

Diagnostic moléculaire de la toxoplasmose congénitale sur liquide amniotique: *taux résiduel de faux négatifs et intérêt d'un second contrôle*

Lévêque M^{1,2}, Albaba S², Delmas C³, Roux G², Varlet-Marie E^{2,3}, Pratlong F^{1,2}, Lachaud L^{1,2}, Patrick Bastien^{1,2,3}, Villena I^{3,4}, Sterkers Y^{1,2,3} ;
au nom du Réseau Toxosurv du Centre National de Référence de la Toxoplasmose #

¹MiVEGEC, Université de Montpellier, IRD, CNRS ; Montpellier, France. ²Département de Parasitologie-Mycologie, CHU de Montpellier, ³Centre National de Référence de la Toxoplasmose, ⁴Département de Parasitologie-Mycologie, CHU de Reims ; Reims, France

Introduction

La toxoplasmose congénitale (TC) est secondaire au passage trans-placentaire du parasite lors d'une primo-infection survenant chez une femme enceinte non immunisée. Le taux global de transmission est de l'ordre de 29%. Le risque de transmission materno-fœtale augmente avec le terme de la contamination maternelle alors que la sévérité de la maladie évolue de façon inverse (formes graves en cas de transmission en début de grossesse, formes infra-cliniques en fin de grossesse). Durant la phase prénatale, le diagnostic de la TC repose principalement sur la recherche de l'ADN de *Toxoplasma gondii* par PCR réalisée sur du liquide amniotique (LA) obtenu par amniocentèse. Une PCR positive sur LA affirme le diagnostic de TC (Spécificité = 100%). Par contre, une PCR négative sur LA n'exclut pas le diagnostic de TC du fait d'un faible taux de faux-négatif (voir figure ci-contre d'après Sterkers *et al.* J Clin Microbiol. 2012). L'objectif de ce travail est de montrer l'apport d'un contrôle par une deuxième méthode et de mesurer le taux résiduel de faux-négatif à l'échelle de la France, sur six ans.

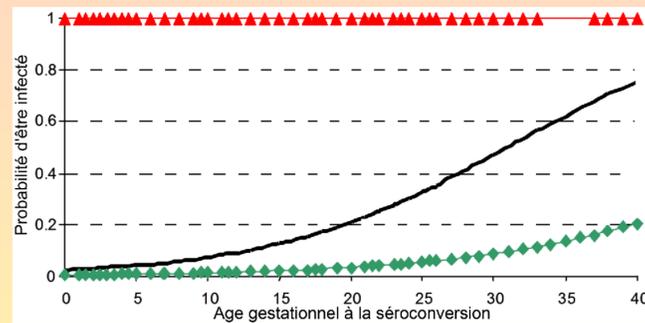


Figure: Prévalence de la TC et valeurs post-test de la PCR *Toxoplasma* sur LA.
La courbe noire représente la prévalence de la TC, la courbe "triangles rouges" la VPP, celle "losanges verts" 1-VPN ou la probabilité d'être infecté lorsque la PCR est négative.

Méthodes

Etude rétrospective, sur les faux-négatifs de la PCR sur LA rapportés par TOXOSURV sur les TC diagnostiquées de 2011 à 2016.

TOXOSURV: Une surveillance de la toxoplasmose congénitale a été mise en place en 2007, selon le dispositif, baptisé TOXOSURV. La surveillance est assurée par un réseau de 48 laboratoires. Ce maillage national par les laboratoires du dispositif de surveillance TOXOSURV, permet au CNR de la Toxoplasmose de colliger les cas de TC diagnostiquées en période anténatale, à la naissance et en postnatal en France, soit 230±36 TC/an

PCR: La PCR sur LA est réalisée dans une trentaine de laboratoires agréés en France. Du LA et/ou de l'ADN ont été transmis aux Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU de Montpellier ou de Reims pour réaliser une seconde PCR avec leur méthode "maison" ciblant rep529. A Montpellier, la PCR est réalisée selon la méthode décrite par Reischl *et al.* BMC Infect Dis 2003 et l'extraction est une thermolyse décrite par Hohlfeld *et al.* N Engl J Med 1994. A Reims l'extraction est automatisée et utilise le BioRobot EZ1 (Qiagen) avec le protocole EZ1 DNATissue kit, la PCR est réalisée selon Lélou Appl *et al.* Environ Microbiol 2012. Dans les deux cas l'analyse est effectuée en *multiplicata* (*triplicata* pour Montpellier et ≥6 pour Reims).

