

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2016

2016 TOU3 2082

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance du

MEMOIRE POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Présenté et soutenu publiquement
par

ARMENGOL Catherine

née le 14 mai 1986 à Lavelanet (09)

COMPARAISON DE SEPT REACTIFS COMMERCIAUX POUR LE DIAGNOSTIC DE
SEROCONVERSION TOXOPLASMIQUE CHEZ LA FEMME ENCEINTE AU CHU DE TOULOUSE

Vendredi 7 octobre 2016

Directeur de thèse : FILLAUX Judith

JURY

Président : Mr le Professeur VALENTIN Alexis
1er assesseur : Mme le Professeur DELHAES Laurence
2ème assesseur : Mme le Docteur FILLAUX Judith
3ème assesseur : Mme le Docteur DELPECH Marie

**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} octobre 2015**

Professeurs Émérites

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CHATELUT E	Pharmacologie	Mme BARRE A	Biologie
M. FAVRE G	Biochimie	Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
M. HOUIN G	Pharmacologie	Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. PARINI A	Physiologie	M. BENOIST H	Immunologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie	Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie	Mme COUDERC B	Biochimie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie	M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique	Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. SIÉ P	Hématologie	M. FABRE N	Pharmacognosie
M. VALENTIN A	Parasitologie	M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
		Mme MULLER-STAUTMONT C	Toxicologie - Sémiologie
		Mme NEPVEU F	Chimie analytique
		M. SALLES B	Toxicologie
		M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
		M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
		Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
		M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires	Universitaires
M. CESTAC P	Mme ARÉLLANO C. (*)
Mme GANDIA-MAILLY P (*)	Mme AUTHIER H
Mme JUILLARD-CONDAT B	M. BERGÉ M. (*)
M. PUISSET F	Mme BON C
Mme SÉRONIE-VIVIEN S	M. BOUJILA J (*)
Mme THOMAS F	Mme BOUTET E
	M. BROUILLET F
	Mme CABOU C
	Mme CAZALBOU S (*)
	Mme CHAPUY-REGAUD S
	Mme COSTE A (*)
	M. DELCOURT N
	Mme DERAËVE C
	Mme ÉCHINARD-DOUIN V
	Mme EL GARAH F
	Mme EL HAGE S
	Mme FALLONE F
	Mme FERNANDEZ-VIDAL A
	Mme GIROD-FULLANA S (*)
	Mme HALOVA-LAJOIE B
	Mme JOUANJUS E
	Mme LAJOIE-MAZENC I
	Mme LEFEVRE L
	Mme LE LAMER A-C
	M. LEMARIE A
	M. MARTI G
	Mme MIREY G (*)
	Mme MONTFERRAN S
	M. Olichon A
	M. PERE D
	Mme PORTHE G
	Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)
	M. SAINTE-MARIE Y
	M. STIGLIANI J-L
	M. SUDOR J
	Mme TERRISSE A-D
	Mme TOURRETTE A
	Mme VANSTEELANDT M
	Mme WHITE-KONING M

(*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C	Physiologie
Mme FONTAN C	Biophysique
Mme KELLER L	Biochimie
Mme PALUDETTO M.N (**)	Chimie thérapeutique
M. PÉRES M.	Immunologie
Mme ROUCH L	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique

(**) Nomination au 1^{er} novembre 2015

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, ou tout simplement qui ont été présentes tout au long de ma vie d'étudiante.

Aux membres de mon jury,

Je tiens à remercier particulièrement **ma directrice de thèse, Madame le Docteur Judith Fillaux**, qui m'a assistée tout au long de cette thèse. Merci Judith de m'avoir proposé ce travail; d'avoir toujours été impliquée, disponible, patiente et gentille. Et surtout merci du temps que tu m'as accordé dans des délais très courts. Une directrice de thèse parfaite !!! J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi et je suis ravie de pouvoir continuer par la suite.

Je remercie **Monsieur le Professeur Alexis Valentin**, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider cette thèse. Merci pour tous les enseignements que vous m'avez inculqués depuis la faculté de Pharmacie jusqu'à mon stage de Parasitologie.

Je tiens également à remercier **Madame le Professeur Laurence Delhaes** pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'avoir fait le déplacement depuis Bordeaux un vendredi soir.

Je remercie chaleureusement **Madame le Docteur Marie Delpech** d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Merci de m'avoir si bien accueillie dans ton service en tant qu'interne et de m'avoir proposé ce poste d'assistant.

Je tiens également à remercier tous les **techniciens du secteur de Sérologie** et plus particulièrement Catherine et Eric pour leur participation durant ce travail.

Aux rencontres professionnelles,

Merci à mes **professeurs et chefs** pour leurs enseignements durant ces longues années d'études et ces quatre ans d'internat.

Merci à tous les **techniciens** qui m'ont formée durant mon internat et en particulier l'équipe de nuit du PTA : Adeline, Laure, Mélanie, Gaël, Alex, Aurélie...

Merci au **laboratoire de Saint Gaudens** de m'avoir accueilli avec autant de gentillesse. A bientôt pour de nouvelles aventures.

Merci aux biologistes du **laboratoire de Bayonne**. Je suis ravie de ce dernier semestre avec vous. Vous m'avez énormément appris toujours dans une très bonne ambiance. Merci également de m'avoir libéré du temps pour que je termine ma thèse.

A ma famille,

A mes parents. Papa et Maman, je vous remercie pour m'avoir soutenue tout au long de mes études et pour l'amour que vous me portez. Vous avez toujours été là pour moi et vous avez toujours cru en moi. C'est grâce à vous si je suis arrivée jusqu'ici. Je suis fière d'avoir des parents comme vous.

A ma grand-mère, mes frères, ma belle-sœur, mes neveux et nièces Clara, Margot, Alicia et Mathis que j'aime tant. Merci pour tous ces bons moments en famille et pour votre soutien.

A Patrice, merci pour ton soutien et ton amour inconditionnel durant toutes ces années partagées. Si je suis arrivée jusqu'ici, c'est en partie grâce à toi. Je ne sais pas ce que l'avenir nous réserve mais sache que je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi et tout ce que nous avons vécu ensemble.

A la famille Canguero, pour avoir su m'accueillir avec tant de naturel et de générosité. A Thomas et Alexandra pour nos moments partagés.

A mes amis et belles rencontres,

A tous mes amis qui ont été présents tout au long de mes études. Vous comptez énormément pour moi :

- A mes amis Ariégeois tout particulièrement Nicolas et Julie.
- A mes amis de lycée tout particulièrement Charlotte
- A mes amis des bancs de la fac : Anthony, Marie, Julie, Clémence, Milène et Cyrille et aux pièces rapportées Guillaume et Vincent.

A tous les internes qui ont partagés ces 4 années d'internat avec moi, dans les galères, les fous rires et les soirées... De belles amitiés sont nées et j'espère qu'elles continueront encore longtemps !

- A mes co-internes de Bordeaux et de Toulouse mais plus particulièrement : Marine, Aurélie, Sarah, Chloé, Edona, Raoul, Pierre, Laurent, Samy, Simon, Nicolas, Alice, Charlotte, Cécile, Julien, Anne-Charlotte, Lucie, Cédric, Shérazade, Morgane, Manu, Agnès, Pierre-Yves, Etienne, Patricia, Jessica, Marie, Ludovic, Sandrine, Elsa, Sanaa, Alice-Anne, Jules, David....
- Aux internes de Saint-Gaudens mais plus particulièrement : Estelle, Joanna, Camille, Aurélie, Jérémie, John et Eva...
- Aux internes de Bayonne mais plus particulièrement Céline, Iona, Emilie, Florence, Maiana, et Estelle...

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CLIA	ChemiLuminescence Immuno Assay
CMIA	Chemiluminescent Microparticule Immuno Assay
CNQ	Contrôle National de Qualité
CNR	Centre National de Référence
CQE	Contrôle de Qualité Externe
CTCB	Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique
DO	Densité Optique
ECLIA	Electro Chemiluminescence Immuno Assay
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELFA	Enzyme Linked Fluorescence Assay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HAS	Haute Autorité de Santé
IFI	Immuno Fluorescence Indirecte
Ig	Immunoglobuline
IS	International Standard
ISAGA	Immuno Sorbent Agglutination Assay
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
SA	Semaine d'Aménorrhée
Th	T helper
UI/mL	Unité Internationale par millilitre
URL	Unité Relative de Lumière
WB	Western Blot

TABLE DES MATIERES

Toxoplasmose et grossesse	14
Introduction.....	15
<i>Toxoplasma gondii</i>.....	17
1. Les différentes formes du parasite.....	17
1.1. L’oocyste : forme de résistance dans le milieu extérieur.....	17
1.2. Le tachyzoïte : forme végétative invasive à multiplication rapide	17
1.3. Le kyste : forme de résistance dans les tissus à croissance lente.....	18
2. Le cycle parasitaire.....	19
2.1. Infection de l’hôte définitif : le chat.....	19
2.2. Infection des hôtes intermédiaires : la femme enceinte, le fœtus.....	19
La toxoplasmose	21
1. Prévalence mondiale	21
2. Prévalence en France	21
2.1. Population générale	21
2.2. Femmes enceintes.....	21
3. Prévention chez la femme enceinte séronégative.....	23
4. Risque de transmission maternofoetale	24
Sérodiagnostic chez la femme enceinte.....	27
1. Cadre réglementaire	27
2. Cinétique des anticorps.....	28
3. Techniques sérologiques pour la détection des IgG	31
3.1. Le Dye test.....	33
3.2. L’ Immunofluorescence Indirecte (IFI).....	34
3.3. Les techniques d’agglutination.....	34
3.4. Les techniques immunoenzymatiques (EIA)	36
3.5. Le Western Blot IgG : LDBIO-TOXO II IgG ®	39
3.6. L’avidité des IgG.....	40
4. Interprétation des sérologies de dépistage chez la femme enceinte.....	42

4.1. Interprétation de la 1 ^{ère} sérologie.....	42
4.2. Interprétation d'une sérologie positive à postériori d'une sérologie négative.....	49

Comparaison du délai de détection des IgG à de faibles titres par sept kits commerciaux lors de séroconversions de femmes enceintes.	50
Contexte.....	51
Matériel et Méthodes	53
1. Population étudiée.....	53
2. Réactifs utilisés	53
2.1. Architect Toxo IgG® (Abbott Laboratories Wiesbaden, Germany)	54
2.2. Elecsys Toxo IgG® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)	55
2.3. LDBIO-Toxo II IgG® (LDBio, Lyon, France).....	55
2.4. Liaison Toxo IgG II® (Diasorin, Saluggia, Italy).....	56
2.5. Platelia Toxo IgG ® (BioRad, Marnes La Coquette, France),.....	56
2.6. TGS TA Toxo IgG® (TGS Technogenetics, Milano, Italy)	56
2.7. Vidas Toxo IgG II® (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France).....	57
3. Analyse statistique.....	57
Résultats.....	58
1. Population étudiée et nombre de sérums analysés	58
2. Etude des profils du Western Blot.....	59
3. Délai de détection des IgG à de faibles titres.....	60
4. Délai de détection des IgG dans la zone positive.....	62
5. L'Elecsys Toxo IgG®	64
Discussion.....	65
Conclusion	71
Annexes	73
1. Résultats du CNQ Toxoplasmose 2012 (33).....	74
2. Résultats du CTCB Toxoplasmose 2016 (73).....	75
3. Table de codage des réactifs pour la sérologie toxoplasmose (74)	76

