centre coordonnateur de finaliser les résultats. Ceux-ci serviront à établir des recommandations sur la conservation des ADN.

3.2. 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 onzième fois en 2012 sous l'égide du CNR, et pour la première fois en deux sessions (Juin et Décembre). Il consiste en une gamme de concentrations relativement basses de toxoplasmes, préparées avec le matériel étalon cité ci-dessus, aujourd'hui basé sur des souches cliniques de Toxoplasmes récemment isolées au cours de toxoplasmoses congénitales. Il a été suivi par 30 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. Pour la session de Juin, seul un échantillon a été rendu faussement négatif, à 5 Toxoplasmes (T)/mL. A la session de Décembre, six laboratoires ont rendu au moins un échantillon négatif. Parmi ces laboratoires, deux ont rendu un faux négatif parmi les trois liquides amniotiques à 7 ± 4 T/mL, ce qui du fait de l'implication de la Loi de Poisson à cette concentration n'a pas d'incidence sur l'analyse de la sensibilité d'un centre; un laboratoire a parfaitement répondu aux quatre liquides amniotiques en dépit des faibles concentrations envoyées, mais a répondu faussement négatifs les quatre plasmas positifs, notamment celui à la concentration de 80 ± 30 T/mL. Ceci est probablement dû à un problème lié à la matrice et non à la sensibilité de la méthode. Cette hétérogénéité des résultats entre les sessions (un seul faux négatif en Juin vs. 12 faux négatifs rendus par six laboratoires à la session de Décembre) alors même que les concentrations adressées étaient similaires soulignent l'importance de rester particulièrement vigilant sur l'évaluation de l'ensemble de la technique, et l'absolue nécessité d'une auto-évaluation régulière (pluriannuelle) pour chaque centre (voir plus loin).

La quantification absolue de la charge parasitaire dans le liquide amniotique a fait l'objet d'un rendu de l'apart de 20 laboratoires (elle ne fait cependant pas partie de l'évaluation). Les quantifications de 12 laboratoires peuvent être considérées comme assez précises (à ces concentrations: 7 ± 4 et 20 ± 10 T/mL, et sur du liquide amniotique). Le CNR continue à conseiller de ne pas rendre de quantification absolue aux cliniciens. La mise en œuvre d'une méthode de quantification standardisée est un sujet d'étude actuel du Pôle BM du CNR.

Par ailleurs, le Pôle Biologie moléculaire du CNR reste 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 L-A en 2010 afin qu'il partage son savoir-faire en matière de diagnostic moléculaire et promoteur de Contrôles de Qualité et proposé une collaboration dans ce domaine **au niveau européen** (80 centres participants). Cette collaboration s'est poursuivie depuis. En contrepartie, QCMD offre gracieusement un nombre suffisant d'échantillons au CNR pour pouvoir organiser le CQE gratuitement.

3.3. Enquêtes sur les pratiques et les méthodes utilisées en diagnostic moléculaire

Comme chaque année, une **enquête annuelle sur les pratiques** a été associée au Contrôle de Qualité national; cette enquête fait l'objet d'un retour d'information à tous les participants.

Les faits marquants de 2012 sont l'émergence de nouvelles pratiques dans le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose, à savoir:

(i) l'utilisation de méthodes d'extraction automatisée : celle-ci est source d'une nouvelle hétérogénéité des méthodes car, alors que la méthode manuelle développée par Qiagen était utilisée par la quasi-intégralité des participants, pas moins de six méthodes automatiques étaient utilisées en 2012.

(ii) l'apparition des méthodes commerciales (kits) de PCR: celles-ci sont d'ores et déjà utilisées par certains centres et devront faire l'objet d'évaluations par le CNR.

3. Activités de surveillance

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

- a) Réseau de partenaires en précisant notamment les notions suivantes : (i) description des partenaires, (ii) répartition par type d'activités, (iii) répartition géographique, (iv) estimation de la couverture du réseau ou représentativité, (v) évolution du réseau

Les prélèvements, accompagnés de données cliniques et épidémiologiques, sont adressés par les 33 laboratoires de Parasitologie des CHU et de quelques centres hospitaliers non universitaires de métropole et des DOM-TOM.

En 2012, le CNR a également reçu 3 prélèvements de patients en provenance de partenaires européens (1 Allemagne, 1 Serbie, 1 Roumanie).

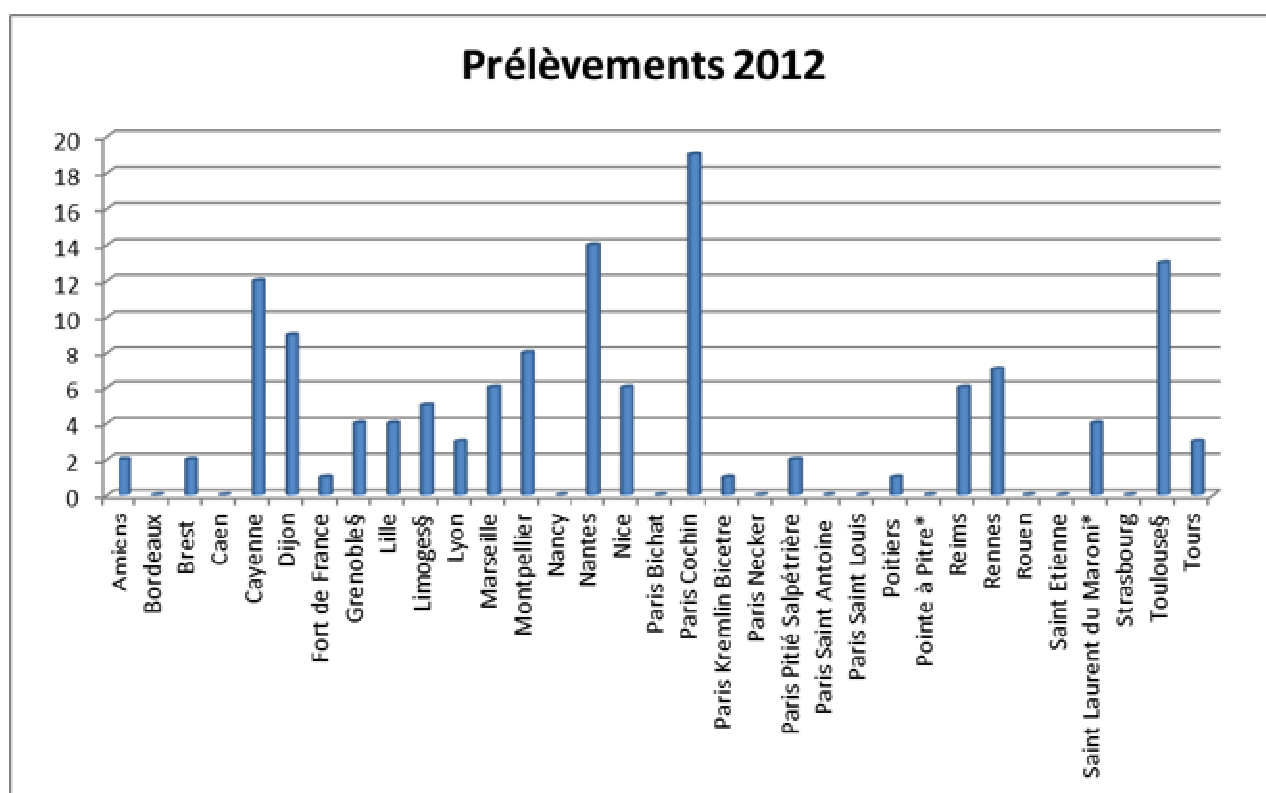


Figure 2 : Participation des partenaires du réseau à l'envoi de prélèvements au CNR *Toxoplasma* 2012

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 géotypes à travers la France fait cependant apparaître des zones peu représentées en Aquitaine et Auvergne. 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). De nouvelles souches de Polynésie ont été analysées (envoi par CHU Cochin).

L'analyse des souches de cas de toxoplasmose humaine provenant d'autres pays étrangers (3 en 2012) permet de mieux connaître l'épidémiologie du toxoplasme et par là même d'identifier d'éventuelles importations de souches sur le territoire français.

- b) Définition de l'échantillon de souches isolées :

Les souches de toxoplasmes sont isolées de prélèvements humains (origines diverses) ou animaux (cœur, cerveau). L'ensemble des souches isolées adressées au CNR sont caractérisées d'un point de vue épidémiologique, génotypique, clinique.

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

Les 135 prélèvements adressés au CNR correspondent à 115 patients.

Les formes cliniques d'origine des 115 patients dont les prélèvements ont été adressés au CNR en 2012 sont les suivantes :

- 76 (66.1%) cas de toxoplasmose congénitale.
- 9 (7.8%) cas de toxoplasmose oculaire de patients immunodéprimés ou immunocompétents ; ce nombre relativement faible par rapport aux années précédentes peut 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).
- 21 (18.2%) prélèvements de cas de toxoplasmose systémique de patients immunodéprimés
- 9 (7.8%) prélèvements de cas de toxoplasmose systémique de patients immunocompétents

Le génotypage a été possible pour 99/115 patients (86.1%).

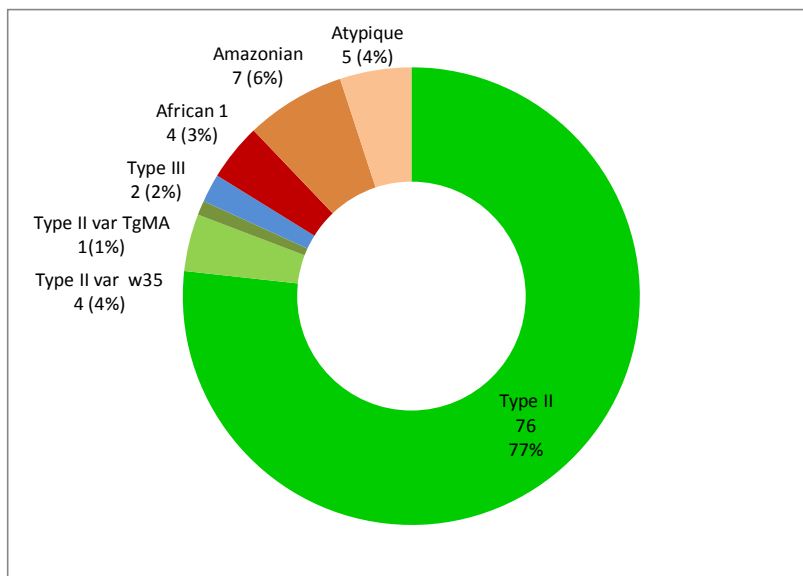


Figure 3 : Répartition des différents génotypes observés pour 99 patients.

Génotype	T. congénitale	T. immunodéprimés	T. oculaire	T. immunocompétents	Total
Type II	58	14	4	0	76
Type II variant w35	4	0	0	0	4
Type II variant TgMA	1	0	0	0	1
Type III	1	1	0	0	2
African 1	1	3	0	0	4
Amazonian	1	0	0	6	7
Caribbean	0	0	0	0	0
Atypique	2	1	1	1	5
Non amplifié	8	2	4	2	16
Total	76	21	9	9	115

Tableau 5 : Répartition des génotypes par forme clinique chez les 115 patients.

Génotype	Afrique	Amérique du Sud	Caraïbes	Europe hors France	France	Polynésie	Pas de données	Total
Type II +II variant	1 (Algérie?)	0	1	1 (Roumanie)	74	0	4	81
Type III	0	0	0	1 (Italie)	1	0	0	2
African 1	3	0	0	0	0	0	1	4
Amazonian	0	7	0	0	0	0	0	7
Caribbean	0	0	0	0	0	0	0	0
Atypique	0	0	0	1 (Serbie)	3*	1	0	5
Non amplifié	1	3	0	0	11	1	0	16
Total	5	10	1	3	86	2	5	115

* : toxoplasmose acquise en France, lien possible avec consommation de viande de cheval importée dans 2 cas.

