

Diagnostic moléculaire de la toxoplasmose au C.H.R.U. de Montpellier

Analyse rétrospective de 10564 échantillons de janvier 2007 à septembre 2013.

Victor Chaumeau¹, Patrice Ceballos², Nathalie Fégueux², Emmanuelle Varlet-Marie^{1,3}, Sahar Albaba¹, Francine Pratlong¹, Patrick Bastien^{1,3}, Yvon Sterkers^{1,3}

¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (LP₂M), Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, 39 avenue Charles Flahault, 34295, Montpellier cedex 5, France.
²Service d'Hématologie clinique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Hôpital Saint Eloi, 80, avenue Augustin FLICHE, 34295, Montpellier cedex
³Laboratoire Associé (Pôle "Biologie Moléculaire") du Centre National de Référence de la Toxoplasmose

Introduction

La toxoplasmose est le plus souvent asymptomatique, mais est responsable d'une morbi-mortalité pouvant être importante pour le fœtus et en cas d'immunodépression. Le diagnostic de la toxoplasmose est reconnu comme délicat, et l'apport du diagnostic moléculaire a été considérable, tant pour la toxoplasmose congénitale (TC) que pour la toxoplasmose disséminée. Le diagnostic moléculaire est de moindre sensibilité dans le cadre de la toxoplasmose cérébrale et oculaire, pour lesquels la TDM et le fond d'œil gardent une place très importante.

Patients & méthodes

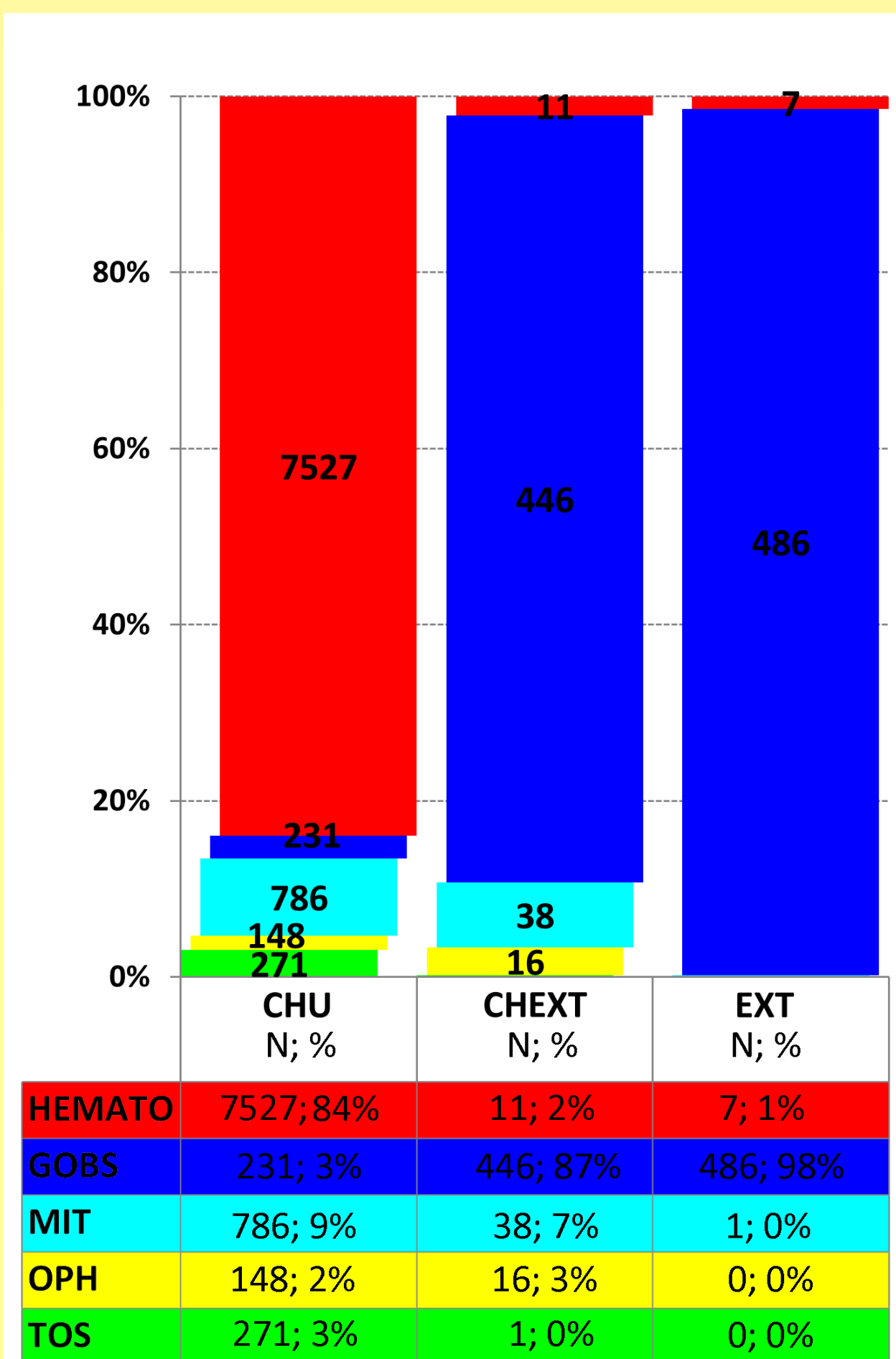
Etude rétrospective des dossiers ayant fait l'objet d'une PCR toxoplasmose. Extraction par le SIL du laboratoire (Galaxie).