4. Point de l'AFSSAPS sur la sérologie toxoplasmose (75).....77

Bibliographie.....78

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Ultrastructure du tachyzoïte de <i>Toxoplasma gondii</i> (6)	17
Figure 2 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes selon la région d'habitation, standardisée sur l'âge (18).....	22
Figure 3 : Cinétique des anticorps dans une infection toxoplasmique (24).....	30
Figure 4 : Dosage quantitatif des IgG anti- <i>T.gondii</i> par EIA : répartition des fournisseurs (données CTCB Annexe 2).....	37
Figure 5 : 3 profils de Western Blot IgG : Profil 1 : Contrôle positif. Profil 2 : Faux positif sur un sérum avec un titre équivoque d'IgG. Profil 3 : Patient positif (49).....	40
Figure 6 : IgG positives seules (53)	43
Figure 7 : IgG positives / IgM positives (53).....	45
Figure 8 : IgM positives seules (53).....	47
Figure 9 : IgG équivoques / IgM négatives (53).....	48
Figure 10 : Distribution des titres d'IgG (UI/ml) équivoques et positifs parmi les 6 réactifs d'EIA. ...	58
Figure 11 : Répartition des profils immunologiques au sein des Western Blot positifs	59
Figure 12 : Courbe de Kaplan-Meier représentant le délai avant la détection d'IgG à de faibles titres.	60
Figure 13 : Courbe de Kaplan-Meier représentant le délai avant la détection d'IgG dans la zone positive.	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Risque de transmission maternofoetale et sévérité de l'atteinte foetale selon le terme de la grossesse (22)	26
Tableau 2 : Valeur des seuils recommandés par les fournisseurs pour le dosage des IgG	54
Tableau 3 : Différentiel de délai de détection d'IgG à de faibles titres	61
Tableau 4 : Différentiel de délai de détection des IgG en zone positive	63

Toxoplasmose et grossesse

Introduction

La toxoplasmose est une anthroponose ubiquitaire due à un **parasite *Toxoplasma gondii***, protozoaire à développement intracellulaire obligatoire appartenant au phylum des Apicomplexa, à la classe des Sporozoa et à la sous-classe des Coccidia. Elle touche la plupart des animaux à sang chaud dont l'Homme. Le cycle est hétéroxène, il comprend un hôte définitif de la famille des félidés, le souvent le chat et des hôtes intermédiaires : les mammifères et les oiseaux. La contamination humaine se fait essentiellement par ingestion d'aliments tels que les légumes contaminés par les fèces du chat contenant des oocystes sporulants ou la viande mal cuite contenant des kystes.

L'infection est le plus souvent asymptomatique chez l'Homme immunocompétent et entraîne la persistance à vie de kystes dans les muscles et le système nerveux central ainsi qu'une immunité protectrice avec développement d'immunoglobulines G spécifiques anti-*Toxoplasma gondii*. Sur certains terrains, tels que la grossesse ou l'immunodépression, l'infection peut être très grave. Chez la **femme enceinte non immunisée**, le toxoplasme pourra traverser le placenta et **infecter le fœtus** entraînant éventuellement une mort fœtale in utero ou des lésions sévères, principalement cérébrales ou oculaires (1). Ainsi, *Toxoplasma gondii* est responsable pour l'année 2014 de 179 cas de **toxoplasmose congénitale** déclarés en France (2).

Un programme de prévention a été mis en place en France reposant sur le dépistage sérologique de toutes les femmes enceintes et le suivi mensuel des femmes enceintes non immunisées contre la toxoplasmose. Le **diagnostic d'une séroconversion doit être le plus précoce** possible afin que la femme enceinte bénéficie d'une prise en charge adaptée qui diminuerait le risque de lésions fœtales. De nombreux réactifs sont commercialisés pour la détection des IgG anti-*Toxoplasma gondii* et présentent des qualités analytiques similaires, cependant leur utilisation depuis de nombreuses années a mis en évidence une différence importante concernant la précocité de détection des IgG lors d'une séroconversion.

L'objectif de ce travail de thèse est de **comparer le délai de détection des IgG** anti *Toxoplasma gondii*, lors d'une séroconversion chez la femme enceinte, parmi **sept kits** commerciaux différents.

Toxoplasma gondii

1. Les différentes formes du parasite

Le parasite existe sous trois formes infectantes :

1.1. L'oocyste : forme de résistance dans le milieu extérieur

Les oocystes sont des structures ovoïdes de 9 à 11 μm de long sur 11 à 14 μm de large qui résultent d'une reproduction sexuée se déroulant dans les cellules intestinales de l'hôte définitif, le chat (3). L'oocyste immature, une fois libéré dans les fèces du chat, va subir, en quelques jours, la sporogonie pour donner un oocyste mature infestant contenant deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes (futurs tachyzoïtes) (4). Cet oocyste infestant, grâce à sa paroi, peut résister dans un sol humide plus d'une année. Très sensibles à la chaleur, les oocystes sont rapidement inactivés à partir de 60°C pendant une minute (5). Les oocystes représentent la forme de contamination principale des herbivores et de l'Homme.

1.2. Le tachyzoïte : forme végétative invasive à multiplication rapide

Dérivant du sporozoïte, le tachyzoïte est la forme libre proliférative et infectieuse chez l'hôte intermédiaire. Il a une forme de croissant, mesurant 6 à 10 microns de long sur 2 à 3 microns de large. Il est asymétrique et possède à son extrémité le complexe apical qui lui permet de pénétrer activement dans tout type de cellules. Le complexe apical comprend le conoïde, les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. La représentation schématique du tachyzoïte est illustrée dans la Figure 1 :

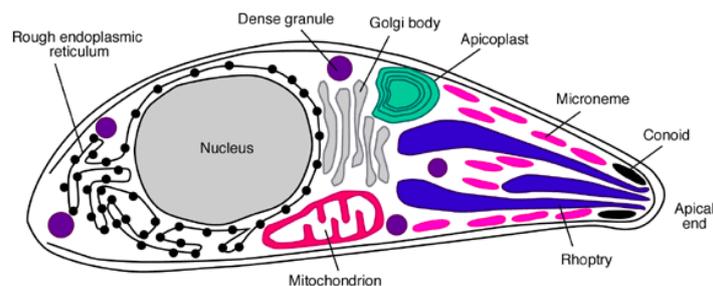


Figure 1 : Ultrastructure du tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* (6)

A l'intérieur des cellules du système phagocytaire mononucléé, les tachyzoïtes s'entourent d'une vacuole parasitophore qui les protège de la lyse intracellulaire. Les tachyzoïtes se multiplient dans les cellules par endodyogénie (processus de reproduction asexuée) jusqu'à qu'elles soient remplies de parasites. A ce stade, les tachyzoïtes sortent pour envahir de nouvelles cellules. En 48h, la cellule hôte peut contenir jusqu'à une cinquantaine de tachyzoïtes ; elle devient globuleuse et forme un pseudo-kyste au sein duquel les tachyzoïtes se multiplient de plus en plus lentement, se transformant en bradyzoïtes.

Le tachyzoïte est la **seule forme capable de traverser le placenta**.

1.3. Le kyste : forme de résistance dans les tissus à croissance lente

Les bradyzoïtes, dont la structure est très proche de celle des tachyzoïtes, se multiplient très lentement à l'intérieur de la vacuole parasitophore. La membrane de la vacuole parasitophore, via les sécrétions parasitaires, va devenir plus épaisse et très résistante aux attaques enzymatiques pour aboutir à une paroi kystique. La paroi kystique, imperméable aux anticorps et aux médicaments, permet la persistance du parasite à l'état latent dans les kystes intracellulaires durant toute la vie de l'hôte. Les kystes persisteront préférentiellement dans les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires et dans les cellules rétinienne compte tenu du fait que ces cellules sont moins exposées à la réponse immunitaire. Ils ont un aspect sphérique dans le cerveau et ovoïde dans les muscles. Leur taille est variable de 10 µm à 200 µm et ils peuvent contenir jusqu'à des milliers de bradyzoïtes (7).

Les kystes sont la forme de contamination principale des carnivores. Ils sont très résistants à l'acidité gastrique et sont détruits par une cuisson de 67° au cœur de la viande (8) ou par une congélation à -18°C pendant 3 jours avant cuisson de la viande (9,10).

2. Le cycle parasitaire

2.1. Infection de l'hôte définitif : le chat

Le chat se contamine habituellement en ingérant des kystes contenus dans la chair de ses proies (petits rongeurs, oiseaux). Il s'infecte, plus rarement, par ingestion d'oocystes matures souillant la terre et les végétaux. Les sporozoïtes (contenus dans les oocystes) ou les bradyzoïtes (contenus dans les kystes) évoluent rapidement en tachyzoïtes. Deux cycles coexistent alors :

- le cycle intestinal au cours duquel une phase de reproduction asexuée (schizogonie) est suivie d'une différenciation en gamètes male et femelle (gamétogonie) qui permet la réalisation d'un cycle sexué. La fécondation donne naissance, dans la lumière intestinale, à des oocystes immatures qui sont éliminés dans le milieu extérieur par millions via les fèces du chat. Les oocystes rejetés subissent une maturation (sporogonie) en 2 à 7 jours dans l'environnement, aboutissant au stade d'oocystes sporulés contenant deux sporocystes, chacun abritant quatre sporozoïtes infectieux. L'élimination des oocystes débute 3 à 10 jours après l'infection et peut durer jusqu'à 20 jours. Les chats infectés et en particulier les jeunes chats peuvent libérer jusqu'à plusieurs millions d'oocystes dans leurs fèces.
- le cycle extra-intestinal : une multiplication asexuée se déroule également dans les tissus extra-intestinaux avec circulation de tachyzoïtes par voie sanguine et lymphatique et formation secondaire de kystes tissulaires.

2.2. Infection des hôtes intermédiaires : la femme enceinte, le fœtus

La contamination humaine est principalement **alimentaire**. Elle est due à l'ingestion **d'oocystes matures souillant les légumes, les fruits, l'eau, les mains**, ou de **kystes** présents dans la **viande (mouton +++ , chèvre, porc...)** mal ou insuffisamment cuite. Dans l'estomac, la paroi des kystes ou des oocystes est digérée afin de libérer les bradyzoïtes ou sporozoïtes

qui traversent rapidement la paroi intestinale puis se différencient en tachyzoïtes. Les tachyzoïtes, se multiplient dans les macrophages et cellules dendritiques et disséminent par voie sanguine et lymphatique dans l'organisme. C'est au cours de cette étape que la transmission congénitale peut avoir lieu.