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

En 2012, les données remarquables du génotypage sont les suivantes :

- le type II et ses variants identifiés par un marqueur microsatellite inhabituel (W35 ou TgMA) sont observés chez 82% des 99 patients pour lesquels le génotypage a été possible, et dans 92.6% des cas de toxoplasmoses congénitales avec les mêmes caractéristiques que d'habitude. Il représente 94,8% des souches isolées des patients probablement infectés en France métropolitaine. Ces différents pourcentages sont très stables depuis le début de la création du CNR (2006).
- Le type III est peu fréquent parmi les cas 2012 (2% vs 4,2% de 2006 à 2010) : sur les 2 patients infectés par ce génotype, un correspond à un patient immunodéprimé probablement infecté en Italie. Dans ce dernier cas, la forme clinique de la toxoplasmose était inhabituelle : éruption vésiculeuse avec présence de toxoplasme dans la biopsie cutanée, 3 semaines après le début d'une toxoplasmose systémique (Zimmermann et al. JCM 2013).
- Les génotypes différents des types II et III sont présentés dans le tableau 7 :
- Trois des 4 patients infectés par le génotype Africa 1 sont d'origine africaine (RCA, Guinée Bissau, Cameroun), confirmant la vaste répartition de ce génotype en Afrique sub-saharienne. Dans un cas, l'origine africaine de l'infection n'a pas été établie. Il s'agit dans 3 cas de réactivation chez des patients immunodéprimés comme cela a déjà été décrit dans Ajzenberg et al. 2009. Pour le cas de toxoplasmose congénitale (TgH 13143), la mère était arrivée récemment d'Afrique et l'échographie fœtale a révélé une dilatation ventriculaire. La période de séroconversion maternelle n'étant pas connue, on ne peut conclure quant à une plus grande virulence de ce génotype dans les infections congénitales.

- Sept patients infectés en Guyane Française par des génotypes « Amazonian » ont présenté des formes cliniques de gravité diverse. Dans tous les cas de toxoplasmoses acquises chez les adultes, l'isolement a été possible à partir du sang ce qui confirme les parasitémies élevées et prolongées observées avec ces génotypes. Trois isolats se sont révélés totalement identiques avec les 15 marqueurs microsatellites : ils proviennent d'une part d'une mère et de son bébé (TgH 19008A et B), d'autre part d'un patient (TgH 19007) habitant le même quartier de Saint Laurent du Maroni, à 100 m de distance. Cette proximité géographique fait soupçonner une source de contamination commune à partir du sol ou de l'eau (nombreux chats dans le voisinage). A signaler que la symptomatologie des 2 adultes était différente malgré l'identité de la souche. Une autre souche TgH 18049 a été retrouvée identique à une souche analysée en 2011 (TgH 18048), sans que des liens épidémiologiques aient pu être clairement établis : les 2 patients se sont infectés au cours de la même période (septembre 2011), mais l'un à Maripasoula et l'autre sur le littoral guyanais (résident de Matoury, viande pouvant provenir de Mana, proche de Saint Laurent du Maroni). A signaler 2 autres cas dans une même famille (père TgH 18050 et fils TgH 18051), mais seule la souche isolée du fils a pu être génotypée.

Code CNR	Nature du prélèvement	Origine géographique	Clinique	Génotype MS	Remarques
TgH 13143A	Liquide amniotique	Africa#RCA ou Guinée Bissau	T congénitale : hydrocéphalie / IMG	Africa 1	
TgH 13132A	sang	Africa#Cameroun	ID HIV / T cérébrale / récidives de T cérébrale / mort	Africa 1	
TgH 13032B	SNC LCR	Africa#RCA	ID HIV / T cérébrale / T. oculaire en 2002	Africa 1	
TgH 13131A	SNC LCR	Europe#France	ID HIV / T cérébrale	Africa 1	
TgH 18049B	sang	South America#French Guiana	IC / T disséminée : hépatite pneumopathie, signes cutanéomuqueux	Amazonian	identique à TgH 18048
TgH 18051A	sang	South America#French Guiana#Macouria	IC / T fièvre, diarrhée, douleurs abdominales (enfant de 3 ans,)	Amazonian	fils de TgH 18050, T. pulmonaire
TgH 18054A	sang	South America#French Guiana#Regina	IC / T acquise	Amazonian	
TgH 19006A	sang	South America#French Guiana#Maripasoula	IC / T pulmonaire, polyadénopathies	Amazonian	
TgH 19007A	sang	South America#French Guiana	IC / T fièvre prolongée, adénopathies	Amazonian	identique à TgH 19008
TgH 19008A	sang	South America#French Guiana	IC / T disséminée / myosite / myocardite / uvéite	Amazonian	mère de TgH 19008B
TgH 19008B	sang	South America#French Guiana	. T congénitale : atteinte méningée, fièvre, sang pos à J9 . mère : Séroconversion 36 SA	Amazonian	fils de TgH 19008A identique à TgH 19007
TgH 24044A	Humeur aqueuse	Europe#France	IC / T. oculaire sévère/Primo-infection	Atypique	
TgH 14011A	Liquide amniotique	Europe#France	. T congénitale: dilatations ventriculaires, calcifications intracrâniennes, IMG 36SA . Mère : adénopathies persistantes / séroconversion 21 SA	Atypique	. consommation de viande de cheval . souche proche de TgCkBr147 (poulet du Brésil)
TgH 13126A	Liquide amniotique	Pacific#French Polynesia	T congénitale sans renseignements cliniques	Atypique	
TgH 22016B	Ganglion	Europe#France	IC / T disséminée/ pulmonaire/ hépatite/ ADP/ CR	Atypique	consommation de viande de cheval
TgH 106019A	Sang	Europe#Serbia	ID greffe moelle / T disséminée/ mort	Atypique	. similaire à TgH 25056, T congénitale acquise en Bulgarie

Tableau 7 : Génotypes différents des types II et III observés en 2012 (ID : immunodéprimé ; IC : immunocompétent ; T : toxoplasmose ; SA : semaines d'aménorrhée ; ADP : adénopathies ; CR : chorioretinite).

- Les 5 patients infectés par des génotypes qualifiés d'atypiques (différents les uns des autres) correspondent à :
 - 1 cas de toxoplasmose oculaire sévère (TgH 24044A) suite à une primo-

infection chez un patient immunocompétent résident dans les Bouches du Rhône. Aucune origine importée n'a pu être retrouvée à l'interrogatoire.

- 1 cas chez un immunodéprimé (dossier transmis par notre correspondant en Serbie, O. Djurkovic-Djakovic) : il est intéressant de noter que ce génotype est similaire à celui responsable d'un cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqué en 2011 à Montpellier chez une patiente infectée en Bulgarie. Il pourrait s'agir d'un nouveau génotype circulant dans cette région d'Europe.
- 1 cas correspond à une toxoplasmose congénitale acquise en Polynésie Française, sans renseignements cliniques ; c'est la 2ème souche isolée de ce territoire. Un renforcement des liens avec les gynécologues et pédiatres de ce territoire serait nécessaire pour définir les caractéristiques des formes cliniques de toxoplasmose congénitale associées à ces génotypes polynésiens.
- 1 toxoplasmose congénitale sévère pour laquelle l'enquête épidémiologique a révélé une consommation de viande de cheval chez la mère en cours de grossesse. Une enquête conduite au domicile de la patiente a retrouvé de la viande de cheval congelée faiblement positive en PCR *Toxoplasma*, mais qui ne correspondait pas à celle ayant pu infecter la patiente (enquête DDPP 07, LNR). Le génotype de cette souche a été retrouvé identique dans la base de données du CNR à une souche d'origine brésilienne, renforçant les soupçons sur une contamination par une viande importée d'Amérique du Sud.
- 1 toxoplasmose disséminée sévère chez un patient immunocompétent pour laquelle une consommation de viande cheval a été retrouvée. Le génotype, très atypique, n'a pas d'équivalent dans la base de données du CNR.

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

Les échanges de données avec l'InVS sont faits par le responsable du CNR (I. Villena). L'interlocuteur privilégié au niveau du CNR était le Dr V. GOULET depuis la création du CNR, remplacée par le Dr M TOURDJMAN depuis octobre 2012.

Une réunion annuelle a lieu à l'InVS en présence des membres impliqués dans le pilotage de la surveillance des toxoplasmoses congénitales (Toxosurv), elle a eu lieu le 21 décembre 2012 (ordre du jour [Annexe 5](#)). Cette réunion permet de faire le bilan des actions menées par le CNR et l'InVS lors de l'année écoulée sur le plan de la toxoplasmose (essentiellement toxoplasmose congénitale) et d'établir les priorités pour l'année suivante.

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 national 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, Voozadoo , Epiconcept TM) 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 Voozadoo, 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 TM). 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 2012 : (**Annexe 6**)

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 2012 les données d'activités de surveillance des toxoplasmoses congénitales pour l'année 2011 ont été transmises. 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 21.12. 2012 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 2012, 186 cas de toxoplasmoses congénitales ont été diagnostiqués en France conduisant à une interruption de grossesse dans 5 cas (4 Interruptions de grossesse pour raison médicale et 1 Mort fœtale in utero) ; 173 enfants sont nés dont 9 présentent une atteinte sévère de la maladie et 17 une atteinte modérée, 147 enfants sont asymptomatiques à la naissance. Un logigramme représente le récapitulatif de ces cas (Annexe 6). Ainsi, la prévalence globale de la toxoplasmose congénitale observée en France est de 2,26 pour 10 000 naissances et la prévalence des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués à la naissance est de 1,58 pour 10 000 naissances. La létalité liée à la toxoplasmose congénitale est de 2,7 % (en diminution par rapport aux années antérieures) et la morbidité globale représente 15 % (en augmentation par rapport à l'année 2010). (Voir tableau des indicateurs remarquables, Annexe 6).

Ces données de surveillance montrent une diminution du nombre de cas par rapport aux années antérieures: 272 cas en 2007, 268 cas en 2008, 266 cas en 2009 et 244 cas en 2010.

Cette baisse du nombre de cas encore plus marquée depuis l'année 2010, 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 constaté que le laboratoire Cerba (parmi les plus gros laboratoires privés en France) n'avait pas déclaré ses cas diagnostiqués en période anténatale depuis le début de l'année 2012. Nous avons alors contacté le laboratoire Cerba afin de connaître les raisons de cette non déclaration, le Laboratoire nous a simplement fourni le nombre de cas diagnostiqués en période anténatale pour l'année 2012, soit 13 cas.

Au total pour l'année 2011, 199 cas de TC congénitales sont donc recensés. Parmi eux, 13 diagnostics anténataux n'ont pas été notifiés dans la base de surveillance. L'analyse des toxoplasmoses congénitales a donc porté sur 186 cas.

Nous avons aussi contacté le laboratoire Cerba pour recueillir le nombre de cas diagnostiqués en période postnatale. Nous avons 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, les cas de 2011 ont été récupérés et 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), ce qui a été fait.

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

Nous avons convenu avec l'InVS que si la diminution des cas observée en 2011 se poursuivait en 2012, le CNR (laboratoire Coordonnateur) serait amené à évaluer avec l'InVS l'exhaustivité du recueil des cas après une nouvelle enquête auprès des laboratoires privés et CH n'entrant pas dans le réseau Toxosurv actuel. Cette décision d'évaluation de l'exhaustivité du recueil à travers une enquête à mener en 2013 a été actée lors de la réunion annuelle à l'InVS en décembre 2012.

Un travail a été mené par l'InVS à partir des données de cette surveillance (Toxosurv), des données des ENP réalisées et de modélisation mathématique pour estimer la tendance dans les années à venir de l'évolution de la prévalence globale de la toxoplasmose et de son incidence. Ce travail a permis la rédaction d'une publication acceptée en 2013.

Nogareda F, Le Strat Y, Villena I, de Valk H, Goulet V. Incidence and prevalence of toxoplasmosis among women in France, 1980-2020: Model-based estimation. BMC Infectious Diseases.