Résultats & discussion

Centre déclarant	Méthode PCR (cible)	Date de l'infection maternelle (SA)	Date de prélèvement (SA)	Délai	Année	Deuxième méthode	LA	ADN	Résultat 2 ^{ème} méthode
C1	TibMolBiol	NC	NC	NC	2016	Reischl	Oui	Non	Nég
C2	Talabani J Clin Microbiol. 2009	10	NC	NC	2015	Reischl	Non	Oui	Nég
C3	Reischl BMC Infect Dis 2003	NC	NC	2016	Reischl	Oui, culot	Non	Non	Nég
C4	Cassaing J Clin Microbiol 2006	14	20	6	2016	Reischl	Non	Oui	Nég
C4	Cassaing J Clin Microbiol 2006	32	38	6	2016	Reischl	Oui, 1,5 mL	Oui	Nég
C5	Robert-Gangneux Pediatr Infect Dis J.	19	26	7	2016	Reischl	Oui	Oui	Nég
C6	Cassaing J Clin Microbiol 2006	24	25	1	2016	Reischl	Non	Oui	Nég
C18	NC	15	26	11	2015	PDV	PDV	PDV	PDV
C7	Cassaing J Clin Microbiol 2006	21	26	5	2015	Reischl	Oui, 4,2 mL	Oui	Nég
C8	Reischl BMC Infect Dis 2003	15	27	12	2015	Lelu	oui, 4 mL	Oui	Nég
C19	NC	22	29	7	2015	PDV	PDV	PDV	PDV
C19	NC	21	34	13	2015	PDV	PDV	PDV	PDV
C9	Reischl BMC Infect Dis 2003	NC	NC	2015	Reischl	Oui, 160 µL	Oui	Nég	Nég
C2	Talabani J Clin Microbiol. 2009	3	18	15	2015	Reischl	Non	Oui	Nég
C6	Cassaing J Clin Microbiol 2006	15	22	7	2015	Reischl	Oui	Oui	Nég
C8	Reischl BMC Infect Dis 2003	22	30	8	2015	Lelu	Non	Oui	Nég
C10	Lélou Appl Environ Microbiol 2012	18	24	6	2015	Reischl	Oui, 100 µL	Non	Nég
C5	Robert-Gangneux Pediatr Infect Dis J.	23	31	8	2014	Reischl	Non	Oui	Nég
C11	Reischl BMC Infect Dis 2003	16	24	8	2014	PDV	PDV	PDV	PDV
C5	Robert-Gangneux Pediatr Infect Dis J.	22	28	6	2014	Reischl	Oui	Oui	Nég
C3	BioEvolution	16	23	7	2014	Reischl	Oui, culot de 2 mL	Non	Nég
C7	Cassaing J Clin Microbiol 2006	15	18	3	2014	Reischl	Oui, 2,5 mL	Oui	Nég
C12	Fekkar J Clin Microbiol 2008	33	35	2	2014	PDV	PDV	PDV	PDV
C3	BioEvolution	31	38	7	2014	Reischl	Oui, culot de 2	Non	Nég
C6	Cassaing J Clin Microbiol 2006	32	35	3	2014	Reischl	Non	Oui	Nég
C13	Reischl BMC Infect Dis 2003	16	23	7	2014	PDV	PDV	PDV	PDV
C15	rDNA, Kupferschmidt CMI 2001	22	28	6	2014	Reischl	Non	Oui	Nég