La transmission interhumaine est possible lors d'une transplantation d'organe (kystes) ou d'une transfusion sanguine (tachyzoïtes) mais le cas le plus fréquent est la **transmission verticale** (tachyzoïtes), de la mère à l'enfant, lors d'une primo-infection chez la femme enceinte. En effet lors de la phase aiguë de parasitémie au cours de la grossesse, les tachyzoïtes colonisent le placenta par invasion des cellules trophoblastiques et peuvent par la suite infecter le fœtus. Une réponse immunitaire de type Th-1 ($INF\gamma$) se met en place localement limitant la réplication parasitaire mais entraînant des zones de nécrose et d'inflammation ce qui augmente le risque de thromboses placentaires, d'atteinte fœtale et d'avortement précoce. Dans un second temps la réponse immunitaire type Th-2 prend le relai assurant une tolérance fœto-maternelle mais amplifiant la réplication du parasite. L'infection placentaire est un préalable à la transmission fœtale et le délai entre les deux est très variable même si dans la majorité des cas ce délai semble être assez rapide (11). La dissémination du parasite chez le fœtus peut entraîner une atteinte multiviscérale (cerveau, œil, foie, poumon).

La toxoplasmose

1. Prévalence mondiale

La prévalence de la toxoplasmose est très variable d'un pays à l'autre (10 à 80%) en fonction des habitudes alimentaires (consommation de viande peu cuite), des conditions d'hygiène, des conditions d'élevage des animaux domestiques, de la présence de félinés dans l'environnement et du climat. Ainsi la prévalence est plus élevée en Amérique latine et en Afrique tropicale, régions où le climat chaud, humide et de basse altitude est favorable à la survie et à la sporulation des oocystes. Elle sera plus faible dans les régions telles que l'Amérique du Nord, l'Europe du Nord et l'Asie du Sud-Est (12).

2. Prévalence en France

2.1. Population générale

La toxoplasmose est l'une des infections les plus fréquentes en France avec des valeurs de séroprévalence chez l'adulte comprise entre 20 et 55% qui varient entre les régions en lien avec des conditions climatiques et des habitudes alimentaires différentes (13).

2.2. Femmes enceintes

La **séroprévalence** de la toxoplasmose chez les femmes enceintes ne cesse de diminuer au fil des années. Elle a diminué de moitié en 50 ans et s'explique par des changements de modes de vie tels que : l'amélioration de l'hygiène individuelle, alimentaire et industrielle, la baisse de 30% de la consommation de viandes ovines en 20 ans, la surgélation des aliments, le suivi par les femmes enceintes séronégatives des mesures hygiéno-diététiques et l'alimentation des chats de plus en plus industrielle. Cette séroprévalence était à 80% en 1960, 66% en 1980, 54,3% en 1995, 43,8% en 2003 et **36,7% en 2010** (14,15). Cette baisse de la séroprévalence entraîne une augmentation du nombre de femmes enceintes nécessitant un suivi sérologique mensuel et par conséquent un coût supplémentaire pour la prise en charge de la grossesse

d'où une remise en question par l'HAS du dépistage obligatoire et du suivi sérologique des femmes séronégatives (16).

Chez les femmes de nationalité française, la séroprévalence **augmente** significativement **avec l'âge** maternel et est significativement associée à la région de résidence. En 2010, la séroprévalence était de 26,5% chez les 20-25 ans contre 48,4% chez les plus de 35 ans. Les séroprévalences les plus élevées, de l'ordre de 45%, sont observées dans les régions du Sud de la France en particulier dans le sud-ouest (Aquitaine), en région parisienne et en Outre mer. Les séroprévalences les plus faibles, de l'ordre de 25%, sont observées dans le nord-est notamment en Alsace (14,17,18)(Figure 2). Ce **gradient géographique Est-Ouest** s'explique, en dehors d'habitudes alimentaires régionales différentes, par le climat tempéré et humide du sud-ouest favorisant la conservation des oocystes dans le sol contrairement au climat sec et plus froid de nord-est. Par ailleurs, en France, une corrélation positive a été mise en évidence entre la consommation régionale de viande de mouton et la prévalence de la toxoplasmose.

Le **risque de séroconversion** a été estimé entre **1,9 pour 1000** femmes enceintes séronégative (19,20).

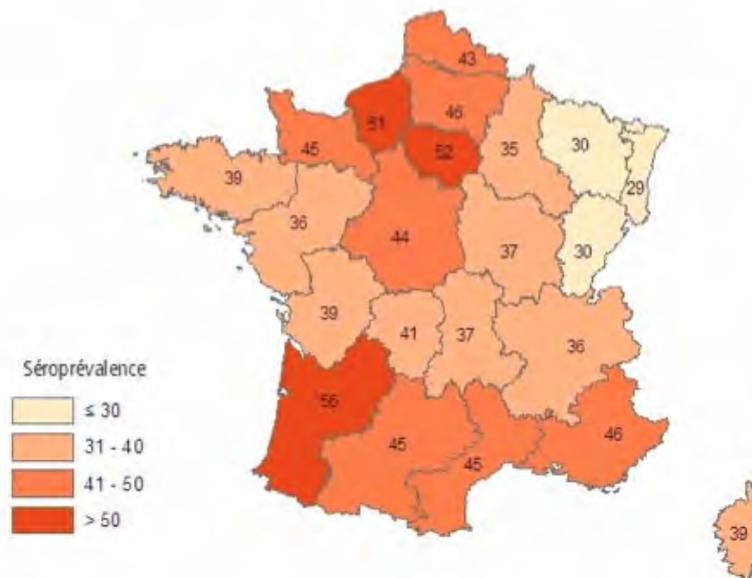


Figure 2 : Séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes selon la région d'habitation, standardisée sur l'âge (18)

3. Prévention chez la femme enceinte séronégative

Chez les femmes enceintes non immunisées vis-à-vis de la toxoplasmose, une **sérologie mensuelle** doit être réalisée tous les mois afin de dépister une éventuelle infection. Des **mesures hygiéno-diététiques** doivent également être suivies afin d'éviter l'ingestion de kystes ou d'oocytes (10,16,21) :

- Bien cuire la viande (mouton, agneau, porc, bœuf cheval) à une température d'au moins 67°C au cœur de la viande. Eviter la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite sinon la congeler au préalable à -18°C pendant au moins trois jours (8,9).
- Bien se laver les mains après le jardinage, le changement de la litière du chat, la manipulation de fruits et légumes souillés par de la terre, la manipulation de viande crue et avant chaque repas.
- Eviter le jardinage ou porter des gants et bien se laver les mains après.
- Faire laver à l'eau bouillante la litière quotidiennement par un tiers ou le faire avec des gants et bien se laver les mains après. Les chats résidant strictement en appartement et recevant une alimentation traitée par la chaleur (conserves et croquettes) ne sont pas concernés par cette mesure car ils ne sont pas exposés au danger.
- Bien laver les fruits, légumes, herbes aromatiques contaminés par de la terre et qui seront consommés crus. Nettoyer à grande eau les ustensiles et plans de travail ayant pu être contaminés par la terre. Bien se laver les mains après avoir cuisiné et avant de passer à table. Eviter de consommer des crudités dont on ne connaît pas la manière dont ils ont été lavés.
- A titre de précaution éviter la consommation de viande fumée, saumurée ou marinée, de lait de chèvre cru, de mollusques et coquillages consommés crus.

En 2000, une étude multicentrique a estimé que le risque de séroconversion toxoplasmique était plus important avec la consommation de viande insuffisamment cuite que par le contact

avec de la terre contaminée (16). Le rapport de l'InVS affirme un lien direct entre la consommation de viande ovine et la séroprévalence de la toxoplasmose (18). Cependant en l'absence de méthodes sensibles et normalisées de détection du parasite dans les denrées alimentaires et dans l'environnement, il n'est pas possible de préciser la part respective des différents modes de contamination.

4. Risque de transmission maternofoetale

La fréquence avec laquelle le parasite va traverser la barrière placentaire dépend de plusieurs facteurs : du type de la souche infectante, de la taille de l'inoculum, de la réponse immunitaire de la mère mais surtout du terme de la grossesse. La **transmission maternofoetale globale** est estimée à **30%** chez les femmes faisant une séroconversion au cours de leur grossesse (22).

Il existe **trois principaux génotypes** de *Toxoplasma gondii* (génotypes I, II et III) (23,24) qui diffèrent par :

- la virulence de la souche (une souche virulente met moins de 10 jours pour tuer une souris après inoculation intra péritonéale),
- la vitesse de multiplication en culture cellulaire responsable d'une immunité spécifique plus ou moins rapide,
- la capacité de migration à travers les barrières biologiques à l'origine de localisations différentes.

Par ordre croissant de virulence, le génotype II est le moins virulent avec un faible taux de multiplication, suivi du génotype III, du génotype I et puis des autres génotypes. La distribution géographique des génotypes est variable en fonction des régions du globe. Les trois types majeurs sont plutôt localisés en Europe et aux Etats-Unis alors que l'on retrouve une diversité génétique plus étendue dans les autres pays tels que ceux de l'Amérique du Sud avec des génotypes atypiques. Tous les génotypes peuvent infecter l'homme, mais en France métropoli-

taine une large **prédominance du génotype II** et de ses variants est retrouvée. Le type II et ses variants représentaient en 2014, 83,5% des isolats génotypables et 88% des toxoplasmoses congénitales en 2014 (2). Il faut noter que les génotypes atypiques peuvent être responsables de toxoplasmose plus sévère (25).

Le **risque de transmission** verticale **augmente avec l'âge gestationnel**, allant de 6 % à 13 SA à 72 % à 36 SA alors que la **sévérité des infections congénitales diminue** (26) (Tableau 1). Le passage du parasite au placenta se fait en tout début d'infection, au moment de la parasitémie, alors que la mère est asymptomatique. Le passage du tachyzoïte, du placenta au fœtus peut être plus long et aléatoire, le placenta jouant ici son rôle de filtre. Le placenta devient de plus en plus perméable au fil de la grossesse ce qui explique que le risque de transmission materno-fœtale soit maximum en fin de grossesse. Parallèlement le fœtus développe son système immunitaire tout au long de la grossesse. Ainsi en début de grossesse, il est très peu probable que le parasite passe le placenta mais si tel est le cas alors l'atteinte sera très sévère en raison de l'immaturation immunologique de l'embryon, avec des risques de d'avortements, de retard de croissance in utero, de prématurité, d'encéphalomyélite (calcifications intracrâniennes, hydrocéphalie, microcéphalie, chorioretinite, troubles neurologiques...) ou de forme disséminée avec possible anasarque fœtale. A contrario en fin de grossesse, le risque de passage placentaire est très élevé mais la toxoplasmose congénitale sera le plus souvent infraclinique c'est-à-dire asymptomatique à la naissance et, éventuellement, associée à la survenue plus tardive de lésions oculaires de type chorioretinites. En 2014, la **prévalence globale** de toxoplasmose congénitale était estimée à **2,2 pour 10 000 naissances** ce qui représentent **179 cas de toxoplasmoses congénitales** dont la grande majorité étaient asymptomatiques à la naissance (2).

Tableau 1 : Risque de transmission materno-fœtale et sévérité de l'atteinte fœtale selon le terme de la grossesse (22)

Âge gestationnel à l'infection maternelle (SA)	Survenue infection congénitale (IC 95 %), %	Proportion formes symptomatiques (IC 95 %), %	Survenue formes symptomatiques quand statut infectieux non connu, %
13	6 [3-9]	61 [34-85]	4
26	40 [33-47]	25 [18-33]	10
36	72 [60-81]	9 [4-17]	7

SA : semaine d'aménorrhée

Un **traitement prénatal** instauré dans les quatre semaines post-contamination **diminuerait** la **fréquence et la sévérité des lésions intracrâniennes et des chorioretinites** chez l'enfant (27,28,29,30,31).