Ainsi, la prévalence globale de la toxoplasmose congénitale est actuellement inférieure à celle estimée à partir d'enquêtes anciennes (données de l'enquête nationale périnatale ENP-2010 dont les résultats ont été communiqués en octobre 2012) et l'incidence de la toxoplasmose estimée par l'Invs apparaît aussi en forte diminution, pouvant expliquer cette diminution du nombre de cas de toxoplasmose congénitale.

L'importance du recueil annuel des cas est donc réelle afin d'estimer de façon objective l'incidence de la toxoplasmose en France. 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 7**). 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).

Contribution à la surveillance nationale des réactifs : réactovigilance.

La réactovigilance a permis de signaler la présence de faux positifs en IgG pour deux réactifs (le premier dans le cadre d'une utilisation en routine, le second lors de l'expertise des réactifs). Ces observations ont fait l'objet de signalements auprès de l'ANSM et des fabricants.

- 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 une Unité Sous Contrat de l'ANSES pour la parasitologie (USC Epitoxo), le LNR (laboratoire national de référence- P. Boireau, I. Vallée, R Blaga) 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.

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, de bœuf ou de porcs via des plans de surveillance organisés avec la DGAL), soit dans le cadre d'une enquête épidémiologique suite à des cas humains groupés.

Dans le cadre d'une alerte donnée à l'InVS suite à la contamination d'une patiente enceinte ayant consommé de la viande de cheval importée en 2012 et ayant conduit à une toxoplasmose congénitale sévère chez son fœtus, le CNR et le LNR ont collaboré pour le recueil de la viande incriminée au domicile de la patiente. Le CNR «Pôle Epidémiologie » et le LNR ont alerté également la DGAL (en accord avec l'InVS) pour mettre en place une surveillance des viandes de cheval importées. Cette étude a été menée fin 2012 par le LNR. Les résultats sont en cours d'exploitation.

Le responsable du CNR est membre du CES Microbiologie (devenu CES Biorisk) à l'ANSES et à ce titre a présenté ces cas de toxoplasmoses par contamination alimentaire consécutive à l'ingestion de viande de cheval importée afin de sensibiliser les membres du CES et la Direction d'Evaluation des Risques de l'ANSES à ce problème. (Présentation au CES le 29 novembre 2012/ **Annexe 8**). Les Drs V. Vaillant et N. Jourdan da Silva, médecins épidémiologistes à l'InVS sont également présentes à ce CES.

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 ou de souches de génotype particulier.

- b) Définitions utilisées pour exprimer la résistance

La recherche de chimiosensibilité à la sulfadiazine nécessite l'obtention de la souche et sa multiplication en cultures cellulaires. A partir de 2013, seule une demande provenant des centres (comme cela a été le cas pour une souche isolée à Saint Etienne) sera traitée.

- c) Résultats : distribution en fonction des critères pertinents

La résistance à la sulfadiazine s'exprime par rapport à une valeur d'IC 50 telle que définie dans le paragraphe 2.2. Deux souches de référence (RH et Me49) de *T. gondii* ont été poussées en résistance par passages successifs en présence de sulfadiazine et une tentative de compréhension des phénomènes de résistance a été menée dans le cadre d'une thèse d'Université (C. Doliwa, décembre 2012). Plusieurs publications ont été générées à partir de ce travail.

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Velard F., Schmid A., Geers R., Villena I. Induction of sulfadiazine resistance in vitro in Toxoplasma gondii. Experimental Parasitology, 2013.

Doliwa C., Xia D., Escotte-Binet S., Newsham E., Sanderson S., Aubert D., Randle N., Wastling J., Villena I. Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of Toxoplasma gondii using difference-gel electrophoresis (DIGE). International Journal for Parasitology: Drugs and Drug resistance, 2013.

Doliwa C., Escotte-Binet S., Aubert D., Sauvage V., Velard F., Schmid A., Villena I. Sulfadiazine resistance in Toxoplasma gondii: no involvement of overexpression nor polymorphisms in therapeutic targets and ABC transporters genes. Parasites (soumis).

3.3. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Suspicion de l'implication de la viande de cheval importée d'Amérique dans la survenue de cas graves de toxoplasmose :

Plusieurs cas de toxoplasmoses sévères ont été rapportés régulièrement par le CNR à l'InVS. En 2012, un cas grave de toxoplasmose congénitale (anomalies échographiques importantes chez le fœtus conduisant à une interruption de la grossesse) a été rapporté par le Dr Wallon (CHU Lyon, membre du réseau Toxosurv et du comité de pilotage) consécutif à une contamination pendant la grossesse d'une femme ayant consommé de la viande de cheval importée. Le CNR et le LNR ont collaboré pour le recueil de la viande incriminée au domicile de la patiente. Cependant, le lot recueilli ne correspondait pas au lot consommé lors de la contamination. Aussi, en raison de l'absence de disponibilité de l'échantillon de viande incriminée, l'enquête n'a pu conclure formellement à la responsabilité de la viande de cheval. Néanmoins, il persiste une forte suspicion sur un aliment importé en raison des génotypes des souches isolées, similaires à ceux observés sur le continent américain.

Un autre cas grave (toxoplasmose disséminée) a été rapporté chez un sujet immunocompétent.

Un recensement des cas de toxoplasmose sévères consécutifs à la consommation de viande de cheval important est fait (Encart 1), ces cas ont été présentés et discutés en présence du responsable du LNR (Dr I. Vallée) lors de la réunion annuelle du CNR au mois d'octobre 2012. Ces cas ont aussi été présentés à l'InVS lors de la réunion annuelle du 21 décembre 2012. La décision d'alerter les autorités a été prise par l'InVS, une lettre a ainsi été rédigée par I. Villena et V. Vaillant et soumise à la Directrice de l'InVS qui a adressé une lettre d'information à la DGS le 5 mars 2013 (Annexe 9).

Encart 1 : cas de toxoplasmoses pour lesquels la consommation de viande de cheval importée est suspectée.

Code CNR	Terrain	Forme clinique	Epidémiologie	Souche
TgH 23018	BPCO, corticoïdes	Toxoplasmose pulmonaire, mort	Consommation de cheval Origine Canada probable	Souche de type sud-américain (TgCkBr005, TgCkBr015)
TgH 23028	Grossesse	Toxoplasmose congénitale asymptomatique	Consommation de cheval Origine Brésil probable	Souche de type sud-américain (TgCkBr057, TgCatBr01, MAR001-HOU)
TgH 20005	Grossesse Thyroïdite d'Ashimoto	Réinfection à 7 mois de grossesse Toxoplasmose congénitale sévère	Consommation de cheval Origine Amérique du Sud probable	Souche pouvant être de type sud-américain (Castells, Uruguay) mais également retrouvée chez d'autres patients en France
TgH 13117	Lupus, Corticoïdes	Toxoplasmose disséminée (sang, LCR) et oculaire (séquelle de chorioretinite)	Consommation de cheval Origine Argentine probable	Souche de type sud-américain, similaire à TgH 23018
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	Souche de type sud-américain
TgH 14011	Grossesse	Toxoplasmose congénitale sévère (IMG) Mère : Adénopathies persistantes	Consommation de viande de cheval Enquête épidémiologique InVS	Souche de type sud-américain, similaire à TgCkBr147 (poulet brésilien)
TgH 22016	Immunocompétent	Toxoplasmose pulmonaire, adénopathies, hépatite, chorioretinite	Consommation de viande de cheval	Souche unique, sans équivalent dans la base de données CNR

Cas groupés en Guyane Française:

Entre le 20 juin et le 5 Août 2012, 22 cas groupés de toxoplasmose ont été observés chez des militaires en Guyane Française (mission de lutte contre les orpillages clandestins sur le site de Repentir). Un seul patient présentait une atteinte sévère ayant nécessité une hospitalisation (péricardite). L'enquête menée par un médecin épidémiologiste de l'armée (Dr Pommier de Santi) avec la CIRE Antilles-Guyane a conclu à la responsabilité probable de jeunes chats présents sur le site. Le renforcement des mesures d'hygiène a permis d'arrêter l'épidémie. Aucune souche n'a pu être isolée chez les patients malgré la positivité – très faible cependant – de la PCR sur le sang de 5 d'entre eux. Une analyse du sable et de l'eau récupérée sur le site est en cours.

3.4. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

- Lister les réseaux auxquels le CNR et ses laboratoires associés participent et leur contribution (expertise, envoi de données, de souches...)

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 ; en 2012 : Serbie, Allemagne, Roumanie).

L'équipe du laboratoire Coordonnateur (Pôle épidémiologie) collabore 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

Les données de surveillance sont transmises par l'InVS, les données de surveillance des toxoplasmoses congénitales de l'année 2010, analysées en 2011 ont été transmises en avril 2012. Celles de 2011, analysées en 2012, devraient être transmises courant 2013. 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

- Décrire pour chacune de ces études : (i) les objectifs de l'enquête, (ii) les partenaires, (iii) la contribution du CNR, (iv) l'état d'avancement et (v) principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication.

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-fœtale de l'infection par *Toxoplasma gondii*.

Objectifs secondaires :

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

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

Méthode :

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

Résultats 2012 :

Depuis la première inclusion le 17/11/2010, il y a eu à ce jour 92 inclusions, ce qui est en dessous de l'objectif que nous avons fixé. Aussi, l'étude TOXOGEST a fait l'objet d'une évaluation de la part du financeur et promoteur de ce PHRC, le Département de la Recherche Clinique de l'APHP. Plusieurs réunions téléphoniques ont eu lieu avec les membres du comité de pilotage pour préparer cette réunion et proposer des amendements au PHRC afin d'augmenter le nombre d'inclusions et demander une prolongation de financement du PHRC pour 2 ans.

Ce retard est dû à plusieurs éléments, en particulier :

1) la lourdeur d'ouverture de 42 centres à travers la France, 2) la diminution de l'incidence de la toxoplasmose chez la femme enceinte et 3) les pratiques médicales (non conformes aux recommandations de la HAS) qui font que les patientes ne sont pas adressées dans les CPDPN ou bien tardivement, après mise sous Rovamycine.

Au vu de l'importance de cette étude en termes de santé public, le promoteur a accepté de la **prolonger de 2 ans**, moyennant un engagement de la part de l'Investigateur d'augmenter le recrutement de 3.5 (ce jour) à 5 patientes par mois.

Les actions suivantes pour atteindre le nouvel objectif d'inclusions sont les suivantes:

1/ Amendement du protocole :

→ Réduction du nombre de sujet à 240 patientes

→ Elargissement des critères d'inclusion (inclusion de patientes sous spiramycine depuis moins de 10 jours)

→ Réduction de la période de suivi pédiatrique à 6 mois

2/ Ensemble, nous devons accentuer les actions de communications avec nos collègues, notamment dans les réseaux :

→ Envoi il y a 1 mois d'un courrier aux 3500 laboratoires de ville de France leurs rappelant les recommandations HAS et les informant du protocole

→ En projet : envoi de courrier aux obstétriciens de ville

3/ Demande d'un financement complémentaire au PHRC 2013

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

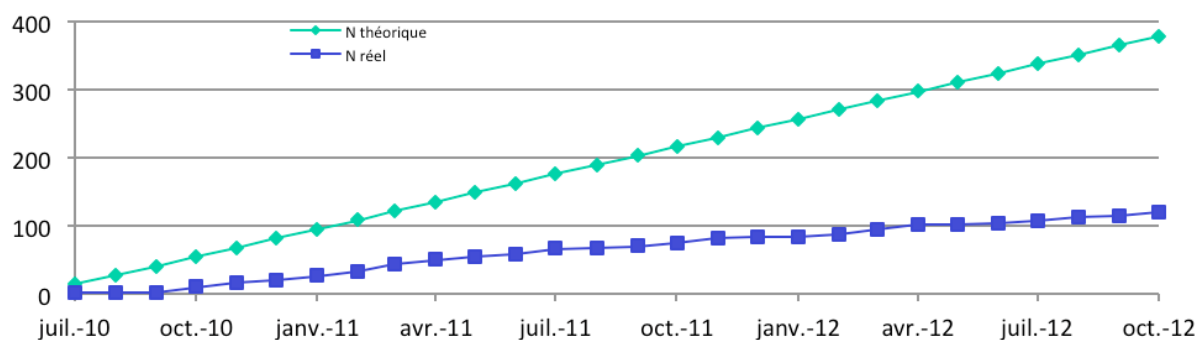
Centre d'Investigation Clinique : CHU Lyon (avec appui du laboratoire de Parasitologie, Pr Peyron, Dr Wallon)

Objectif principal : Evaluer l'intérêt préventif sur les rétinobchoroïdites 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).