Durant toute la période, (i) les méthodes d'extractions sont restées inchangées, "maison" et manuelles: thermolyse pour les échantillons paucicellulaire (LA, LCR et LBA) selon Hohlfeld et al; (N Engl J Med 1994); précipitation Promega pour les échantillons richement cellulaire (Sterkers et al.)

(ii) la PCR a ciblé la région non-codante de 529 bp décrite par Homan et al. en 2000 dans Int. J. Parasitol.. Tout d'abord en PCR conventionnel avec révélation au bromure d'éthidium sur gel d'agarose puis à partir de juillet 2009, une PCR en temps réel révélée en FRET selon la méthode de Reischl et al. (BMC Infect. Dis. 2003) a été mise en place.

Résultats & discussion

Prélèvements: origine et évolution durant la période d'étude

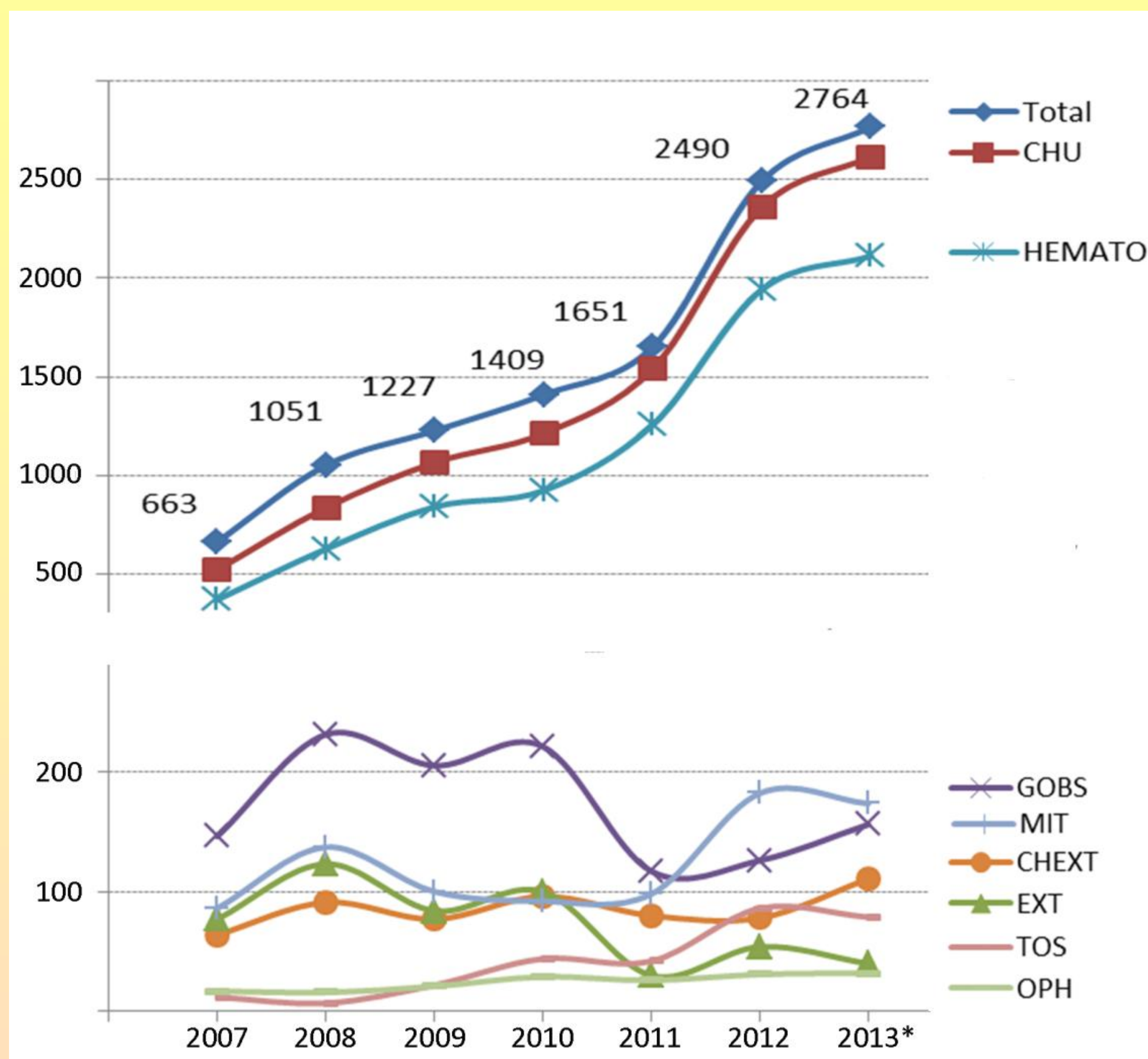


Durant l'étude, 10564 échantillons, soit 3179 patients de 274 prescripteurs différents ont été analysés.

L'origine des dossiers est à 9497 (90%) pour le CHRU de Montpellier (CHU), 569 (5,4%) pour les CH extérieurs (CHEXT) et 498 dossiers (4,7%) pour les prescripteurs privés (EXT).

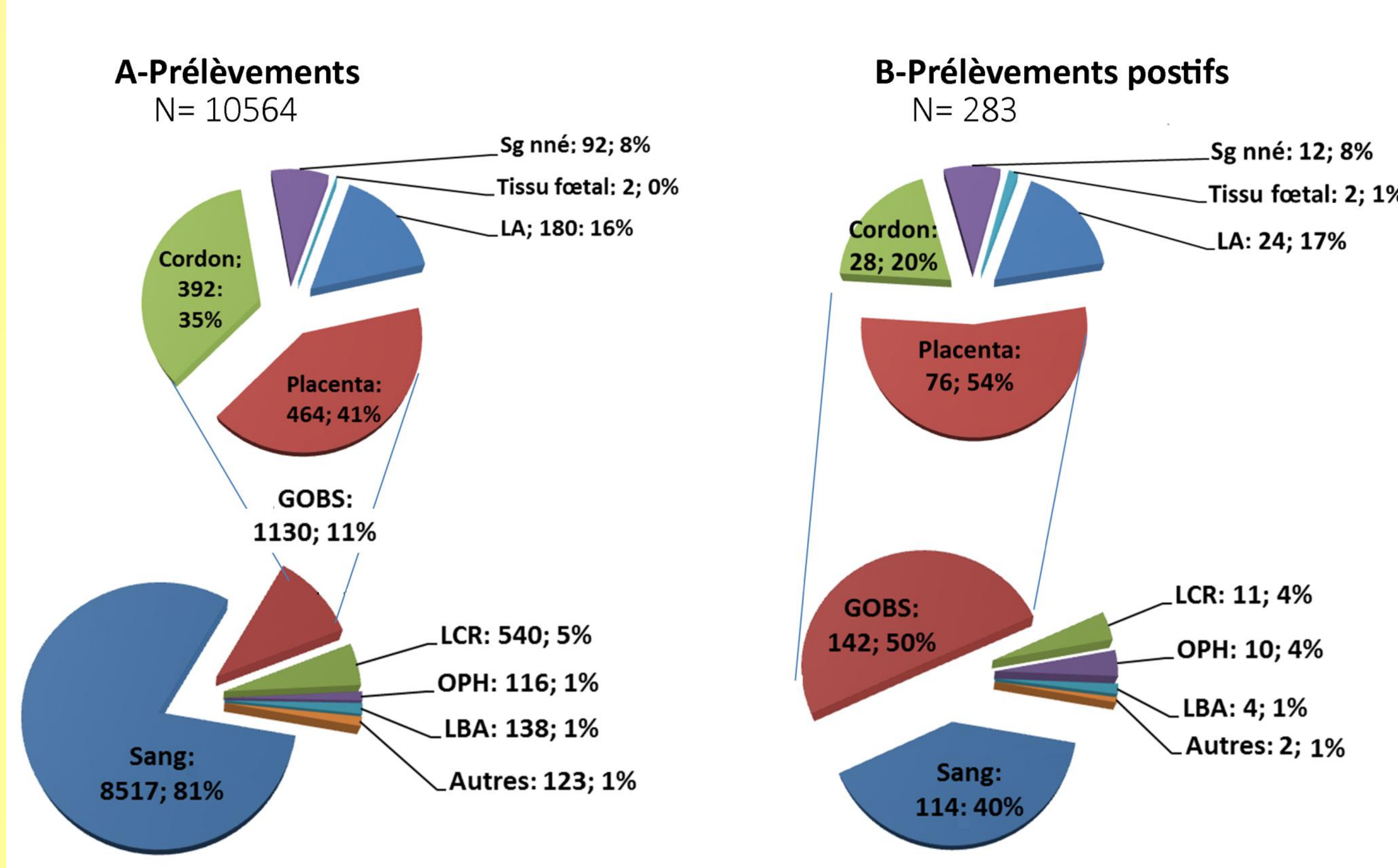
Le premier prescripteur est le Service d'Hématologie clinique du CHRU (HEMATO) avec 7029 dossiers (70%). Inversement, 78 (28%) prescripteurs n'ont adressé qu'un seul prélèvement.