Sérodiagnostic chez la femme enceinte

1. Cadre réglementaire

La fréquence et la gravité des toxoplasmoses congénitales ont conduit à la mise en place d'un programme de prévention de la toxoplasmose congénitale, avec émission de recommandations de prévention par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France.

Dès 1978, le décret n° 78-396 du 17 mars 1978 (abrogé par la loi du 20 décembre 2007 n°2007-1787) recommande la réalisation d'un dépistage sérologique systématique des femmes de moins de 50 ans non immunes lors de l'examen prénuptial. La circulaire n°605 du 27 septembre 1983 recommande l'information des femmes enceintes non immunes sur les moyens de prévention contre la toxoplasmose. **Le décret n° 92-144 du 14 février 1992, impose un dépistage sérologique** de la toxoplasmose avant la fin du premier trimestre de la grossesse en l'absence de résultats prouvant l'immunité acquise, ainsi qu'une surveillance par un suivi sérologique mensuel **des femmes enceintes** séronégatives jusqu'à l'accouchement.

La législation impose de réaliser le diagnostic sérologique par au moins deux techniques différentes afin de **rechercher deux isotypes différents dont les IgG** et de pratiquer un **titrage en unités internationales pour les IgG (UI/mL)**.

L'enquête 2006 du CNR révélait que 86% des 28 laboratoires spécialisés utilisaient au moins deux techniques de dosage contre 34% des 58 laboratoires privés non spécialisés participants à l'enquête (32). En pratique, la **majorité des laboratoires** non spécialisés utilisent **une seule technique**, en général une technique **immunoenzymatique commerciale**. Les résultats du CNQ toxoplasmose de l'ANSM de novembre 2012 le confirme ; 80% des laboratoires (1162 participants) utilisent une seule technique pour le dosage des IgG (Annexe 1) et 90% des participants utilisent une technique immunoenzymatique (33).

La seconde sérologie doit être effectuée trois semaines plus tard avec les mêmes techniques et dans le même laboratoire. En cas de titre limite, ou de suspicion d'une infection récente, une reprise en parallèle des deux sérums est préconisée.

Le laboratoire doit mentionner sur son compte-rendu les techniques utilisées avec les valeurs seuils et le résultat doit être accompagné d'une conclusion argumentée avec interprétation du profil sérologique et des modalités du suivi. Il a également l'obligation de conserver à -20°C tous les sérums analysés pendant au moins 1 an.

La détermination du statut immunitaire de la future mère vis-à-vis de la toxoplasmose avant la conception permettrait de limiter les difficultés d'interprétation des sérologies au cours de la grossesse. Ainsi pour les femmes en âge de procréer, il pourrait être utile de prévoir une sérologie lors de la prescription d'un moyen de contraception et à l'arrêt de celui-ci en cas de première sérologie négative. De même, un dernier contrôle sérologique 3 semaines à 1 mois après l'accouchement est fortement conseillé pour détecter les séroconversions en fin de grossesse.

2. Cinétique des anticorps

Lors de l'infection aiguë, la dissémination des tachyzoïtes suscite une réponse immunitaire humorale (IgM, IgA, IgG, Figure 3 (24) et IgE) et cellulaire qui va contrôler la circulation des parasites en une à deux semaines. Parallèlement des kystes intracellulaires se forment en 10 à 15 jours préférentiellement dans les tissus peu exposés aux anticorps (muscles, cerveau, rétine) et vont alors produire des antigènes qui traversent la membrane kystique ce qui permet d'entretenir l'immunité acquise qui sera protectrice contre toute nouvelle infection à condition que le sujet soit immunocompétent ; c'est la phase chronique de la maladie. Le diagnostic de la toxoplasmose chez la femme enceinte même en phase aiguë repose donc sur le dépistage d'anticorps spécifiques compte tenu de la brièveté de la parasitémie sanguine.

Les IgM sont les premiers anticorps synthétisés au cours de l'infection. Ils apparaissent en général **7 jours après la contamination**, atteignent un plateau entre 1 et 2 mois et puis vont progressivement diminuer pour se négativer en général en 9 mois. Chez certains patients, les IgM persistent plus de deux ans après l'infection. Ces taux résiduels d'IgM spécifiques sont détectés très longtemps après l'infection aiguë par la majorité des techniques récentes du fait de leur sensibilité de plus en plus améliorée, ce qui peut conduire à une difficulté d'interprétation des résultats sérologiques (34,35,36).

La sécrétion des **IgA** survient dans le premier mois de l'infection avec une cinétique comparable à celle des IgM si ce n'est que la négatation sera plus rapide entre 3 et 6 mois dans la majorité des cas. Les IgA sont de bons marqueurs d'infection récente car il n'existe pas d'anticorps naturels de type IgA, toutefois ils ne sont pas synthétisés dans 5% des infections aiguës ce qui limite leur utilisation. Ils sont, surtout, utilisés dans le diagnostic néonatal de toxoplasmose congénitale et dans les cas de réactivation chez les immunodéprimés du fait de leur grande spécificité.

Les IgG, apparaissent **1 à 3 semaines après l'apparition des IgM**. Les IgG de spécificité anti-membranaire apparaissent 2 semaines environ après la contamination, augmentent rapidement pour atteindre leur maximum à 2 mois post contamination. Elles sont détectées par les techniques utilisant des antigènes membranaires (Dye-Test, IFI...). Les IgG de spécificité anti-cytoplasmique sont détectées, par des méthodes immunoenzymatiques utilisant des antigènes solubles, plus tardivement vers 1 mois et atteignent leur maximum vers 3 mois. Les IgG se stabilisent pendant 6 à 8 mois et au bout d'un an elles vont commencer à diminuer progressivement pour persister à vie mais à de faibles titres parfois très proches du seuil de positivité. Les concentrations résiduelles en IgG sont le témoin d'une infection ancienne et chez la femme enceinte le témoin d'une immunité protectrice pour son enfant. L'avidité des ces IgG augmente lentement durant les quatre premiers mois.

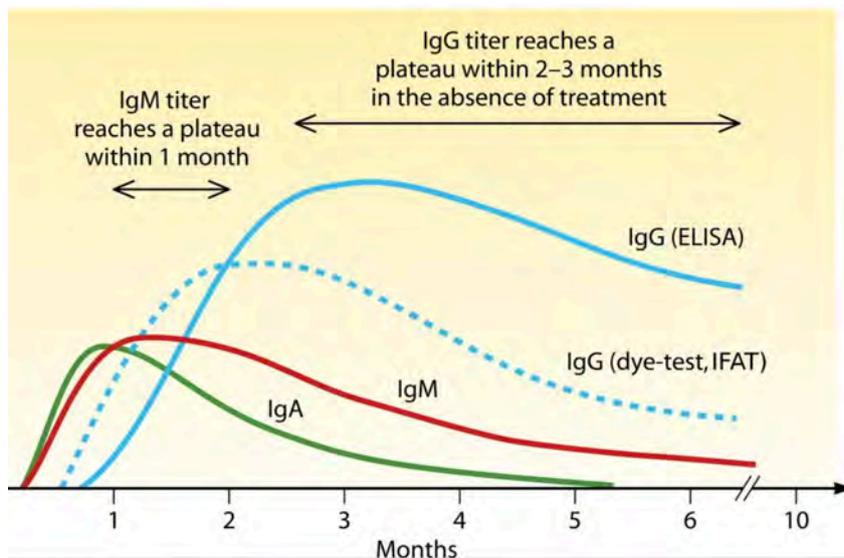


Figure 3 : Cinétique des anticorps dans une infection toxoplasmique (24)

Le **diagnostic d'une infection toxoplasmique aiguë** repose, donc, sur :

- **l'apparition d'anticorps spécifiques IgM, IgA puis IgG** signant la séroconversion,
- ou
- **l'ascension significative des IgG** (avec ou sans IgM) sur deux prélèvements réalisés à trois semaines d'intervalles (le titre des anticorps doit être au moins multiplié par 2).

En effet, le dosage des IgM est réalisé avec les mêmes trousse de dépistage que celles utilisées pour les IgG mais la spécificité de ces techniques commercialisées n'est pas excellente, (37,38) car elles détectent les IgM naturelles ou issues d'une réaction intercurrente non spécifique. Ainsi l'apparition d'IgM seule peut-être le témoin du début d'une séroconversion (IgM spécifiques) ou d'une réaction non spécifique. Le diagnostic d'infection aiguë ne peut, donc, se baser exclusivement, sur la positivité des IgM qui doivent être associées avec une cinétique des IgG compatible avec une infection aiguë. Il est donc indispensable de détecter ces IgG très précocement au cours de l'infection afin de proposer une prise en charge rapide de la patiente. Cependant, selon la nature des antigènes utilisés par les fabricants de réactifs, la détection des IgG sera plus ou moins précoce car l'organisme élabore en premier lieu les immunoglobulines spécifiques dirigées contre les antigènes membranaires, puis contre les antigènes cytoplasmiques du parasite.

3. Techniques sérologiques pour la détection des IgG

Les techniques de dosage des anticorps peuvent utiliser des antigènes figurés ou des antigènes solubles. Les **antigènes figurés** ou antigènes membranaires ou antigènes de surface, sont des tachyzoïtes entiers, vivants ou fixés. Les **antigènes solubles**, sont des extraits de tachyzoïtes, vivants inactivés ou recombinants, composés d'un mélange d'antigènes cytoplasmiques et d'antigènes membranaires en proportion variable qui n'est jamais précisé par le fabricant. Une proportion plus importante en antigène membranaire permet une détection plus précoce des anticorps.

Il existe plus d'une quarantaine d'antigènes différents qui stimulent l'immunité de l'organisme infecté. La mosaïque antigénique du toxoplasme est d'autant plus complexe que les antigènes sont caractéristiques du stade évolutif (tachyzoïte ou bradyzoïte), différents selon la souche de toxoplasme et peuvent pour certains être communs avec des antigènes de l'environnement à l'origine de la détection d'IgM naturelles. Parmi ces antigènes, on peut citer :

- **Les antigènes membranaires SAG : SAG1 (p30), SAG2 (p22), SAG3...**

Les antigènes membranaires sont les premiers antigènes contre lesquels les anticorps sont élaborés. L'antigène SAG1 qui correspond à une protéine de surface de poids moléculaire de 30 kDa (p30) est le plus immunogène des antigènes parasitaires. Il représente 5% des protéines du tachyzoïte et n'a pas de réactions croisées avec d'autres antigènes. Les anticorps anti-SAG1 sont les plus précoces et leur révélation via l'apparition de la bande 30 sur le Western Blot est le marqueur le plus précoce d'un début de séroconversion.

- **Les antigènes cytoplasmiques :**

Antigène d'organelles internes IE

Antigène de Rhoptries ROP : ROP1 (p66), ROP2 (p54)...