Résultats 2012 : Bilan des inclusions au 11/10/12



- Objectif initial = 486 patients sur 3 ans soit 162 par an
- **43 centres actifs sur 77 ouverts**
- Total patients screenés : **297**
- **Total patients inclus au 20/09/2012: 120** (378 patients attendus)
- **164 patients non inclus dont 72 refus des parents**
- **21 patients en prévision**

Inclusions annuelles		
2010	2011	2012
20	63	37

Une prochaine réunion du comité de pilotage aura lieu le 29 mars 2013, à laquelle participera I. Villena.

Pour ces deux PHRC, le Coordonnateur du CNR s'est impliqué 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. Les Laboratoires Associés au CNR de la Toxoplasmose participent à ces deux PHRC. Ces deux PHRC ont démarré en 2010 et font l'objet de réunions régulières par les comités de suivi aux quelles participent le Coordonnateur du CNR. Un bilan annuel des inclusions est présenté aux membres du CNR lors de la réunion annuelle (octobre 2012). Des informations sont régulièrement données par I. Villena aux membres du CNR par mail.

4. Alerte

- a) Décrire la procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal, les événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année
- Analyser des tendances et le fonctionnement du système lors de l'alerte

Des échanges téléphoniques ou sous forme de réunion à l'InVS peuvent avoir lieu lors de phénomènes particuliers (cas groupés ou phénomène épidémiologique anormal) soit sur l'initiative du CNR (alerte InVS) soit à la demande de l'InVS.

En 2012, une nouvelle alerte liée à la sévérité des toxoplasmoses survenues après ingestion par viande de cheval a été remontée à l'InVS en temps réel (I. Villena /V. Vaillant, échanges à partir du mois d'octobre 2012), ce qui a conduit à des prises de décisions de la part de l'InVS avec lettre de la Directrice de l'InVS adressée à la DGS pour alerter les autorités sanitaires sur ce phénomène (lettre adressée le 5 mars 2013, cas décrit en **Annexe 9**).

En 2012, 22 cas groupés de toxoplasmose sont survenus chez des militaires en Guyane Française. L'alerte a été donnée par un médecin épidémiologiste de l'armée (Dr Pommier de Santi) et l'enquête a été menée avec la CIRE Antilles-Guyane. Des mesures d'hygiène ont permis d'enrayer l'épidémie.

Les alertes sur des cas de toxoplasmoses sévères ou des épidémies sont signalées par les laboratoires membres du réseau du CNR au responsable du Pôle Epidémiologie, coordonnateur du CNR qui en réfère à l'InVS (au DMI, service des alertes des infections à transmission alimentaire ou au responsable de la toxoplasmose –V. Goulet/ M Tourdjman depuis octobre 2012). L'InVS avec le CNR et éventuellement les CIRE conduisent l'enquête épidémiologique. Si des morceaux de viande doivent être récupérés, le CNR contacte le LNR pour assurer le rapatriement du ou des morceaux lorsque ceux ci sont disponibles au domicile des patients. Ce système de fonctionnement des alertes est régulièrement rappelé aux membres du CNR par le Coordonnateur.

b) Descriptif des phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année pour la réactovigilance

- **Faux positifs en IgG (réactif IgG toxoplasmose sur automate Access de Beckmann) au cours de l'expertise.** Lors de l'expertise sur un panel de sérums tout venant nous avons constaté un pourcentage élevé (10%) de faux positifs en IgG dans la population des patients non immunisés (n=200) (IgG et IgM négatifs avec les techniques de référence). Ces résultats ont été transmis à la société Beckmann qui a effectué une nouvelle expertise sur les 200 sérums négatifs dont la spécificité, qui était en première analyse de 90% (20 faux positifs sur 200) et après une centrifugation préalable (non recommandée dans la notice) était de 99%. Seuls 2 faux positifs (taux limites) (annexe 1). Le groupe de travail décide de poursuivre l'expertise de ce réactif mais a sollicité la société Beckmann afin qu'elle rédige un courrier d'information aux utilisateurs dans lequel une recommandation d'une centrifugation préalable sur les échantillons notamment provenant de sérothèque et congelés devra être mentionnée.

- **Faux positifs en IgG en routine (réactif IgG Architect d'Abbott).** Plusieurs centres experts ont constaté des faux positifs en IgG avec le réactif Abbott Architect. Un signalement a été fait auprès de l'ANSM et une mise en garde a été adressée aux utilisateurs par le fabricant.

5. Activités d'information, de formation et de conseil

- a) Lister les enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

CHU Angers

Enseignement

- Faculté de Médecine, Angers : enseignements dans le cadre du Diplôme d'Etudes Spécialisés de Biologie médicale, Module de Parasitologie-Mycologie : séminaire local sur le thème de la toxoplasmose (4h de cours; 4h de TD)
- IUT, Angers : enseignements dans le cadre du Diplôme Universitaire de Technologie, Analyses Biologiques et Biochimiques, Module "Immunologie, Hématologie et Parasitologie" : diagnostic biologique de la toxoplasmose (2h de cours; 2h de TD; 7h de TP)
- UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénierie de la Santé, Angers : enseignement dans le cadre de l'UE "Grossesse" : prévention et diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale (2h de cours)

CHU Besançon

Enseignement

- Cours et TP aux étudiants en Médecine en DCEM 1
- Enseignement aux internes en DES biologie médicale

CHU Bicêtre

Enseignement

- "Toxoplasmose" cours magistral en DCEM3 au cours du certificat optionnel de parasitologie Faculté de Médecine Paris XI-Sud

CHU Bichat

Enseignement :

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

CHU Bordeaux

Enseignement

- Cours magistral et enseignement dirigé, PCEM2, UFR médecine Université Victor Ségalen
- Cours magistral, 4^{ème} et 5^{ème} années de pharmacie, UE Microbiologie Spécialisé, faculté de pharmacie, Université Victor Ségalen
- Cours magistral et formation pratique au Laboratoire, DES de parasitologie et Mycologie Médicales, internes médecine et pharmacie, UFR médecine et faculté de pharmacie, Université Victor Ségalen
- EPU « maladie infectieuse et grossesse » organisé par le CPDNP (centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal) du CHU de Bordeaux

CHU Brest

Enseignement

- DFGSM 3 et Ecole Sages-femmes 2^{ème} année: Toxoplasmose. 2 heures de cours magistral.
- Ecole Sages-femmes 2^{ème} année: cas cliniques sur la toxoplasmose 1 heure de TP.
- Ecole de Sages-femmes 4^{ème} année: Cas cliniques sur la toxoplasmose. 2 heures de TD.
- DES de Biologie médicale: 10 heures (eq ED)/an + formation pratique
- IUT de Brest : toxoplasmose cours magistral 1 heure

CHU Caen

Enseignement

- Etudiants en médecine (L3) : 1 heure de Cours magistral sur la toxoplasmose
- Etudiants sage-femmes (L2) : 1 heure de Cours magistral sur la toxoplasmose

CHU Cochin

Enseignement

- DES de Parasitologie Mycologie enseignement de la Toxoplasmose : Faculté de Médecine Paris 5 (Observatoire), ED (5h).
- Certificat de Microbiologie, Parasitologie et Maladies Infectieuses enseignement de la Toxoplasmose : Faculté de Médecine Paris 5, cours (1h) et ED (3h).

CHU Dijon

Enseignement

- Deuxième cycle (2^{ème} année) des Etudes Médicales, Faculté de Médecine, Dijon
- Cours de Parasitologie - 4^{ème} année de Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Dijon
- DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie), Dijon
- Cours à l'Ecole de Sages-femmes

CHU Grenoble

Enseignement

- Deuxième cycle (3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème} 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 et ED de MED2 «Protozoose : Toxoplasmose» (4h)
- Cours de DESS de Biologie Médicale, spécialité Parasitologie Mycologie : « Toxoplasmes et Toxoplasmose » et 3 TP centrés sur les protozoaires tissulaires (environ 8h)

CHU Limoges

Enseignement

- Cours sur la toxoplasmose : 3^{ème} année de médecine, 2^{ème} année de sages-femmes,
- Master 1^{ère} et 2^{ème} année

Formation

- Accueil de stagiaires au CNR pôle souches
 - Stéphane Simon, Université Antilles-Guyane (juin 2012)

Expertise

- Expert auprès de l'ECDC (ML Dardé),
- Expert ANSM

CHU Marseille

Enseignement

- DES de Parasitologie et Mycologie médicale
- L2 cours module agents infectieux
- L3 stage hospitalier
- 5^{ème} Année hospitalo-universitaire Pharmacie
- DU de Santé humanitaire
- DU de Surveillance épidémiologique des maladies infectieuses

CHU Montpellier

Enseignement

- Deuxième cycle (3ème, 4ème, 5ème années) des Études Médicales, Faculté de Médecine, Montpellier
- DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie), Montpellier
- Cours et ED à l'École de Sages-femmes (F. Pratlong)
- Enseignement sur la toxoplasmose à des étudiants infirmiers 2ème année : "Découverte des métiers" (F. PRATLONG)

Formation

- Formation de stagiaires et mémoires :
 - HERAL Marie-Caroline (Externe 5ème année Pharmacie)
Direction du mémoire F. PRATLONG
"Prise en charge des sérologies limites en IgG anti-Toxoplasmes Architect Abbott au CHRU de Montpellier sur un an d'activité : place du Western Blot LDBIO-TOXOII."
Soutenance février 2012.
 - GAILLARD Camille (Externe 5ème année Pharmacie)
Direction du mémoire F. PRATLONG
"Bilan des suivis de réactifs dans le secteur d'Immunologie parasitaire (incluant la toxoplasmose) du
01/01/2011 au 08/08/2012.
Soutenance septembre 2012.

CHU Nice

Enseignement

- Cours sur la toxoplasmose aux étudiants en Médecine en DCEM 1 de la Faculté de Médecine de Nice. (Christelle Pomares 1 heure)
- Cours sur la toxoplasmose aux étudiants en première année de l'École de Sages-Femmes du CHU de Nice. (Pierre Marty 1 heure)
- 16/04/12. Nice. Diplôme Inter-Universitaire (Nice, Marseille, Montpellier) de Médecine Fœtale. Toxoplasmose pour le Parasitologue. (Pierre Marty 1 heure), Toxoplasmose suivi pédiatrique. (Nicole Ferret 1 heure)
- 17/10/12. 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. (Pierre Marty 2 heures)

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

Enseignement

- D1 et Master 1
- DU œil et médecine interne
- DES de biologie médicale
- DU de parasitologie (toxoplasmose), Université de Rabat
- UPR, journée toxoplasmose, Université de Rabat

CHU Poitiers

Enseignement

- DCEM1 : Faculté de Médecine, Poitiers
- DES de Biologie Médicale (Médecine et Pharmacie), Poitiers
- Cours à l'Ecole de Sages-femmes de Poitiers

CHU Reims

Enseignement

- Toxoplasmose et grossesse : Cours Ecole de sages-femmes
- Cursus médical (L3) Cours sur la Toxoplasmose (3h)
- Formation des Internes en Diplôme d'Etudes Spécialisés de Biologie Médicale avec Cours « Toxoplasmose » dispensé en commun aux Internes de Amiens, Caen, Reims et Rouen.
- M1 Santé: Cours et TD sur « Mécanismes d'invasion et facteurs de virulence chez *T. gondii* ; Physiopathologie des interactions cellules-parasite : exemple des Apicomplexa ». (I. Villena, D. Aubert, 14h).
- M2 Recherche: Cours et TD sur « 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* » (I. Villena, D. Aubert, 8h).