C2	Talabani J Clin Microbiol. 2009	22	29	7	2014	Reischl	Non	Oui	Nég
C6	Cassaing J Clin Microbiol 2006	31	35	4	2014	Reischl	Oui	Oui	Nég
C16	Reischl BMC Infect Dis 2003	17	24	7	2013	Reischl	Oui, culot	Oui	Nég
C15	rDNA, Kupferschmidt CMI 2001	30	34	4	2013	Reischl	Oui	Non	IP (1/3)
C15	NC	32	33	1	2013	PDV	PDV	PDV	PDV
C13	Reischl BMC Infect Dis 2003	22	28	6	2013	Reischl	Non	Oui	Nég
C19	NC	NC	NC	2013	PDV	PDV	PDV	PDV	PDV
C13	Reischl BMC Infect Dis 2003	24	31	7	2013	Reischl	Non	Oui	Nég
C3	BioEvolution/Fekkar J Clin Microbiol 2008	22	27	5	2012	Reischl	Oui, culot	Non	Nég
C12	Fekkar J Clin Microbiol 2008	28	33	5	2012	PDV	PDV	PDV	PDV
C7	Cassaing J Clin Microbiol 2006	30	36	6	2012	Reischl	Oui	Non	Nég
C7	Cassaing J Clin Microbiol 2006	24	29	5	2012	Reischl	Oui	Non	Pos
C13	Reischl BMC Infect Dis 2003	28	35	7	2012	PDV	PDV	PDV	PDV
C13	Reischl BMC Infect Dis 2003	15	31	16	2012	PDV	PDV	PDV	PDV
C2	Talabani J Clin Microbiol. 2009	12	NC	NC	2012	Reischl	Non	Oui	Nég
C19	NC	NC	NC	2012	PDV	PDV	PDV	PDV	PDV
C10	Lélou Appl Environ Microbiol 2012	18	26	8	2011	Reischl	Non	Oui	Nég
C10	Lélou Appl Environ Microbiol 2012	18	26	8	2011	Reischl	Non	Oui	Nég
C17	NC	11	23	12	2011	Reischl	Non	Oui	Nég
C7	Cassaing J Clin Microbiol 2006	25	35	10	2011	Reischl	Oui	Non	Pos
C3	B1, Lin J Clin Microbiol 2000	18	25	7	2011	Reischl	Oui	Non	Pos
C3	B1, Lin J Clin Microbiol 2000	29	34	5	2011	Reischl	Non	Oui	Pos
C16	Reischl BMC Infect Dis 2003	NC	26	NC	2011	Reischl	Oui, 5 mL	Oui	Nég
C9	Reischl BMC Infect Dis 2003	28	30	2	2011	Reischl	Non	Oui	Nég
C8	Reischl BMC Infect Dis 2003	20	27	7	2011	Lelu	Oui	Oui	Nég
C8	Reischl BMC Infect Dis 2003	27	31	4	2011	Lelu	Non	Oui	Nég
C19	NC	NC	24	NC	2011	PDV	PDV	PDV	PDV
C17	NC	11	21	10	2011	PDV	PDV	PDV	PDV
C14	Reischl BMC Infect Dis 2003	8	21	13	2011	Reischl	Non	Oui	IP (2/3)
C2	Talabani J Clin Microbiol. 2009	6	18	12	2011	Reischl	Non	Oui	Nég
C6	Cassaing J Clin Microbiol 2006	NC	NC	NC	2016	Reischl	Non	Oui	Nég