Antigène de granules denses GRA : GRA1 (p24), GRA2 (p28), GRA3, GRA4 (p41), GRA6, GRA7 (p29), GRA8 (p35)...

Les antigènes GRA2 et GRA7 sont détectés précocement au cours de l'infection aiguë soit dans les heures qui suivent l'infection (39,40). L'antigène GRA8 (p35) est détecté quelques heures après l'infection mais persiste également durant l'infection chronique. Ainsi 8% des infections anciennes ont des anticorps anti GRA8 (41).

Les techniques utilisant des antigènes figurés (Dye test, IFI, Agglutination directe sensibilisée) sont plus précoces dans la détection de l'infection aiguë que celles utilisant les antigènes solubles (Agglutination indirecte, Techniques immunoenzymatiques, Western Blot). La cinétique d'apparition des anticorps, lors d'une séroconversion, est donc différente suivant la technique utilisée, dépendamment de la constitution antigénique du kit. Le choix des techniques doit être fait en parfaite connaissance de la cinétique de production des anticorps afin d'interpréter au mieux les résultats sérologiques obtenus.

Deux grands groupes de techniques peuvent être distingués :

- **les techniques de première intention, ou de dépistage**

Dans le sérodiagnostic de la toxoplasmose, de nombreuses techniques peuvent être utilisées en première intention, agglutination, immunofluorescence ou techniques immunoenzymatiques mais ces dernières étant automatisées sont les plus utilisées, en routine, par les laboratoires d'analyses médicales. En 2012, 1162 laboratoires ont participé au CNQ toxoplasmose de l'ANSM pour le dosage le dosage des IgG. 90% des participants utilisaient une technique immunoenzymatique (EIA), 8% des techniques d'agglutination et 1% l'IFI (Annexe 1). Les résultats du CQE du CTCB de 2016 confirment ces tendances avec **95% des laboratoires utilisant les EIA**, 3% les techniques d'agglutination, 1% l'IFI et seulement 0,2% soit un seul laboratoire le dye test (Annexe 2).

- **les techniques de deuxième intention, ou complémentaires**

Les techniques complémentaires sont réalisées lorsque les résultats obtenus par les tests de dépistage soulèvent un problème d'interprétation avec pour objectif de clarifier

l'interprétation sérologique afin d'adapter la prise en charge clinique et thérapeutique ultérieure. Elles sont en général réalisées au sein de laboratoires experts. Leur choix de mise en œuvre est conditionné essentiellement par le profil IgG/IgM de dépistage et l'interprétation des résultats nécessite de connaître les limites propres à chaque méthode. On peut citer parmi ces techniques complémentaires : le **Western Blot IgG** qui permet de confirmer la positivité d'IgG à de faibles titres, l'**avidité des IgG** qui permet de dater une infection.

3.1. Le Dye test

Mis au point en 1948 par Sabin et Feldmann, le Dye test ou test de lyse des toxoplasmes vivants ou test de Salbin et Feldmann n'est plus disponible que dans de rares centres experts vu la complexité de sa réalisation, son coût, la difficulté à l'accréditer et la nécessité d'entretenir la souche de toxoplasme virulente RH chez la souris.

Son principe est basé sur l'observation au microscope de la lyse des **tachyzoïtes vivants** par les anticorps spécifiques présents dans le sérum à tester (décomplémenté) après ajout de complément. Les anticorps sensibilisent la paroi cellulaire du toxoplasme à l'action du complément (ajouté postérieurement), ce qui entraîne une fuite du contenu du toxoplasme. La réaction est positive lorsque 50% des toxoplasmes sont lysés. Les toxoplasmes lysés auront perdu leur réfringence au microscope à contraste de phase (test de lyse) ou seront colorés lorsque la réaction a été réalisée en présence de bleu de méthylène (dye test). Le sérum est testé à plusieurs dilutions afin de pouvoir déterminer le titre qui correspond à la dernière dilution ayant provoqué la lyse de 50% des toxoplasmes. Le seuil de positivité est à 2 UI/mL. Ce test dépiste essentiellement les IgG dirigés contre les antigènes membranaires mais il peut être également sensible aux IgM.

Cette technique reste la **technique de référence** ou « **Gold Standard** » en raison de sa sensibilité, de la précocité de détection des IgG en début d'infection (10 à 15 jours après contamination) et surtout de sa grande spécificité (42,43,44).

3.2. L' Immunofluorescence Indirecte (IFI)

L'IFI utilise des **tachyzoïtes entiers formolés** et fixés sur une lame en verre à puits dans lesquels sont ajoutées différentes dilutions du sérum à tester. Les anticorps anti-*Toxoplasma gondii* du sérum des patients se fixent sur les tachyzoïtes et sont révélés par addition d'anticorps anti-immunoglobulines humaines de type IgG (et/ou IgM) marquées par un composant fluorescent, l'isothiocyanate de fluorescéine. La lecture se fait au microscope à fluorescence et la présence d'anticorps spécifiques se manifeste par une fluorescence homogène des tachyzoïtes. Le titre correspond à la dernière dilution du sérum pour laquelle l'intégralité de la membrane des tachyzoïtes apparaît fluorescente. En utilisant dans chaque réaction un témoin positif à titrage connu, ce titre pourra être converti en UI/mL.

L'IFI est principalement utilisée dans la détection des IgG avec une détection très précoce 10 à 15 jours après la contamination et les rares faux positifs sont dus à la présence d'anticorps antinucléaires. Sa sensibilité et sa spécificité sont proches de celles du Dye Test (45). Le réactif le plus connu est le Toxo spot IF® de BioMérieux.

Les principaux inconvénients de cette méthode sont qu'elle requière un microscope à fluorescence, du temps et des lecteurs (techniciens, biologistes) très qualifiés compte tenu de la subjectivité de la lecture en présence de fluorescence non spécifique (bruit de fond)(46).

3.3. Les techniques d'agglutination

Ce sont des techniques sérologiques **qualitatives ou semi-quantitatives** simples, rapides, peu coûteuses qui ne nécessitent pas de microscope et donc très utilisées car facile à mettre en place au laboratoire.

La législation française imposant pour le diagnostic sérologique la détection et le titrage des IgG, ces techniques ne peuvent être utilisées qu'en complément de techniques quantitatives.

En 2006, le CNR a mené une enquête concernant les techniques utilisées par les laboratoires en France, qui montre que les laboratoires utilisent encore les techniques d'agglutination.

Parmi les 28 laboratoires experts du réseau CNR, 86% utilisaient au moins deux méthodes

avec pour 64% d'entre eux (15 laboratoires) une technique d'agglutination qui était dans 56% des cas le Toxoscreen® DA. Cette technique d'agglutination était dans les 2/3 des cas associée à une technique ELISA et dans 1/3 des cas seule en technique de confirmation. Parmi les 58 laboratoires privés d'Alsace ayant participé à l'enquête, seul 34% des labos utilisaient deux méthodes avec pour 28% (6 laboratoires) d'entre eux une technique d'agglutination, technique d'agglutination indirecte au latex à 94%, toujours associée à une technique ELISA. Les résultats du CTCB 2016 (Annexe 2) montrent que seulement 3% des 646 laboratoires participants utilisent ces méthodes d'agglutination. Parmi ces 20 laboratoires, 80% utilisent l'agglutination indirecte au latex, 15% l'hémagglutination indirecte et 5% l'agglutination directe sensibilisée.

3.3.1. La technique d'agglutination directe hypersensibilisée (HS)

Cette technique est commercialisée par BioMérieux sous le nom Toxoscreen® DA. Dans une plaque de microtitration à 96 cupules sont mis en présence une suspension très riche en antigènes figurés soit en **tachyzoïtes entiers formolés sensibilisés à la trypsine** et diverses dilutions du sérum du patient. La présence d'immunoglobulines anti-toxoplasmiques dans le sérum à tester va provoquer la formation d'un voile d'agglutination en se fixant sur les toxoplasmes. L'absence d'anticorps entraîne la sédimentation des toxoplasmes au fond de la cupule se visualisant par un point. La lecture se fait à l'œil nu après 24h d'incubation et le titre correspond à la dernière dilution donnant un voile couvrant au moins 50% de la cupule. Le seuil de positivité est fixé à 4 UI/mL pour cette technique semi-quantitative.

3.3.2. Les techniques d'agglutination indirecte

Elles peuvent soit utiliser des particules de plastique (latex ou polystyrene) (Toxolatex® FUMOUGE, Pastorex® BIORAD, Toxocell® BIOKIT) soit des hématies de mouton (HAI® FUMOUGE, Cellognost® SIEMENS) sensibilisés par des **antigènes solubles** de toxoplasme. Les anticorps anti toxoplasme du sérum vont se fixer sur les billes de latex ou sur les hématies

sensibilisés entraînant une agglutination ou une hémagglutination (voile) visible macroscopiquement. Avec l'agglutination sur particules de plastique, il existe un risque de faux négatifs par phénomène de zone lorsque les titres en anticorps sont trop élevés.

Ces techniques d'agglutination directe ou indirecte détectent l'ensemble des immunoglobulines sériques (IgG et IgM) mais un prétraitement du sérum par du 2-mercapto-ethanol permet de dénaturer sélectivement les IgM et de ne détecter que les IgG ; ainsi on s'affranchit des faux positifs liés au facteur rhumatoïde ou aux IgM naturelles. Les performances de ces techniques sont très variables selon les kits commercialisés et rares sont les études récentes à ce sujet. Villard et al., qui ont comparé six tests d'agglutination, ont montré que les tests d'agglutination directe ou d'hémagglutination indirecte avaient de meilleures performances avec moins de faux positifs par rapport aux techniques d'agglutination sur particules de plastique (47). Franck et al. ont montré que le test d'agglutination HS Toxoscreen® avait une bonne sensibilité de détection des IgG et pouvait être utilisé en technique de confirmation mais restait moins fiable que le Dye Test (48).

3.4. Les techniques immunoenzymatiques (EIA)

Les « techniques immunoenzymatiques » regroupent à défaut l'ensemble des techniques, dont les nouvelles, les plus utilisées en France, qui ne reposent plus sur un dosage enzymatique contrairement aux techniques les plus connues (ELISA, ELFA) mais sur un dosage immunologique par chimiluminescence sans étape enzymatique (CMIA, CLIA, ECLIA).

Les techniques immunoenzymatiques sont des méthodes quantitatives qui permettent le titrage des IgG en UI/mL. Elles ont l'avantage d'être **automatisables** (microplaques ou automates fermés), **fiables, reproductibles, rapides** avec une lecture objective ce qui fait que ce sont les plus utilisées en routine.

De nombreuses troupes d'EIA sont actuellement commercialisées pour le dosage et titrage des IgG anti-toxoplasmique (Annexe 3) : ABBOTT (Architect®, AxSYM®), BECKMAN COULTER (Access®, DXI®), BIOMERIEUX (Vidas®), BIORAD (Platelia®), DIASORIN

(Liaison®), ORTHO (Vitros®), ROCHE (Cobas®, Modular®, Elecsys®), SIEMENS (Advia Centaur®, Immulite®, Enzygnost®)...