Formation

- Accueil d'une stagiaire (Dr en Pharmacie) du Burkina Faso : Dr Sanata BAMBA : du 20 05 au 13 07 2012 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.

Dans le cadre de cet échange, I.Villena est allée au Burkina Faso pour cadrer les études entreprises par S Bamba sur la prévalence de la toxoplasmose humaine et animale à Bobo Dioulasso. I. Villena a donné deux conférences sur la toxoplasmose (une pour le staff de gynécologie et pédiatrie du CHU de Bobo Dioulasso et l'autre pour les étudiants de l'Université.

- Accueil d'un stagiaire (Dr en Médecine) du Sénégal : Dr Jean Louis NDIAYE, Docteur au service de Parasitologie FMPOS-UCAD, Dakar. Typage de souches toxoplasmiques, du 20 au 24 février 2012.
- Accueil stage de recherche Master 1 : Alexandre VILLENA (du 01/07/2012 au 15/08/2012) sur génotypage souches de *T.gondii* (PCR Multiplex/ RFLP) ; Adrien FOURNIER (septembre 2012) Expression de Métalloprotéases chez *T. gondii*.
- Antoine HUGUENIN, externe DCEM4 (du 26/12/2011 au 28/03/2012)

Formation Adria Rennes, 20 – 22 septembre 2012 – Parasites pathogènes alimentaires. (I. Villena)

Expertise

- Laboratoire relais ABBOTT. Expertise pour les clients ABBOTT travaillant avec la gamme de produits sur la Toxoplasmose (réalisation d'analyses spécifiques et interprétation des résultats obtenus en cas de difficulté d'interprétation).
- Expertise des sérologies à problèmes pour les LABM.
- Expert ANSES : I. Villena, présidente du Comité d'Expertise Spécialisé Microbiologie (janv-nov2012) puis expert CES Biorisk (nov-déc 2012).
- I. Villena, membre du conseil scientifique et comité éditorial pour les revues Spectra Biologie et Annales de Biologie Clinique. Membre du comité BEH (février 2013)

CHU Rennes

Enseignement

- Master 2 Domaine « Science, technologie, Santé » mention Biologie, spécialité Génomique Fonctionnelle et Santé, UE « Interactions cellulaires et moléculaires hôte-pathogène » (parcours SCMV) (Rennes)
Cours: « *Toxoplasma gondii* : invasion cellulaire et interactions hôte – parasite » (2h)
- Master 1 (Rennes) (UE6A) : « Microbiologie fondamentale et Santé : bases expérimentales de la virulence des agents infectieux », Domaine « Science, technologie, Santé » mention Biologie, spécialité Sciences cellulaires et moléculaires du vivant (SCMV) :
Cours : « Circulation de *Toxoplasma gondii* chez ses hôtes intermédiaires : virulence parasitaire et réponses adaptatives de l'hôte » (2h)
- Master 1 (Brest) UE « Parasitologie et Mycologie fondamentales et appliquées »
Cours : « *Toxoplasma gondii* : impact de la virulence et de l'interaction hôte-parasite sur la circulation chez les hôtes intermédiaires » (2h)
- Conférence à l'Université d'Oxford : Keble College, 2012 : « It's not only the cat that did : how to prevent and treat congenital toxoplasmosis » (1/2h).
Dans le cadre du Cours international « Infection and Immunity in Children Xth » organisé par l'European Society of Pediatric Infectious Diseases (Oxford, 26-28 juin 2012)

CHU Rouen

Enseignement :

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

CHU Saint-Louis, Université Paris Diderot

Enseignement

- Enseignements de l'UFR médicale de l'Université Paris Diderot pour les étudiants de L3 : cours sur la toxoplasmose, ED sur le diagnostic microbiologique des infections materno-fœtales
- Unité d'enseignement " diagnostic microbiologique " du master Infectiologie Microbiologie, Virologie, Immunologie (IMVI) 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 sérologie et de biologie moléculaire

CHU Strasbourg

Enseignement

- 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 » (Responsable de l'organisation de l'enseignement)

- Module optionnel de « Modèles animaux»
- Module optionnel « Médecine et environnement »
- Externes en médecine et en pharmacie en stage de laboratoire : charge d'encadrement estimée à 20 heures annuelles sur la toxoplasmose,
- Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement (eau et parasites)
- UFR d'Odontologie : 1^{ère} année d'Odontologie (parasitologie et mycologie médicale)
- Enseignement intégré, DES de Parasitologie et de mycologie médicale (160 heures)
- Participation à la formation des sages-femmes et des paramédicaux, Ecole Sage Femmes
- Diplôme Universitaire de Pathologie Tropicale de l'ULP (DU et DUI)
- Formation médicale continue : Bio Format et FMC de l'UDS
- Stratégie de l'exploration biologique des infections materno fœtales : toxoplasmose, Faculté de médecine, ½ heure
- Enseignement Post Universitaires, Laboratoire Biogroup, 1 heure.

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 DFGSM3 UPS, Facultés de Toulouse Purpan et Toulouse Rangueil
- Cours M1 « Physiopathologie des infections »
- Cours M2 Pro « Diagnostics Microbiologiques »

CHRU Tours

Enseignement

- Formation des Internes en Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale avec Cours « Toxoplasmose et Sérodiagnostic de la toxoplasmose ».
- Formation des Externes en pharmacie en stage de laboratoire : Cours « Toxoplasmose » et formation au sérodiagnostic de la toxoplasmose.
- Formation des étudiants Techniciens de laboratoire médical : Cours « Toxoplasmose » et Travaux pratiques sur le sérodiagnostic de la toxoplasmose.

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

1) 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) 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)
- Les résultats de l'évaluation des réactifs de détermination de l'avidité des IgG toxoplasmique ont donné également lieu à une publication dans Clinical Vaccine Immunology (2013).
- Une étude sur les cas de séroconversions toxoplasmiques sans IgM ou avec IgM fugace a été menée et les résultats sont en cours de publication (2013).
- 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 Sérologie a défini des conduites à tenir pratiques et techniques dans certaines situations techniques délicates rencontrées dans les laboratoires experts.

2) 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, MP Brenier-Pinchart, L-S de Grenoble, Y. Sterkers et P. Bastien, L-A Montpellier) avec la participation de I. Villena en 2011. Il est à la disposition des biologistes sur le site internet du CNR.
- Un **deuxième volet de recommandations, plus techniques**, sur le diagnostic de la toxoplasmose congénitale par **biologie moléculaire**, destiné aux professionnels de santé, a été abordé en 2012; il s'adresse aux biologistes amenés à réaliser ce diagnostic moléculaire. Ces travaux sont difficiles en raison de l'extrême diversité des pratiques et du niveau de preuves quasiment inexistant concernant ces aspects. Plusieurs thèmes ont été abordés par le groupe de travail mais n'ont pas été finalisés : pré-analytique des échantillons de liquide amniotique (L-S de Paris-Cochin et L-A de Montpellier) ; PCR sur sang de cordon à la naissance (L-S de Strasbourg et L-S de Toulouse) ; inoculation à la souris (L-S de Rennes, L-S de Paris-Pitié et L-S de Lille)... En raison de données éparses, peu étayées et mal documentées, il apparaît très difficile au Pôle BioMol de faire des recommandations sur ces thèmes. Les aspects techniques concernant purement la PCR seront abordés en 2013.
- 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.

- c) Décrire les modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR : (i) Rétro-information aux partenaires et / ou (ii) Diffusion aux professionnels : conférences, Site web

1) 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 25.10.2012 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 décembre 2012).

- 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 Sérologie communique les résultats des enquêtes réalisées sur les réactifs aux membres du CNR lors de la réunion annuelle du CNR. Il propose des publications associant l'ensemble des membres du CNR après recueil des avis des membres.

- Le Pôle Biologie Moléculaire communique les résultats des différentes enquêtes menées :

- CQE national annuel et enquête associée : diffusion par courriel à tous les participants.

- Liste détaillée des techniques utilisées par l'ensemble du réseau (de façon à indiquer des référents pour telle ou telle technique) : diffusion par courriel à tous les participants, de façon à faciliter les contacts et fournir des référents possibles pour certaines méthodes. Ceci est indispensable au vu de la persistance d'une grande diversité de méthodes moléculaires.

2) Diffusion aux professionnels :

- 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://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr>), 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 est mise à jour annuellement (dernière mise à jour le 18/12/2012).

Afin d'améliorer la présentation du site et d'y déposer des documents spécialisés réservés aux professionnels de santé, la configuration du site a été revue en 2012 avec mise en place d'un accès réservé aux membres du CNR par mot de passe (Annexe 10). Une version du site sera traduite en anglais en 2013 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 (<http://www.crb.toxo.com>), hébergé par le CHU de Reims, ce site présente un lien avec le site du CNR.

La secrétaire du Laboratoire Coordonnateur assure la maintenance et la mise à jour du site internet en lien avec le responsable du CNR. Les membres du CNR peuvent adresser des documents qu'ils souhaiteraient déposer (publications, conseils...).

- d) Décrire les 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) 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 2012, cette adresse a géré 215 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.

Activité de conseil pour la sérologie toxoplasmique :

En 2012, le Pôle Sérologie a été sollicité par des biologistes de ville et des membres du CNR pour des conseils sur la nature des solutions techniques à apporter suite à la rupture de stock de produits commercialisés par la Société Biomérieux (Toxoscreen et ISAGA IgM et IgA). Un courrier a été rédigé en juillet par les Prs Candolfi et Villena et adressé à tous les correspondants du CNR visant à proposer des solutions de remplacement. Le Laboratoire de Reims accepte de traiter ponctuellement des sérologies (avec des tests d'agglutination développés en interne) dans le cadre de son activité de CNR, afin d'aider à l'interprétation des dossiers en particulier pour la datation d'infection toxoplasmique chez les femmes enceintes ou pour confirmer le diagnostic de toxoplasmose congénitale.

Afin de préparer l'accréditation des laboratoires du CNR pour la sérologie toxoplasmique, le groupe de travail du Pôle a réalisé un questionnaire pour recenser les **différents EEQ** utilisés dans le cadre du diagnostic sérologique de la toxoplasmose, les paramètres analysés dans ces EEQ ainsi que les avis argumentés sur ces EEQ. Le questionnaire aborde également les attentes des laboratoires concernant ces EEQ (qualification, prix, fréquence annuelle) et rédigera ainsi un document sur l'ensemble de ces réponses, permettant de proposer des recommandations pour guider à l'avenir les laboratoires dans le choix d'un EEQ.

Pour certains paramètres comme les ISAGA IgM et IgA, l'IF, le dye test, l'agglutination, l'avidité des IgG, le groupe de travail du Pôle propose que ces techniques soient réalisées sur les EEQ existants (CTCB, Biologie prospective...) et que les résultats soient analysés

entre les différents participants (à condition d'avoir un minimum de labo participants : 6 minimum). Pour les paramètres pour lesquels les EEQ ne peuvent être utilisés (par exemple : WB II IgG et WB comparatifs) le groupe propose d'organiser des **CIL (contrôles inter laboratoires)** dont les modalités restent à définir (matrice, fréquence, organisation, trame d'expression des résultats et outils d'analyses statistiques communs afin de faciliter leur utilisation dans le cadre des validations des méthodes).

Activité de conseil pour le diagnostic par Biologie Moléculaire:

- Recommandations sur le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale (à l'attention des professionnels de santé) : mise en ligne sur le site du CNR.
- Recommandations "techniques" par téléphone ou par courriel au cas par cas, selon les demandes des professionnels (environ 20 demandes par an).