Pour le CHRU, l'Hématologie représente 79% des demandes et l'Obstétrique 2%, alors que, l'Obstétrique représente 87% pour les CH extérieurs et 98% pour les prescripteurs privés. 283 échantillons (sur 10564, soit 2,7%) étaient positifs, soit 236/3179 (7,4%) patients.



L'évolution des demandes a été de >600 à >2500 dossiers annuels. Cette augmentation suit celle des demandes pour l'hématologie qui sont passées de >350 à >2000 dossiers annuels, soit de 58% à 80% des demandes. Le nombre de demande dans le cadre de la TC (GOBS) a été stable à 150 dossiers par an, représentant de 25% à 6% des demandes sur la période.

Diversité des prélèvements, les positifs, les charges parasitaires et la mortalité



Le type de prélèvement le plus représenté est le sang avec 81% des échantillons analysés, puis viennent les prélèvements réalisés dans le cadre de la TC (11%). Lorsque l'on considère les positifs, 50% sont réalisés par les demandes d'obstétrique.

La répartition des résultats positifs par cadre nosologique est :

- (i) pour la TC de 142/1143 échantillons (12%),
- (ii) pour les "allogreffés" de 98/7159 échantillons (1,4%) soit 38/567 patients (6,7%),
- (iii) pour les autres immunodéprimés (Hémato classique, VIH et TOS) de 36/1478 échantillons (2,7%) et 25/911 patients (2,7%),
- (iv) pour l'ophtalmologie de 7/164 échantillons (4%).

Le Ct observé est très faible; toutes indications et tous échantillons confondus: Ct=32±4 [17-41], et Ct=30±4 pour le liquide amniotique.

Le délai de rendu de résultat est très court, à 2,38 j dans la période, malgré l'augmentation de la charge de travail il est passé de 3,8j en 2007-2009 (cnPCR) à <2 j de 2010-2013 (qrtPCR). Pour le liquide amniotique, ces chiffres sont encore plus faibles avec 1,3j, 1,5j et 1,2 j respectivement pour la période totale, cnPCR et qrtPCR. Dans 77% des cas le LA a été rendu le jour même ou le lendemain. Pour le placenta le délai est passé de 6j à <4j.