L'enquête du CNR en 2006 confirme que ces techniques immunoenzymatiques sont très répandues au sein des laboratoires : 64% des 28 laboratoires du réseau CNR et 78% des 58 laboratoires privés participants à l'enquête utilisaient une méthode immunoenzymatique. Les EIA les plus utilisées par les laboratoires du CNR étaient Abbott, BioMérieux et BioRad et par les laboratoires privés étaient Roche et BioMérieux.

En 2016, 613 laboratoires ont participé au CQE du CTCB pour le dosage quantitatif des IgG anti toxoplasme. Même si tous les laboratoires ne participent pas à ces contrôles du CTCB, cela permet d'avoir une idée globale de la répartition des fournisseurs au sein des laboratoires en France compte tenu du nombre important de participants. 99% des laboratoires utilisent une technique EIA pour le dosage quantitatif des IgG. Parmi ces 608 laboratoires utilisant une EIA, on constate que les fournisseurs **ROCHE, ABBOTT et BIOMERIEUX** représentent à eux seuls près de **70% du marché**. (Figure 4)

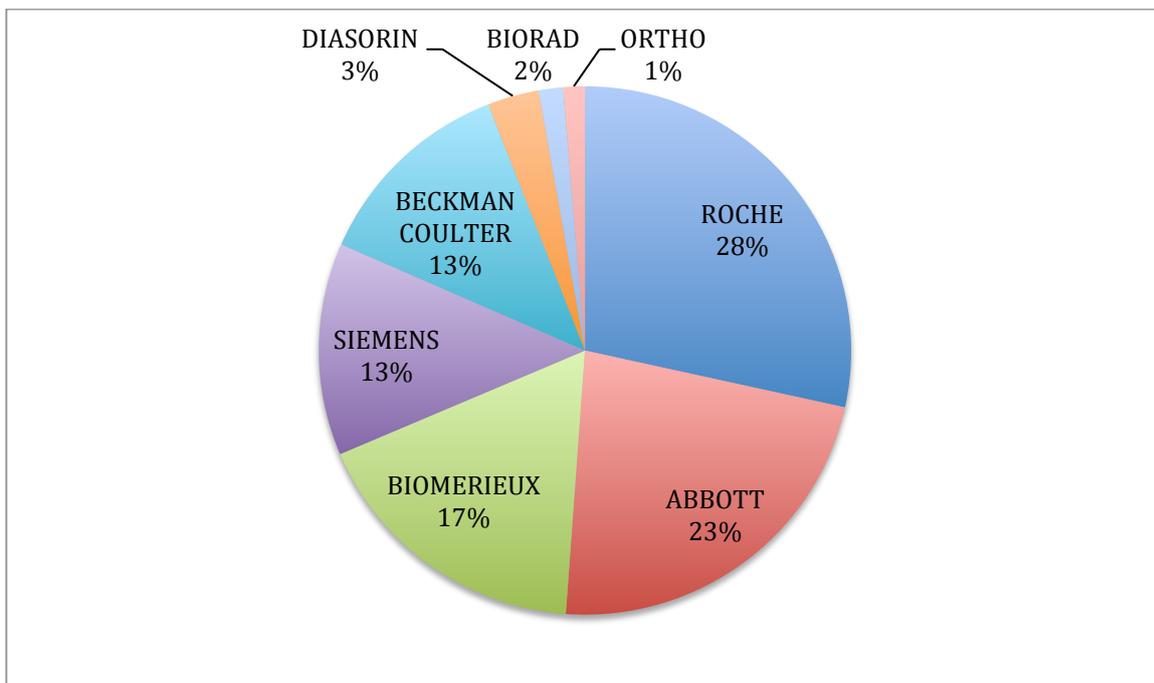


Figure 4 : Dosage quantitatif des IgG anti-*T.gondii* par EIA : répartition des fournisseurs (données CTCB Annexe 2)

Selon les trousse, la technique n'est pas la même. Il existe 5 techniques différentes :

- ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) indirect dit « classique » : BIORAD
- ELFA (Enzyme Linked Fluorescence Assay) : BIOMERIEUX
- CLIA (ChemiLuminescence Immuno Assay) : DIASORIN, BECKMAN, TGS
- CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay) : ABBOTT
- ECLIA (ElectroChemiLuminescence Immuno Assay) : ROCHE

A noter que les techniques CLIA et CMIA sont les mêmes techniques mais les fournisseurs leur ont donné des noms différents.

Toutes ces techniques, hormis l'ECLIA, reposent sur le même principe de dosage. Le dosage est réalisé en **phase solide** (microplaque, cône ou particules) **cotée d'antigènes solubles** (natifs inactivés ou recombinants) de toxoplasme en présence du sérum du patient. Après lavage et donc élimination des IgG patients non spécifiques, deux étapes clés ont lieu :

- L'ajout d'un **conjugué marqué** qui va se fixer sur l'immunocomplexe (IgG patient-phase solide). Une étape de lavage éliminera le conjugué non fixé. Le conjugué est un anticorps monoclonal anti-IgG humaine marqué différemment selon les techniques. Ainsi dans l'ELISA, technique la plus connue, le conjugué est marqué avec une enzyme.
- L'ajout d'un **substrat** (substrat chromogène, solution d'activation...) qui, après interaction spécifique avec le conjugué, va entraîner la formation d'un signal. Ce **signal** peut être un produit **coloré** (exprimé en DO et mesuré par un spectrophotomètre lors d'une ELISA), un produit **fluorescent** (mesuré par un fluorimètre lors d'une ELFA) ou un signal **lumineux** par réaction de chimiluminescence (exprimé en URL et mesuré par un photomultiplicateur lors d'une CLIA ou d'une CMIA). Ce signal sera proportionnel à la quantité d'anticorps spécifiques retenus sur le support solide. Par comparaison à une gamme d'étalon (calibration) établie à partir d'un sérum standard international (IS) de l'OMS, ce signal sera converti en UI/mL.

L'ECLIA associe un dosage immunologique en double antigène sandwich, l'ajout à postériori de la phase solide marqué (non cotée par des antigènes de toxoplasme) à une détection finale par électrochimiluminescence **ECLIA**.

3.5. Le Western Blot IgG : LDBIO-TOXO II IgG ®

Le Western Blot (ou Immunoblot) IgG est une technique de deuxième intention, **qualitative** qui permet de confirmer la présence d'IgG spécifiques. C'est une méthode simple qui peut être réalisée dans des laboratoires non spécialisés contrairement à la technique de confirmation de référence le dye test. Ses inconvénients sont le coût et le fait que la technique ne soit pas automatisée.

Des antigènes solubles de toxoplasme, dont l'antigène membranaire SAG1 (p30), sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis fixés par électro-transfert sur la surface des bandelettes de nitrocellulose. Les bandelettes de nitrocellulose sont prêtes à l'emploi et mises en présence du sérum du patient. Les anticorps du patient se fixent sélectivement sur les antigènes fixés sur la bandelette. Le principe de cette technique ressemble à celui de l'ELISA classique avec une **phase solide** (bandelette de nitrocellulose) **cotée d'antigènes solubles** de toxoplasme et deux étapes clé :

- l'ajout d'un **conjugué marqué** (anticorps monoclonaux anti-IgG humaines marqué par une phosphatase alcaline) qui se fixe aux anticorps du patient
- l'ajout du **substrat** qui entraîne la **coloration** de l'immunocomplexe **sous forme de bandes transversales violettes** sur la bandelette.

La lecture se fait par comparaison avec la bandelette du contrôle positif (Figure 5). Il y a cinq bandes visibles spécifiques de l'infection toxoplasmose entre 30 et 45 kDa : 30, 31, 33, 40 et 45. La présence d'au moins **3 bandes** parmi les 5, **incluant la bande à 30kDa** permet d'affirmer la présence d'anticorps IgG anti-*Toxoplasma gondii* dans le sérum du patient.

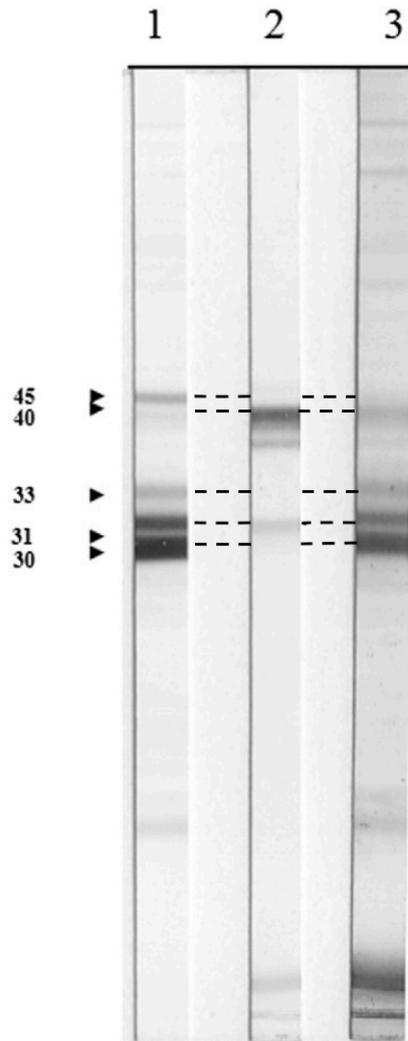


Figure 5 : 3 profils de Western Blot IgG : Profil 1 : Contrôle positif. Profil 2 : Faux positif sur un sérum avec un titre équivoque d'IgG. Profil 3 : Patient positif (49).

3.6. L'avidité des IgG

L'avidité des IgG est une notion dérivée de l'affinité et représente l'intensité de la force de liaison de l'immunoglobuline à son antigène. Ainsi en début d'infection, cette force de liaison est faible et augmente très lentement les quatre premiers mois au cours de la maturation des IgG pour atteindre son maximum vers 14 mois post-infection. L'index d'avidité des IgG est en général élevé dans les infections anciennes mais il est fréquent d'avoir une avidité faible associée à une infection ancienne car différents facteurs influencent la maturation des IgG (traitement médicamenteux, immunodépression, variabilité interindividuelle). En effet la ma-

turation des IgG est retardée chez les femmes enceintes recevant un traitement antiparasitaire (50). Une avidité faible peut persister pendant plus d'un an après la contamination (51). Cependant, il est exceptionnel d'avoir une avidité forte associée à une infection récente c'est pourquoi le test d'avidité des IgG est un test d'exclusion (52). **Une avidité forte permet d'éliminer une infection récente de moins de 4 mois** (3 à 5 mois selon la trousse) par rapport à la date du sérum testé (en général le premier sérum). La détermination de l'avidité des IgG est donc une technique complémentaire qui permet parfois de faire la datation de l'infection. Ainsi la présence d'une avidité forte lors d'un dépistage au premier trimestre de grossesse permet d'éliminer une infection au cours de la grossesse et donc d'éliminer le risque de toxoplasmose congénitale.

Il existe différentes trouses commercialisées : Vidas® (BIOMERIEUX), Liaison® (DIASORIN), Platelia® (BIORAD), Architect® (ABBOTT), Elecsys® (ROCHE)...