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

- Expert ANSES: I. Villena, présidente du Comité d'Expertise Spécialisé Microbiologie (sept 2012) puis renommée expert CES Biorisk (depuis octobre 2012) et co-directeur USC Epitoxo avec P. Boireau (LNR Maisons Alfort) . I. Villena est également entrée au comité de rédaction du BEH en février 2013, succédant à T. Ancelle.

- Expert ECDC et ANSM: 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 et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6a : Décrire les activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

Pour chacun de ces travaux, rappeler (i) les objectifs ; (ii) Les partenariats et l'apport du CNR, (iii) L'état d'avancement et le cas échéant les principaux résultats.

6a-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 :

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

Objectif : comprendre la dynamique de circulation des protozoaires dont *T gondii*

- 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. Des plans de surveillance ont ainsi été menés en 2007 (surveillance de la viande ovine) et 2009 (surveillance de la viande bovine). Nous poursuivons l'étude des modes de contaminations concernant les viandes de cheval (plan de contrôle fin 2012 suite aux cas sévères de contamination toxoplasmique consécutifs à l'ingestion de viande de cheval), de porc (plan de surveillance 2013) pour mieux caractériser le risque de contamination humaine.

Une étude visant à 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 de l'EA 3800, Laboratoire coordonnateur 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, 2010-2013).

- 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* est actuellement 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, soutenance décembre 2013). Une étudiante en master 2 (Lea Limpalaer) est actuellement aussi impliquée dans ce programme.

L'équipe de Limoges (Pr Dardé) collabore également à ces programmes de recherche.

Pathogénicité de *Toxoplasma gondii*

Objectif : Identifier une ou des protéase(s) parasite(s) impliquées dans la pathogénicité de *T. gondii*.

- Nous étudions la capacité de ce parasite à traverser la matrice extra-cellulaire 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* est démontrée en modèle *in vitro* (*travaux en cours.*), Ce travail est mené en collaboration avec des équipes de Biochimie de la SFR CAP-SANTE (Universités Reims/Amiens) .

- Un autre aspect de la pathogénicité réside dans la résistance des souches de *T. gondii* aux anti-toxoplasmiques. Cet aspect est développé par le laboratoire Coordonnateur dans le cadre d'une thèse d'Université encadrée par le Pr Villena (voir 6a-2 Pôle Souches).

6a-2 Pôle Souches:

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.

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.

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'Immunodéficience Humaine de Cayenne: Nacher Mathieu
- Laboratoire de Parasitologie / Mycologie : Carme Bernard (CNR pôle épidémiologie)

Centre Hospitalier de l'Ouest guyanais, Guyane française

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

Etat d'avancement :

Inclusions terminées en 2012. Exploitation en cours.

Génotypes et toxoplasmoses congénitales à 5 ans

Objectif principal :

Analyser les liens entre génotypes multilocus (type II) et évolution des toxoplasmoses congénitales à 5 ans.

Partenariats :

Tous les membres du réseau du CNR contribuant à l'envoi de données cliniques et de souches

Financement :

Région Limousin (financement d'un post-doctorant, Rym El-Abed)

Caractérisation par protéomique et transcriptomique des mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez *Toxoplasma gondii* (Doliwa Christelle, thèse d'Université de Reims Champagne-Ardenne)

Objectif principal: Caractériser les mécanismes de résistance à la sulfadiazine chez *T. gondii*

Etat d'avancement :

L'utilisation de souches naturellement résistantes à la sulfadiazine (fournies par le CRB Toxoplasma) ou de souches poussées en résistance développées au cours de cette thèse (Doliwa et al., Exp. Parasitol, 2013) nous a permis, par utilisation d'approches protéomique et transcriptomique, de mettre en évidence l'implication d'une enzyme appartenant à la voie de synthèse des folates, la folylpolyglutamate synthase, dans ces mécanismes de résistances (Doliwa et al, Int. J Parasitol : Drugs and Drugs resistance, 2013)

Partenariats :

Collaboration entre l'EA 3800 (Laboratoire coordonnateur du CNR) et J. Wastling (Université de Liverpool), le Dr Schaeffer (Plate-forme de protéomique, Université de Strasbourg)

Financement : Laboratoire Roche et Région Champagne-Ardenne (Financement de thèse, C Doliwa)

6a-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 gondii* 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. D'un point de vue plus fondamental il reprend les données acquises par le pôle Souches 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.

6a-4 Pôle Biologie Moléculaire:

Montpellier (Laboratoire Associé) :

- **Etude rétrospective portant sur les performances du diagnostic anténatal** sur 11 ans sur une cohorte de 344 séroconversions au cours de la grossesse : en-dehors de la confirmation d'une augmentation de la sensibilité du diagnostic moléculaire anténatal (à 86%), l'intérêt des résultats négatifs a été revisité en fonction du terme de la grossesse à la contamination (Sterkers Y*, Pratlong F* et al., JCM 2012, 20:3944-51).
- **Evaluation d'un kit de PCR-*Toxoplasma*** (incluant l'extraction d'ADN) par comparaison avec la méthode "maison": le test commercial a montré des performances analytiques nettement inférieures à la méthode "maison; mais surtout, testé en diagnostic clinique sur 33 liquides amniotiques, sa sensibilité s'est révélée très insuffisante puisqu'il ne détectait que la moitié des échantillons positifs avec l'autre méthode (Morelle C. et al., JCM 2012, 50:3977-82).

Grenoble (Laboratoire Support du Pôle Biologie Moléculaire) :

- **Participation au PHR 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*

6b. Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

(I) Publications nationales

2013

SAUER A., VILLARD O., BOURCIER T., SPEEG-SCHATZ C., CANDOLFI E. Ocular toxoplasmosis: From pathophysiology to microbiological diagnosis. *J. Fr. Ophthalmol.*, 2013, 36, 76-81.

2012

DARDÉ ML., PEYRON F. Toxoplasme et toxoplasmose. *Emc Pédiatrie-Maladies Infectieuses*, 2012, vol 7, n°4.

DESOUBEUX G., PERRET-GALLIX K., MACHET MC., SIRINELLI A., BAILLY E., VAN LANGENDONCK N., CHANDENIER J. Toxoplasmic cyst and heart transplant: a case report of serological reactivation in an acute graft rejection context. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*., 2012, 70, 323-8.

GARABEDIAN C, LE GOARANT J, DELHAES L., ROULAND V, VAAST P, VALAT AS, SUBTIL D, HOUFFLIN-DEBARGE V. Periconceptional toxoplasmic seroconversion: About 79 cases. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)*., 2012, 41, 546-52.

GINSBOURGER M., GUINARD A., VILLENA I., KING L.A., EL-EID N., SCHWOEBEL V. Toxi-infection alimentaire collective à *Toxoplasma gondii* liée à la consommation d'agneau, Aveyron (France), novembre 2010., *Bull. Epidémiol. Hebd.*, 2012, 16-17, 195-7.

VILLENA I., La Toxoplasmose – état de la situation en 2012 – Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur, 2012, 210, 6-10.

(ii) Publications internationales

2013

DELHAES L., YERA H., ACHE S., TSATSARIS V., HOUFFLIN-DEBARGE V. Contribution of molecular diagnosis to congenital toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013, sous presse.

DOLIWA C., ESCOTTE-BINET S., AUBERT D., VELARD F., SCHMID A., GEERS R., VILLENA I. Induction of sulfadiazine resistance *in vitro* in *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.*, 2013, 133, 131-6.

DOLIWA C., XIA D., ESCOTTE-BINET S., NEWSHAM EL., SANDERSON SJ., AUBERT D., RANDLE N., WASTLING JM., VILLENA I. Identification of differentially expressed proteins in sulfadiazine resistant and sensitive strains of *Toxoplasma gondii* using difference-gel electrophoresis (DIGE). *Int. J. Parasitol.*, 2013, 35-44.

FRICKER-HIDALGO H., CIMON B., CHEMLA C., DARDE ML., DELHAES L., L'OLLIVIER C., GODINEAU N., HOUZE S., PARIS L., QUINIO D., ROBERT-GANGNEUX F., VILLARD O., VILLENA I., CANDOLFI E., PELLOUX H. And the network from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. Toxoplasma seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicentre study. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, (accepté, en cours de révision)

SOBANSKI V, AJZENBERG D., DELHAES L., BAUTIN N, JUST N. Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2013, Sous presse.

VILLARD O., BREIT L., CIMON B., FRANCK J., FRICKER-HIDALGO H., GODINEAU N., HOUZE S., PARIS L., PELLOUX H., VILLENA I., CANDOLFI E.; and the French National Reference Center For Toxoplasmosis Network. Comparison of four commercially available aviditytests for Toxoplasma -specific IgG antibodies. *Clin Vaccine Immunol.*, 2013, 20,197-204.

XIAO J, VISCIDI RP, KANNAN G, PLETNIKOV MV, LI Y, SEVERANCE EG, YOLKEN RH, DELHAES L. The Toxoplasma MAG1 peptides induce sex-based humoral immune response in mice and distinguish active from chronic human infection. *Microbes Infect.*, 2013, 15, 74-83.

ZIMMERMANN S., HADASCHIK E., DALPKE A., HASSEL JC., AJZENBERG D., TENNER-RACZ K., LEHNERS N., KAPAUN A., SCHNITZLER P. Varicella-like cutaneous toxoplasmosis in a patient with aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, 51, 1341-4.

2012

AJZENBERG D. High burden of congenital toxoplasmosis in the United States: the strain hypothesis? *Clin. Infect. Dis.*, 2012; 54,1606-7.

ALVARADO-ESQUIVEL C., GARCIA-MACHADO C., ALVARAO-ESQUIVEL D., VITELA-CORRALES J., VILLENA I., DUBEY JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic sheep in Durango State, Mexico. *J. Parasitol.*, 2012, 98, 271-3.

ALVARADO-ESQUIVEL C., GONZALEZ-SALAZAR A., ALVARADO-ESQUIVEL D., ONTIVEROS-VASQUEZ F., VITELA-CORRALES J., VILLENA I., DUBEY JP. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in chickens in Durango State, Mexico. *J. Parasitol.*, 2012, 98, 431-2.

BAMBA S., SOME DA., CHEMLA C., GEERS R., GUIGUENDE TR., VILLENA I. Analyse sérologique de la toxoplasmose pergravidique : evaluation des risques et perspectives du dépistage prenatal au Centre Hospitalier Universitaire de Bobo Dioulasso au Burkina Faso. *Pan. Afr. Med. J.*, 2012, 12-43.

BERAL M., ROSSI S., AUBERT D., GASQUI P., TERRIER M.E., KLEIN F., VILLENA I., ABRIAL D., GILOT-FROMONT E., RICHOMME C., HARS J., JOURDAIN E. Environmental Factors Associated with the Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Wild Boars (*Sus scrofa*), France. *Ecohealth*, 2012, *Ecohealth*, 2012, 9 : 303-9.

BODAGHI B., TOUITOU V., FARDEAU C., PARIS L., LEHOANG P. Toxoplasmosis: new challenges for an old disease. *Eye (Lond)*. 2012, 26, 241-4.

BORIES P., ZINK E., MATTERN JF., VILLARD O., BERCEANU A., BILGER K., CANDOLFI E., HERBRECHT R., ABOU-BACAR A., LIOURE B. Febrile pancytopenia as uncommon presentation of disseminated toxoplasmosis after BMT. *Bone Marrow Transplant.*, 2012, 47, 301-3.

DEMAR M., HOMMEL D., DJOSSOU F., PENEAU C., BOUKHARI R., LOUVEL D., BOURBIGOT AM., NASSER V., AJZENBERG D., DARDE ML., CARME B. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012,18, 221-31.

DUMETRE A., AUBERT D., PUECH PH., HOHWYER J., AZAS N., VILLENA I. Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78, 905-12.