Tableau: Caractéristiques des échantillons inclus dans l'étude
NC: non communiqué, SA: semaine d'aménorrhée, PDV: Perdu de vue, Nég: négatif, Pos: positif, IP: inconstamment positif

Sensibilité de la PCR *Toxoplasma* dans le liquide amniotique

De 2011 à 2016, 1223 TC ont été rapportées par le réseau TOXOSURV. Une PCR sur LA a été réalisée dans 42% des cas (513/1223); elle a permis d'affirmer la TC dans la période prénatale dans 37% (454/1223) des cas avec une sensibilité de 88,5% (454/513). La PCR sur LA était donc négative dans 59 cas (faux-négatif).

Caractéristiques des 59 faux-négatifs

Les 59 faux-négatifs provenaient de 19 centres différents, à rapporter aux 30 laboratoires agréés pour le DPN en France. Chaque centre a déclaré 3±2 faux-négatifs (moyenne±écart-type), soit de 1 à 6 faux-négatifs déclarés selon les centres. Cette différence du nombre de faux-négatifs déclarés entre centre (de 1 à 6) peut s'expliquer par le nombre de DPN réalisés par les centres, les centres ayant une plus forte activité déclarant davantage que les plus petits centres.

Le terme moyen de contamination était de 21±7,3 SA [3-32SA]; le délai moyen entre contamination et réalisation de l'amniocentèse était de 7±3,4 semaines, mais <4 semaines dans 6/59 cas (10%).

Le nombre de faux-négatif par an est stable durant la période, de 10±3 [6-14].

Sept méthodes PCR ont généré des faux-positifs, avec 5±5 faux-négatifs par méthode [1-16]. A noter que les méthodes générant le plus de faux-négatifs sont celles utilisées par le plus grand nombre de centres, ainsi la moyenne par méthode et par centre est de 2,6±0,8.

Du LA et/ou de l'ADN de 45 de ces 59 cas (78%) ont été transmis aux Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU de Montpellier (N=41) ou de Reims (N=4) pour réaliser une seconde PCR avec leur méthode "maison" (Reischl *et al.* BMC Infect Dis 2003 et Lélou *et al.* Appl Environ Microbiol 2012 respectivement).

Analyse des 6 échantillons trouvés positifs à la seconde méthode

Dans 6/45 (13,3%) cas, la seconde PCR est revenue positive, ce qui permet d'établir la sensibilité à 89,7% (460/513) ou 92,9% (460/495) en excluant du calcul les perdus de vue et ceux pour lequel l'amniocentèse a été réalisée <4 semaines après la contamination maternelle.

Les 6 positifs par la deuxième méthode ont été obtenus sur les 20 LA de la période 2011-2013 alors qu'aucun positif n'a été obtenu sur les 25 LA de la période 2014-2016 (Chi² avec correction de Yates =4,9 avec p=0,04).

Vingt-quatre LA et 32 ADN ont été analysés. Lorsque LA et ADN extrait par les centres ont été analysés en parallèle (N=12), les deux ont été trouvés concordants, négatifs. Lorsque le LA a été adressé, la seconde PCR est revenue positive dans 4/24 soit 16,7% alors que pour l'ADN extrait les valeurs sont 2/32 soit 6,25%, la différence n'est pas statistiquement significative (Chi² avec correction de Yates =0,7 avec p=0,42). Notons que concernant les LA, le volume reçu était de 2,4±1,7 mL [0,1-5 mL], alors que le CNR Toxoplasmose recommande d'analyser un volume ≥4mL.

Concernant les méthodes PCR, La PCR Reischl réalisée en deuxième intention est revenue positive dans 2/12 PCR réalisées par la méthode Cassaing J Clin Microbiol 2016, 1/2 PCR réalisées par la méthode Kupferschmidt CMI 2001 et ciblant le rDNA, 1/16 PCR réalisées par la méthode Reischl BMC Infect Dis 2003. Pour ces derniers, une deuxième méthode par Lélou Appl Environ Microbiol 2012 aurait peut-être permis de redresser davantage de faux-négatifs. Les deux faux-négatifs de la méthode Lin J Clin Microbiol 2000 ont été rattrapés par la méthode Reischl. Ce résultat est concordant avec une meilleure sensibilité de la cible rep529 par rapport à la cible B1.

Enfin 2/6 positifs ont été trouvés inconstamment positifs (1/3 et 2/3), en faveur d'une très faible charge parasitaire dans ces LA et montrant l'importance de réaliser l'analyse en *multiplicata*.

Conclusion

En conclusion, une seconde PCR réalisée sur le LA ou sur l'ADN extrait permettrait de corriger un certain nombre de résultats faussement négatifs. Il persiste néanmoins un pourcentage 'incompressible' de faux-négatifs (8-10%), notamment lorsque le délai de 4 semaines entre contamination et amniocentèse n'est pas respecté.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'ensemble des participants du Réseau TOXOSURV et du CNR Toxoplasmose pour leur implication.

Références

- Sterkers Y, Pratlong F, Albaba S, Loubersac J, Picot MC, Pretet V, Issert E, Boulou 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.
- Lélou M, Villena I, Dardé ML, Aubert D, Geers R, Dupuis E, Marnef F, Pouille ML, Gotteland C, Dumètre A, Gilot-Fromont E. Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. Appl Environ Microbiol. 2012 Aug;78(15):5127-32.
- 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.