La mesure de l'avidité des IgG est réalisée par des techniques EIA automatisées adaptées. Deux dosages d'IgG sont réalisés en parallèle par méthode immunoenzymatique. Le premier dosage classique mesure les IgG totales et le second comprend une étape supplémentaire de lavage par un agent dissociant ce qui lui permet de ne mesurer que les IgG de forte affinité. En effet l'agent dissociant (l'urée le plus souvent), dissocie les liaisons antigène-anticorps de faibles affinité et n'aura que peu d'effet sur les liaisons de forte affinité (infections anciennes). Le rapport du signal mesuré avec agent dissociant (IgG de forte affinité) sur le signal mesuré sans agent dissociant (IgG totale) donne l'Index d'avidité. Les signaux sont le plus souvent mesurés en densité optique. La société Abbott a mis au point une méthode indirecte de détermination de l'index d'avidité. Le principe est le même sauf que l'agent dissociant est remplacé par un agent bloquant, soit des antigènes solubles recombinants membranaires SAG1, qui fixe préférentiellement les IgG de forte avidité ce qui permet de ne doser que les IgG de faible affinité.

4. Interprétation des sérologies de dépistage chez la femme enceinte

Le CNR Toxoplasmose a mis au point un algorithme décisionnel permettant l'interprétation des sérologies dans le contexte de dépistage et de suivi des femmes enceintes (Figure 6, 7, 8 et 9) (49,53).

4.1. Interprétation de la 1^{ère} sérologie

L'absence d'anticorps spécifiques (IgM et IgG), exclut une infection aiguë et conduira chez ces femmes enceintes séronégatives à poursuivre une surveillance sérologique mensuelle jusqu'à l'accouchement et un mois après, et à recommander le suivi strict des mesures hygiéno-diététiques.

La **présence d'IgG seule** nécessite un prélèvement de contrôle à trois semaines (Figure 6) :

- Si les **titres d'IgG** sont **stable** sur le 2^{ème} prélèvement alors on conclura à une immunité protectrice témoin d'une **infection ancienne**.

- Si les **titres d'IgG augmentent**, cela témoigne d'une infection potentiellement récente et il faudra alors réaliser une avidité des IgG du 1^{er} sérum afin de dater l'infection :

-Une avidité élevée permettra de conclure à une **probable réactivation** sérologique d'une infection ancienne sans risque pour le fœtus si la mère est immunocompétente.

- Une avidité intermédiaire ou basse ne permet pas d'exclure une **infection récente sans IgM ou avec IgM fugaces** même si celles-ci sont peu fréquentes (26 cas répertoriés par le CNR en 10 ans) (54).

La prise en charge médicale devra être adaptée à l'âge gestationnel.

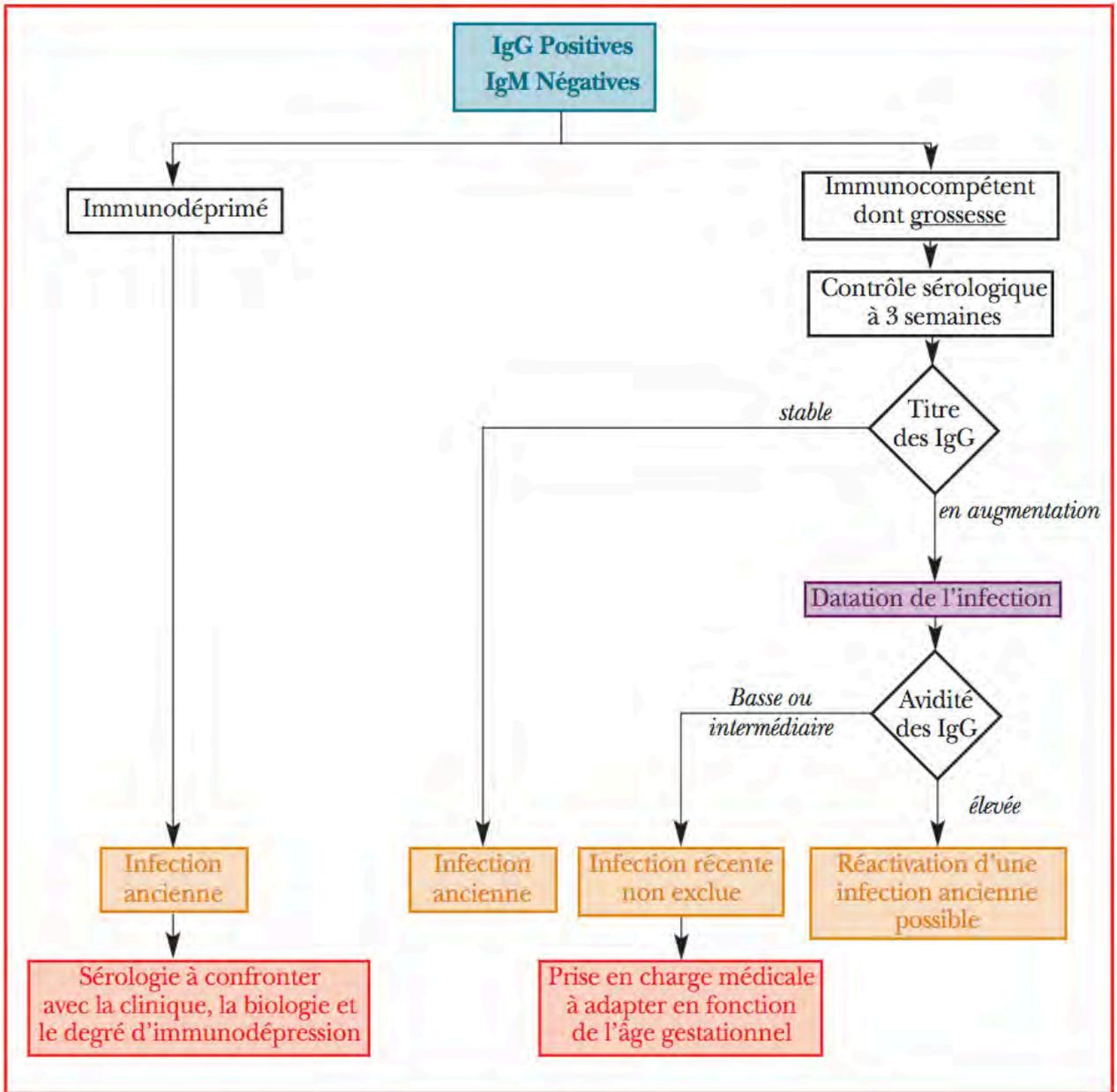


Figure 6 : IgG positives seules (53)

La **présence d'IgM et d'IgG** (Figure 7) peut être le témoin d'une **infection ancienne** (IgM résiduelles ou réactionnelles aspécifiques) ou d'une **infection récente**. Une mesure de l'avidité des IgG dans le but de dater l'infection par rapport au début de la grossesse est indispensable ainsi qu'un prélèvement de contrôle à 3 semaines pour observer la cinétique des IgG et/ou des IgM.

- Une **avidité forte** permettra d'exclure une infection dans les 4 mois par rapport à la date du premier sérum confirmé par la stabilité des IgG sur le deuxième sérum.

- Une **avidité intermédiaire ou basse** ne permet pas d'exclure une infection récente. Dans ce cas, seule la cinétique des anticorps réalisée sur le second sérum permettra de dater l'infection :

- La stabilité des anticorps signera une infection datant probablement de plus 2 à 3 mois par rapport au premier sérum.

- L'augmentation significative (titre doublé) des IgG et la diminution des IgM signera une infection récente de moins de 2 à 3 mois.

La prise en charge de la femme enceinte sera à adapter en fonction de l'âge gestationnel.

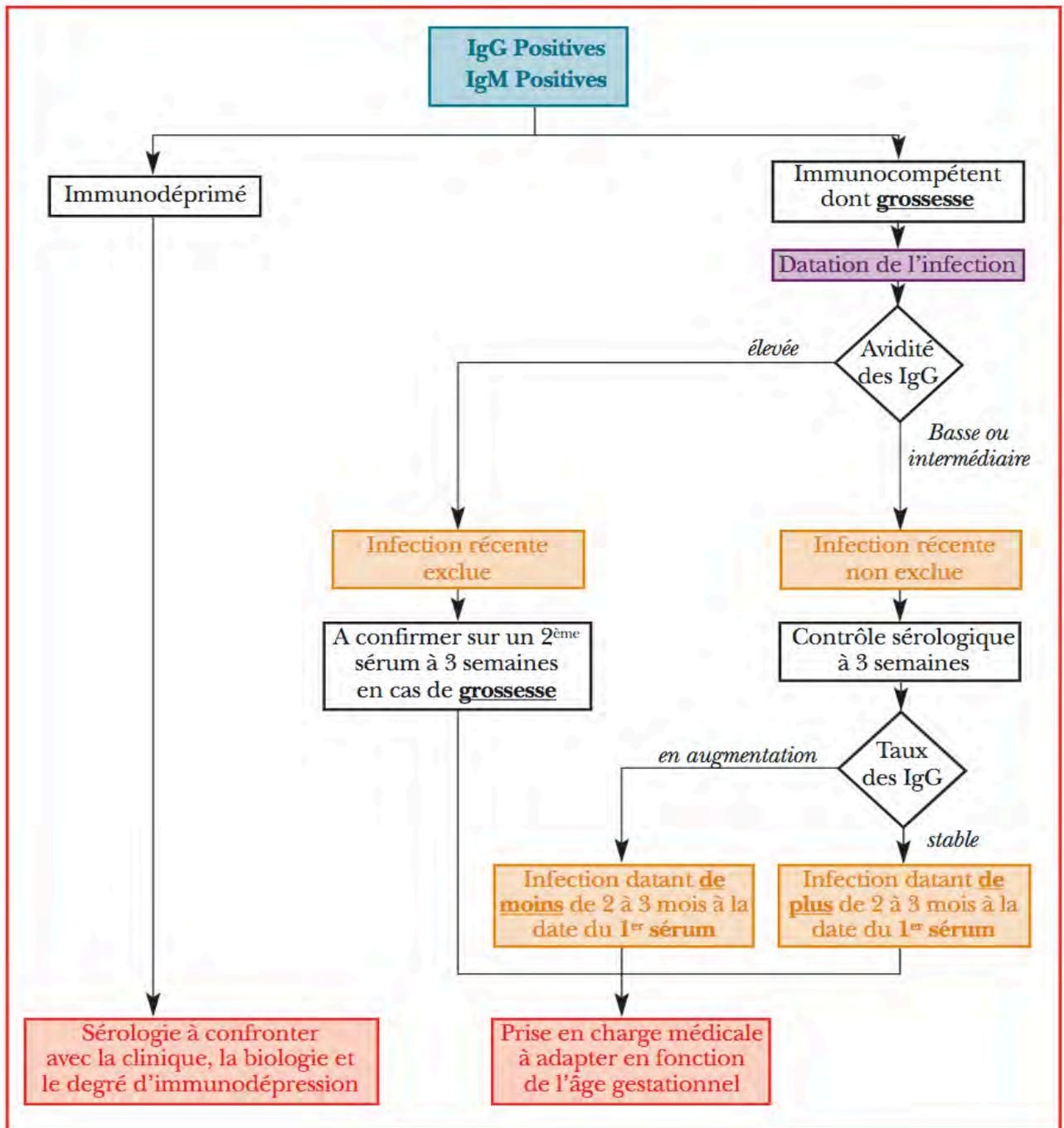


Figure 7 : IgG positives / IgM positives (53)

La **présence d'IgM seule** (Figure 8) peut être le témoin du **début d'une séroconversion** ou d'une **réaction non spécifique**. Il faut alors confirmer la positivité des IgM par une technique complémentaire de confirmation (de principe différent de la première technique), le plus souvent l'ISAGA IgM, technique de choix. En effet l'ISAGA IgM, très sensible, est aussi précoce en cas d'infection aiguë que le dye test ou l'IFI dans la détection des IgM (55). Elle est plus sensible (56) et plus spécifique (57) que les techniques immunoenzymatiques car elle permet de s'affranchir au maximum des faux positifs. Devant sa grande sensibilité et sa précocité de détection, elle est devenue la technique de référence en France en tant que technique de confirmation pour toute discordance de résultats portant sur les IgM.