FAUCHER B., GARCIA-MERIC P., FRANCK J., MINODIER PH., FRANCOIS P., GONNET S., L'OLLIVIER C., PIARROUX R. Long-term ocular outcome in congenital toxoplasmosis: a prospective cohort of treated children. *J. Infect.*, 2012, 64, 104-9.

FAUCHER B., MIERMONT F., RANQUE S., FRANCK J., PIARROUX R. Optimization of *Toxoplasma gondii* DNA extraction from amniotic fluid using NucliSENS easyMAG and comparison with QIA amp DNA minikit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, 64, 1035-9.

FREIRE DE SOUZA G., CARVALHO D., PEDROSA W., FRANCK J., PIARROUX R. Analytical validation of anti-toxoplasma IgG immunoassays. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2012,16, 574-6.

GROH M., FAUSSART A., VILLENA I., AJZENBERG D., CARME B., DEMAR M., et al. Acute lung, heart, liver, and pancreatic involvements with hyponatremia and retinochoroiditis in a 33-year-old French Guianan patient. *PLoS.Negl. Trop. Dis.*, 2012, 6, e1802.

LAMARQUE MH., PAPOIN J., FINIZIO AL., LENTINI G., PFAFF AW., CANDOLFI E., DUBREMETZ JF., LEBRUN M. Identification of a new rhoptry neck complex RON9/RON10 in the Apicomplexa parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One.*, 2012, 7 :e32457.

LELU M., VILLENA I., DARDE ML., AUBERT D., GEERS R., DUPUIS E., MARNEF F., POULLE ML., GOTTELAND C., DUMETRE A., GILOT-FROMONT E. Quantitative estimation of the viability 1 of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78, 5127-32.

L'OLLIVIER C., WALLON M., FAUCHER B., PIARROUX R., PEYRON F., FRANCK J. Comparison of mother and child antibodies that target high-molecular-mass *Toxoplasma gondii* antigens by immunoblotting improves neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Clin. Vaccine. Immunol.*, 2012,19,1326-8.

MORELLE C., VARLET-MARIE E., BRENIER-PINCHART M.P., CASSAING S., PELLOUX H., BASTIEN P., STERKERS Y. Comparative assessment of a commercial kit and two laboratory-developed PCR assays for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, 50, 3977-82.

MURAT J.B., L'OLLIVIER C., FRICKER-HIDALGO H., FRANCK J., PELLOUX H., PIARROUX R. Evaluation of the new Elecsys[®] Toxo IgG Avidity assay for toxoplasmosis and new insights into the interpretation of avidity results. *Clin. Vaccine. Immunol.*, 2012, 19, 1838-43.

ROBERT-GANGNEUX F., DARDE ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for congenital toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2012, 25, 264-96.

SAUER A., PFAFF A.W., VILLARD O., CREUZOT-GARCHER C., DALLE F., CHIQUET C., PELLOUX H., SPEEG-SCHATZ C, GAUCHER D., PREVOST G, BOURCIER T., CANDOLFI E. Interleukin 17A as an effective target for anti-inflammatory and anti-parasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J. Infect. Dis.*, 2012, 206, 1319-29.

STERKERS Y., PRATLONG F., ALBABA S., LOUBERSAC J., PICOT MC., PRETET V., ISSERT E., BOULOT P., BASTIEN P. A novel interpretation of molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis according to gestational age at maternal infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, 3944-51.

SU C., KHAN A., ZHOU P., MAJUMDAR D., AJZENBERG D., DARDE ML., et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 2012; 109, 5844-9.

VILLARD O., CIMON B., FRANCK J., FRICKER-HIDALGO H., GODINEAU N., HOUZE S., PARIS L., PELLOUX H., VILLENA I., CANDOLFI E., and The network from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, 73, 231-5.

VILLENA I., DURAND B., AUBERT D., BLAGA R., GEERS R., THOMAS M., PERRET C., ALLIOT A., ESCOTTE-BINET S., THEBAULT A., BOIREAU P., HALOS L. New strategy for the survey of *Toxoplasma gondii* in meat for human consumption. *Vet. Parasitol.*, 2012, 183, 203-8.

(iii) Communications nationales

2012

BRUNET J., PFAFF AW., KANJO G., SABOU M. et CANDOLFI E. Altérations épigénétiques induites par *T. gondii* dans une cellule-hôte infectée : exemple de la cycline B. Séminaire de Microbiologie de Strasbourg, Strasbourg, 15 mars 2012.

BRUNET J., PFAFF AW., KANJO G., SABOU M. et CANDOLFI E. Altérations épigénétiques et rôle du facteur de transcription UHRF1 dans les cellules infectées par *Toxoplasma gondii*. Congrès de la Société Française de Parasitologie et Mycologie Médicale., Rennes, 9-11 Mai 2012.

COUPPIE P., ABOUD P., BLANCHET D., MAHAMAT A., SIMON S., AJZENBERG D., DARDE ML., CARME B., DJOSSOU F., DEMAR M. Toxoplasmose amazonienne : 1ère observation décrite avec manifestations cutanéomuqueuses. Journées de Dermatologie, JDP 2012, Paris. (Communication affichée).

DOLIWA C., ESCOTTE-BINET S., AUBERT D., WASTLING J. SCHAEFFER-REISS C., VILLENA I. Résistance de souches induite et naturelle à la sulfadiazine chez *T. gondii* : analyse de protéomes. SFP, Club Toxo, Institut Cochin, juin 2012 (communication affichée).

L'OLLIVIER C., WALLON M., FAUCHER B., PIARROUX R., PEYRON F., FRANCK J. Intérêt des antigènes de hauts poids moléculaires dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale par immunoblot. *Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale*, Rennes, 9-11 mai 2012. (communication affichée).

MAMMARI N., DARDE ML., COURTIOUX B. Étude *in vitro* de la réponse immunitaire inflammatoire au cours de la toxoplasmose encéphalique humaine. Société Française de Parasitologie, Rennes, 9 – 11 Mai 2012. (Communication affichée).

MAMMARI N., RIAHI H., LABRUNIE A., DARDE ML., COURTIOUX B. Cinétique d'expression des cytokines et des chémokines lors d'une infection toxoplasmique cérébrale humaine in vitro. SFP, Club Toxo, Institut Cochin, Juin 2012. (Communication affichée).

MURAT J.B., VAN ROOYEN J., BELRHALI H., HAKIMI M.A., PELLOUX H. Étude de l'implication de la protéine p43 dans le contrôle traductionnel chez *Toxoplasma gondii*. *Journée de la Recherche Médicale 2012*, Grenoble, 4 mai 2012.

MURAT J.B., L'OLLIVIER C., FRICKER-HIDALGO H., FRANCK J., PELLOUX H., PIARROUX R. Validation du nouveau test Roche Elecsys Toxo IgG avidity : de nouvelles perspectives pour la datation de l'infection toxoplasmique ? *Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale et de la Société Française de Parasitologie*. Rennes, 9-11 mai 2012.

MURAT J.B., VAN ROOYEN J., BELRHALI H., HAKIMI M.A., PELLOUX H. Étude de l'implication de la protéine p43 dans le contrôle traductionnel chez *Toxoplasma gondii*. *Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale et de la Société Française de Parasitologie*, Rennes, 9-11 mai 2012.

SABOU M., BRUNET J., KANJO G., PFAFF A. W., CANDOLFI E. Identification des protéines parasitaires interférant avec le facteur de transcription UHRF1 dans les cellules infectées par *Toxoplasma gondii*. *Réunion du Club Toxo* organisée sous l'égide de la Société Française de Parasitologie et de l'Institut Cochin. Paris, 8 juin 2012.

VAN LANGENDONCK N., DESOUBEUX G., PERRET-GALLIX K., MACHET MC., SIRINELLI A., CHANDENIER J. Kyste toxoplasmique et transplant cardiaque : cas d'une réactivation sérologique dans un contexte de rejet de greffe. *Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale et de la Société Française de Parasitologie*, Rennes, 9-11 mai 2012.

(iv) Communications internationales

2012

AJZENBERG D., COLLINET F., AUBERT D., VILLENA I., DARDE ML., DEVILLARD S., ToxoBs network group. Spatial genetic structure of Type II *Toxoplasma gondii* strains involved in human congenital toxoplasmosis in France. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

BLAGA R., MEDIANNIKOV O., PERRET C., THOMAS M., DEMONCHEAUX JP.,TINE R., DIARRA M., SCANDOLA P., VALLEE I., GUILLOT J., VILLENA I., AUBERT D., DAVOUST B. Serological survey of animal toxoplasmosis in Dakar and in sine-saloum (Sénégal). European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012. (communication affichée).

BLAGA R., HALOS L., PERRET C., AUBERT D., THOMAS M., ALLIOT A., GEERS R., THEBAULT A., BOIREAU P., VILLENA I. Serosurveillance of *Toxoplasma gondii* infection in sheep, bovine and goats of France. Apicomplexa in Farm Animals, Lisbonne, 25-28 octobre 2012.

BOULEAU A.P., BELLON G., BUACHE E., ESCOTTE-BINET S., HORNEBECK W., GARNOTEL R., AUBERT D., VILLENA I. Evidence and partial characterization of a metalloprotease from *Toxoplasma gondii*. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

COLIN DE VERDIERE J., ALLIOT A., PERRET C., THOMAS M., AUBERT D., VILLENA I., LACOUR SA, BOIREAU P., RICHOMME C., BLAGA R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the mediterranean island of Corsica. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

DOLIWA C., ESCOTTE-BINET S., GEERS R., AUBERT D., VILLENA I. Resistance induction of *Toxoplasma gondii* strain by sulfadiazine pressure. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012. (communication affichée).

DUPOUY-CAMET J., YERA H. Prevention of congenital toxoplasmosis. XVIII ICTMM and XVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, Rio de Janeiro, 23-27 septembre 2012.

EUTROPE J., SIADUL E., ROLLAND AC., CIZMAS-POISSONNIER A., VILLENA I., CHEMLA C., PINON JM., Groupe Toxoplasmose de Reims, SOMMER C., SCHMIT G. Psycho-affective development of children affected by congenital toxoplasmosis : about 26 cases. IACAPAP, Paris, 21-25 juillet 2012. (communication affichée).

GOTTELAND C., FORIN-WIART M.A., VILLENA I., POULLE ML., CHARBONNEL N., GILOT-FROMOND E. Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* in Rodents. European Wildlife Disease Association, Lyon, 22-27 juillet 2012.

GOTTELAND D., FORIN-WIART MA., POULLE ML., CHARBONNEL N., GILOT-FROMOND E., VILLENA I. Spatial distribution of soil and animal contamination by *Toxoplasma gondii* in a rural area. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

GOTTELAND C., POULLE ML, CHARBONNEL N., VILLENA I., GILOT-FROMONT E. Spatial distribution of *Toxoplasma gondii* in animal populations and soil. 13 th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Maastricht, 20-24 août 2012.

MAMMARI D, RIAHI H., GATET M., DARDE ML., COURTILOUX B. Infection of human neuronal cells by different strains of *Toxoplasma gondii* in vitro: Analysis of neuronal cytokine and chemokine expression profiles. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.(Communication affichée).

MURAT J.B., VAN ROOYEN J., BELRHALI H., HAKIMI M.A., PELLOUX H. *Toxoplasma gondii* evolves a new architecture for the multi-aminoacyl-trna synthetase complex. *XIth European Multicolloquium of Parasitology*. Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

MURAT J.B., L'OLLIVIER C., FRICKER-HIDALGO H., FRANCK J., PELLOUX H., PIARROUX R. Validation of the Elecsys Toxo IgG Avidity assay for toxoplasmosis: new insights in evaluation of the time of infection ? *XIth European Multicolloquium of Parasitology*. Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

PALOS LADEIRO M., BIGOT A., BONNARD M., BETOULLE S., BEAUDON A., VILLENA I., AUBERT D., GEFFARD A., Bioaccumulation des parasites *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Réseau transatlantique ECOBIM, Reims, 5-8 juin 2012. (communication affichée).