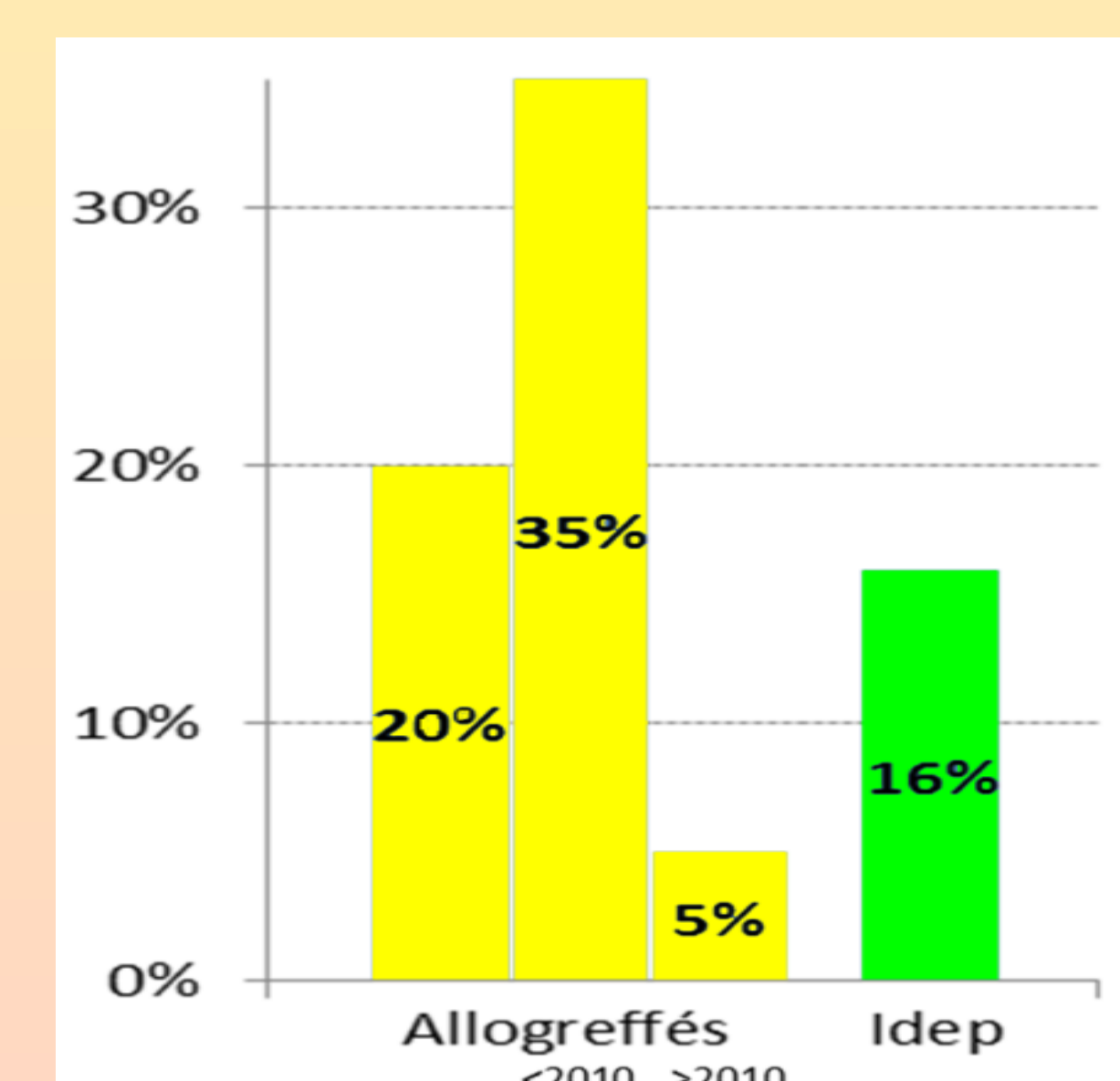
70% des patients n'ont eu qu'une PCR et 20% ≥3

La mortalité

Chez l'immunodéprimé dans la cohorte Hématologie "allogreffés" a globalement été de 8/38 (20%) :

7/20 (35%) avant la mise en place de la surveillance systématique des patients allogreffés par PCR en 2010 contre 1/18 (5%) après cette mise en place.

La mortalité dans les autres groupes d'immunodéprimés a été de 4/25 (16%) (Hématologie classique: 3/8, VIH :1/13, TOS: 0/4).



Conclusions

L'activité de diagnostic moléculaire de la toxoplasmose est très diversifiée et a très fortement augmenté au cours de la période (+400%). La détection du toxoplasme est relativement rare, mais la létalité importante.

La mise en place d'une surveillance systématique rapprochée par PCR des patients allogreffés semble avoir permis de diminuer la mortalité dans ce groupe, comme le montre également une étude multicentrique récemment coordonnée par F. Robert-Gangneux et al. (J. Clin. Microbiol. 2015).

Remerciements

Nous remercions les techniciens: Sylvie Douzou, Ghyslaine Serres, Bounleth Sanichanh, Céline Fraissinet, Guillaume Bresson et Florence Michel.

Références

- Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. N Engl J Med. 1994 Sep 15;331(11):695-9.
- Sterkers Y, Pratlong F, Albaba S, Loubersac J, Picot MC, Pretet V, Issert E, Boulot P, Bastien P. Novel interpretation of molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis according to gestational age at the time of maternal infection. J Clin Microbiol. 2012 Dec;50(12):3944-51.
- Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschuere H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int J Parasitol. 2000 Jan;30(1):69-75.
- Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infect Dis. 2003 May 2;3:7.
- Robert-Gangneux F, Sterkers Y, Yera H, Accoceberry I, Menotti J, Cassaing S, Brenier-Pinchart MP, Hennequin C, Delhaes L, Bonhomme J, Villena I, Scherer E, Dalle F, Touafek F, Fillissetti D, Varlet-Marie E, Pelloux H, Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. J Clin Microbiol. 2015 May;53(5):1677-84.