POMARES C., SMETS A., QUETEL J., AJMIA F., FAUCHIER T., DELAUNAY P., MARTY P. Comparative evaluation between ARCHITECT® and VIDAS® toxoplasmosis IgG avidity in pregnant women. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infection, Londres, 31 mars / 03 avril 2012. (communication affichée).

POULLE ML., CARVALHO J., FORIN-WIART MA., VILLENA I., KNAPP J. Presence of *Echinococcus multilocularis* (Em), *Toxocara sp.* and *Toxoplasma gondii* (Tg) in vegetable gardens, North-eastern France. European Wildlife Disease Association, Lyon, 22-27 juillet 2012. (communication affichée).

RAKOTOHARINOME M., ANDRIAMANIVO H., BLAGA R., PERRET C., LACOUR SA., GRASSET-CHEVILLOT A., MACE P., THOMAS M., VILLENA I., AUBERT D., BOIREAU P., PORPHYRE V. Toxoplasmosis and trichinellosis : an epidemiological survey of pig population in Madagascar. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012. (communication affichée).

SABOU M., BRUNET J., KANJO G., PFAFF AW., CANDOLFI E. Identification of parasite proteins interacting with the transcription factor UHRF1 in *Toxoplasma gondii* infected cells. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

VILLENA I., KAPEL N., GUYOT K., DUTOIT E. Human cryptosporidiosis in France : Case notification and genotyping during the 2009-2011 period through the Anofel cryptosporidium network. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

(v) Conférences sur invitations

DARDÉ ML and French Network for *Toxoplasma* strains, ToxoBS. *Toxoplasma* strains and human toxoplasmosis. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

DARDE ML. « *Toxoplasma gondii* : géotypes et structure des populations – Quoi de neuf ? » Club Toxo, Institut Cochin, Juin 2012.

PELLOUX H. European working groups on human toxoplasmosis since the 90's til present. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

PELLOUX H. Toxoplasmosis in immunocompromised patients : what are the key points in 2012 ? European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

PELLOUX H. Quality assessment of PCR for toxoplasmosis : difficulties and examples of collaborative studies. Challenges in the diagnosis and therapy of human parasitosis. European Multicolloquium of Parasitology XI, Cluj-Napoca, 25-29 juillet 2012.

(vi) Contribution à un ouvrage

DUPOUY-CAMET J., TALABANI H., DELAIR E., LESLE F., YERA H., BREZIN A. Risk factors, pathogenesis and diagnosis of ocular toxoplasmosis. In *Toxoplasmosis - Recent Advances*, edited by Olgica Djurković Djaković, 186 pages, Publisher: InTech, Published: September 12, 2012.

7. Programme d'activité N+1 et N+2

Le Laboratoire Coordonnateur proposera en 2013 une convention aux trois Laboratoires Associés permettant de définir les missions de chacun de ces laboratoires et de définir la gouvernance du CNR.

Le site internet continuera d'être actualisé par mise en ligne de rapports ou études et articles publiés par le CNR. Une version du site internet du CNR de la Toxoplasmose sera traduite en anglais pour accroître sa visibilité.

7-1 Perspectives du Pôle Epidémiologie:

- La surveillance de la toxoplasmose congénitale en France se poursuivra en 2013 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), l'ARC du CNR (C Delmas) et le Pôle Epidémiologie (T. Ancelle).

Avec le recul des données du système de surveillance des toxoplasmoses congénitales acquises depuis 2007 ; le Laboratoire Coordonnateur aidé par les Laboratoires Supports du Pôle Epidémiologie évaluera 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) puis avec l'InVS (et le Comité de Pilotage « Toxosurv » lors de la réunion de validation en fin d'année).

A ce titre, le Laboratoire Coordonnateur et le Laboratoire Associé Pôle Biologie Moléculaire sont en cours d'évaluation des cas de faux diagnostic lors des diagnostics anténataux. En 2012, à la suite de l'analyse des cas notifiés en 2011 dans la base de surveillance « Toxosurv », il a été fait un recensement des cas de 2011 pour lesquels le diagnostic anténatal (par biologie moléculaire) avait été négatif mais dont l'enfant a été diagnostiqué en période postnatale comme atteint de toxoplasmose congénitale. Il a été proposé lors de la réunion annuelle (octobre 2012) que les laboratoires concernés adressent leurs prélèvements (ADN extrait à l'occasion du diagnostic par PCR/ échantillon de liquide amniotique natif conservé dans le cadre de la réserve légale) au Laboratoire Associé de Montpellier afin d'effectuer une nouvelle amplification avec les techniques de PCR disponibles dans ce Laboratoire. Les résultats sont en cours d'exploitation et la même démarche sera poursuivie en 2013 (cas rétrospectifs diagnostiqués en 2012). Ainsi, nous tenterons de définir si ces « faux négatifs du diagnostic anténatal » relèvent d'un problème technique (sensibilité analytique) ou d'un passage secondaire du parasite avec transmission après que le diagnostic anténatal ait été fait. Nous analyserons les délais entre la diagnostic anténatal et la mise en évidence de l'infection chez la femme enceinte (délai actuellement recommandé minimum 4 semaines).

- 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 vue i) la restructuration actuelle de la Biologie Médicale avec regroupement de nombreux laboratoires privés ou de laboratoires au sein d'établissements publics de petite taille (CH), ii) la diminution du nombre de cas constatée en 2010 et poursuivie en 2011, iii) la date de l'enquête qui avait conduit à la composition du réseau (année 2006, soit plus de 6 ans actuellement). Toutefois, il s'avère que différentes unités de

l'InVS se sont manifestées pour divers projets avec recueil d'informations auprès des laboratoires d'analyses médicales ; aussi l'InVS souhaite un contact en une seule fois et l'enquête « Toxoplasmose » fera donc partie d'une plus vaste enquête menée par l'InVS mais actuellement encore en cours d'élaboration. Il n'est donc pas sûr que les résultats pour évaluer de l'exhaustivité du recueil des cas de toxoplasmose congénitale diagnostiqués en France soient disponibles avant la fin de l'année 2013.

- 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)...

- Une étude médico-économique sur le programme français de dépistage de la toxoplasmose congénitale va être entreprise en 2013 par le CNR (Pôle Epidémiologie) avec l'InVS (M. TOURDJMAN) sur le modèle de l'étude menée par Eileen Stillwaggon en 2011 aux USA. Pour cela, nous avons contacté en 2012 E. Stillwaggon qui a accepté de mettre à disposition son modèle mathématique en incluant les données épidémiologiques françaises recueillies par le CNR. Cette étude sera une donnée importante lors de la réévaluation du programme de dépistage qui sera conduite par la HAS dans quelques années (tenant compte notamment de l'incidence et de la prévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes, de la prévalence des toxoplasmoses congénitales recueillies annuellement grâce au dispositif de surveillance « Toxosurv », des résultats obtenus par le PHRC national « Toxogest »).

Eileen Stillwaggon, Christopher S. Carrier, Mari Sautter, Rima McLeod. 2011. Maternal Serologic Screening to Prevent Congenital Toxoplasmosis: A Decision-Analytic Economic Model. PLOS Neglected Tropical Diseases.

7-2 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
- Extension du logiciel développé par Epiconcept et le Pôle Epidémiologie (Laboratoire Coordonnateur) « Toxosurv » pour inclure des informations relatives à l'envoi des souches, avec remplissage en ligne du formulaire.

7-3 Perspectives du Pôle Sérologie :

- Poursuite des évaluations des trousse immuno-enzymatiques automatisées pour les IgG et IgM sur les panels plus discriminants :

- o IgG/IgM Biorad/Platelia®
- o IgG/IgM Diasorin/Liaison®
- o IgG/IgM Abbott/Architect®
- o IgG/IgM Roche/Elecsys®
- o IgG/IgM Siemens/Advia Centaur®
- o IgG/IgM Beckmann Coulter/Access®

- Mise à disposition de l'ensemble des biologistes du CNR des résultats d'une enquête sur les EEQ dans le cadre de l'accréditation selon la norme 15189.

- Mise en place d'un Contrôle de Qualité Interlaboratoires pour les paramètres ne bénéficiant pas d'EEQ commerciaux.

- Publications prévues en 2013 :

- o Séroconversions sans IgM ou IgM fugaces

- 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.

7-4 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 doivent aujourd'hui s'engager à utiliser le matériel fourni et à transmettre leurs résultats au CNR, afin d'évaluer l'intérêt retiré de la distribution de ces échantillons.

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 au niveau national la question de l'homogénéisation des performances du diagnostic moléculaire de la toxoplasme à la naissance d'une part (presque un tiers des diagnostics de toxoplasme congénitale) et chez l'immunodéprimé d'autre part (pathologie d'incidence croissante en France).

2. Contrôle de Qualité national en Diagnostic Prénatal de la toxoplasme

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 et obtenues du Pôle Souches) continueront d'être incluses afin de se rapprocher davantage des conditions rencontrées en routine.

Trois CQE seront organisés en 2013 au niveau national.

3. Comparaison de trousse commerciales de PCR-Toxoplasma

L'apparition rapide sur le marché en 2012 de plusieurs trousse de PCR-Toxoplasma sur le marché constitue à la fois une bonne nouvelle et une nouvelle mission pour le Pôle Biologie Moléculaire du CNR. En effet, celui-ci se doit aujourd'hui d'établir une mission de "veille" concernant ces nouveaux réactifs, très attractifs sur le plan de l'accréditation mais dont la valeur diagnostique n'a pas été suffisamment éprouvée (pour mémoire, une étude comparative réalisée en 2011 par le CNR et publiée en 2012 a montré qu'une trousse marquée CE manquait la moitié des diagnostics de toxoplasme congénitale). Cinq trousse supplémentaires ont été repérées par le CNR. Au moins trois d'entre elles devraient faire l'objet d'une évaluation par un ou plusieurs Laboratoires Supports (L-S) cette année. Malheureusement, la rareté des liquides amniotiques (déjà soulignée dans le rapport) rend difficile une évaluation "clinique" et oblige à reposer sur les tests à base d'échantillons artificiels.

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 groupe sur ce sujet seront poursuivies en 2013-2014. Les L-S de Paris-Pitié et Dijon souhaitent travailler sur ce sujet difficile. La difficulté principale consiste à réaliser des échantillons artificiels contenant des inhibiteurs de façon

reproductible et fiable. A la suite de cela, un certain nombre de témoins positifs seront testés et les témoins positifs considérés comme les plus pertinents devraient pouvoir être proposés au réseau comme témoins "standard".

5. Intérêt diagnostique du liquide amniotique prélevé en période périnatale (pendant l'accouchement)

En vue d'une part, du taux encore important de faux négatifs rencontrés au cours du diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale et d'autre part, des défauts de suivi possibles au cours de la grossesse, le diagnostic à la naissance constitue encore environ un tiers de ces diagnostics. Outre le placenta et le sang de cordon, un prélèvement encore assez peu exploré est le liquide amniotique prélevé au cours de l'accouchement. L'intérêt de ce prélèvement pour ce diagnostic sera évalué par le L-S de Paris-Cochin avec les L-S de Strasbourg et Lille.

6. Extension de l'intérêt du Pôle Biologie Moléculaire à la toxoplasmose de l'immuno-déprimé

Afin d'évaluer, même grossièrement, l'incidence nationale de la toxoplasmose de l'immuno-déprimé ainsi que les méthodes moléculaires utilisées en France pour son diagnostic, le L-S de Rennes est en cours d'élaboration d'un questionnaire complet (avec recueil des données épidémiologiques, des données du diagnostic clinique -toxoplasmose cérébrale, oculaire ou disséminée- et du diagnostic biologique) avec l'aide du groupe de travail. Ce questionnaire sera ensuite adressé aux membres du réseau du CNR pour recueillir les pratiques par centres.

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 subdiviser 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 Laboratoire Associé (Pôle Biologie Moléculaire) 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 recommandations de "bonnes pratiques" seront néanmoins travaillées puis proposées au niveau national.