- Si la **technique de confirmation** est **négative**, l'hypothèse la plus plausible est la présence d'IgM naturelles ou aspécifiques. Cependant un début de séroconversion ne peut être totalement exclu et la sérologie doit être contrôlée sur un 2^{ème} sérum 15 jours plus tard. Si cette sérologie est identique à la première alors l'hypothèse première d'IgM naturelles ou aspécifiques tend à se confirmer d'autant plus que le délai entre les deux prélèvements est important. La femme enceinte sera alors considérée comme séronégative.
- Si la **technique de confirmation** est **positive**, une infection récente est très probable. Cependant la présence d'IgM positives, même avec 2 techniques, n'exclut pas définitivement l'hypothèse d'IgM aspécifiques. Un contrôle sérologique à 15 jours puis à 1 mois est à mettre en place jusqu'à la confirmation ou non de la séroconversion. Si les résultats des deux contrôles sont identiques au premier sérum (IgG négatives et IgM positives par 2 techniques différentes), il s'agit alors d'IgM non spécifiques et il convient là aussi de poursuivre la surveillance sérologique. Par contre, si en complément des IgM, une apparition d'IgG est observée, il s'agit alors d'une séroconversion avérée. Des techniques complémentaires (Dye test, Western Blot) peuvent permettre de diagnostiquer plus précocement la séroconversion sur le premier sérum (58). La séro-

conversion toxoplasmique ne peut être confirmée que par l'apparition d'IgG spécifiques qui survient dans un délai inférieur à 1 mois dans la majorité des cas, ce délai pouvant varier en fonction des techniques utilisées et de la mise en place éventuelle d'un traitement antiparasitaire.

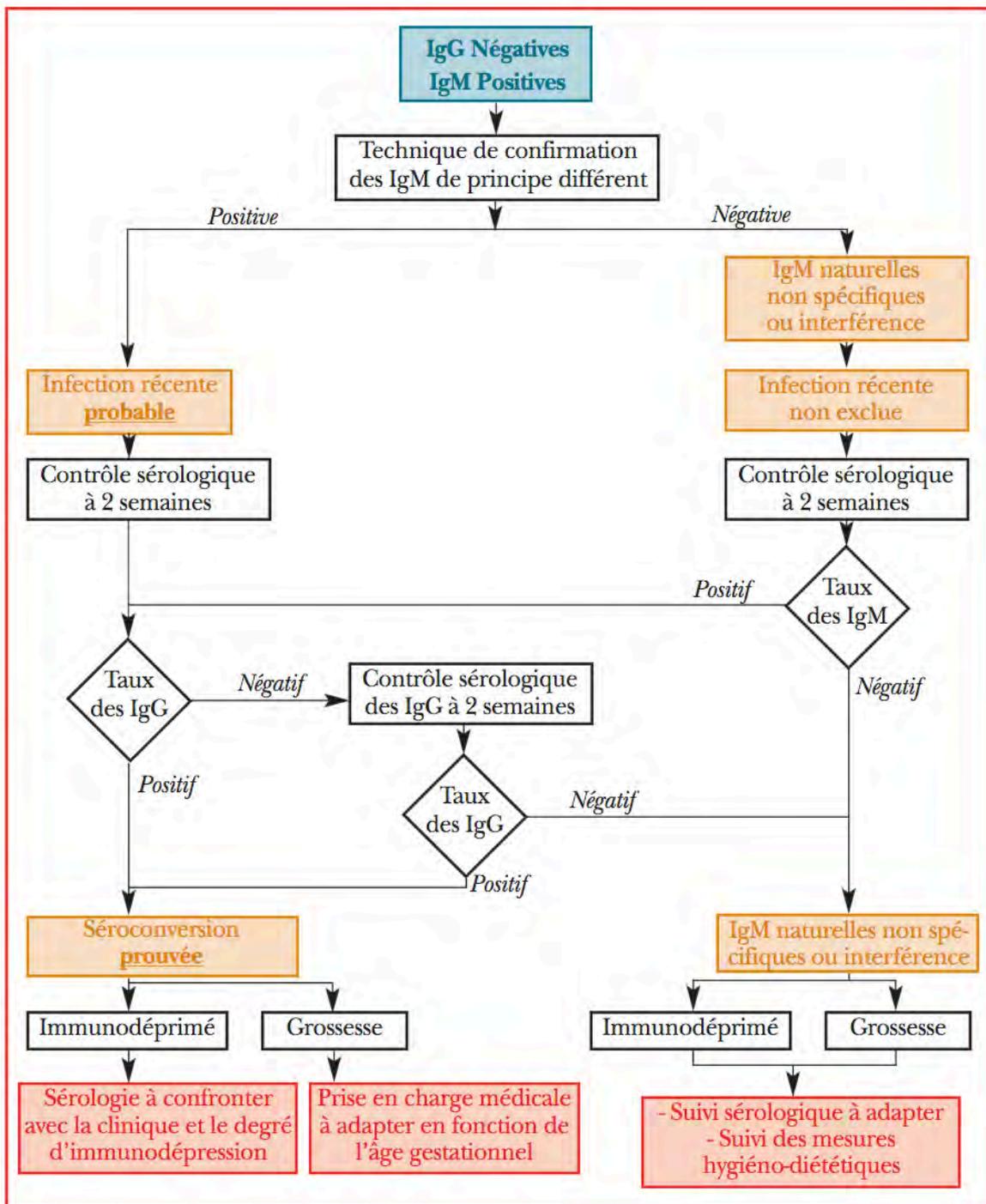


Figure 8 : IgM positives seules (53)

Présence d'**IgG équivoques** (zone grise de la technique employée) et **absence d'IgM** (Figure 9).

Ce profil sérologique soulève le problème du statut immunitaire exact de la femme enceinte et de la justification à poursuivre ou non sa surveillance lors de sa grossesse. En pratique, face à ce profil sérologique, il est recommandé de réaliser une **deuxième technique de détection des IgG** de principe différent.

- Si la deuxième technique est négative, on conclura à l'absence d'anticorps spécifiques.
- Si la deuxième technique est positive, on conclura à une infection ancienne probable à confirmer sur un sérum prélevé à 3 semaines d'intervalle.
- Si la deuxième technique est équivoque, il est recommandé de transmettre le sérum à un laboratoire expert pour la réalisation de techniques complémentaires de confirmation tel que le dye test ou le Western Blot IgG.

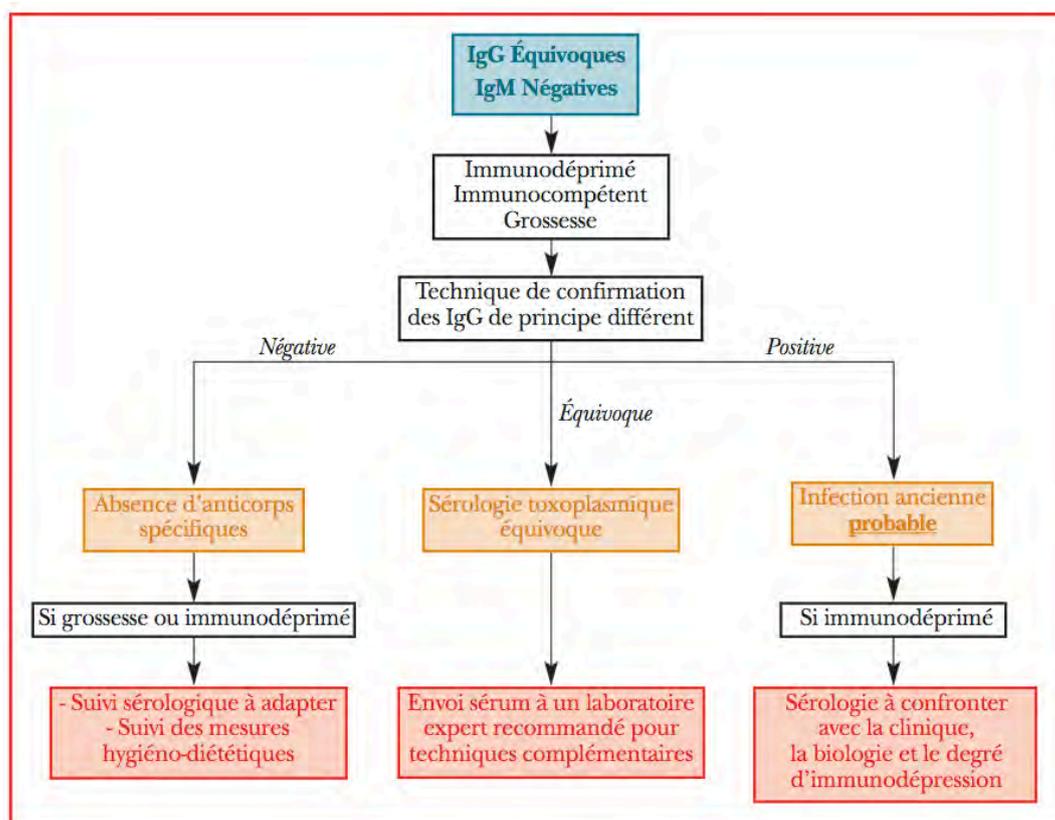


Figure 9 : IgG équivoques / IgM négatives (53)

4.2. Interprétation d'une sérologie positive à postériori d'une sérologie négative

Chez une femme enceinte préalablement séronégative, l'apparition d'IgM détectée par EIA et confirmée par ISAGA avec ou sans IgG évoque une infection de moins d'un mois compte tenu du suivi mensuel. Si les IgG sont également présentes, la séroconversion sera confirmée. Le cas échéant, des prélèvements de contrôle devront être répétés jusqu'à l'apparition des IgG qui éliminera l'hypothèse d'IgM non spécifiques et confirmera le diagnostic, permettant la prise en charge de la patiente.

Comparaison du délai de détection des
IgG à de faibles titres par sept kits com-
merciaux lors de séroconversions de
femmes enceintes.

Contexte

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses techniques peuvent être utilisées en première intention mais la majorité des laboratoires utilisent les méthodes immunoenzymatiques automatisées de détection des IgG et IgM, les plus adaptées au dépistage à grande échelle de la toxoplasmose chez les femmes enceintes. La sensibilité, de plus en plus élevée, du dosage des IgM, pourrait permettre une prise en charge plus précoce d'une infection aiguë mais la détection fréquente d'IgM naturelles ne permet pas le diagnostic de certitude (37,38). Ainsi l'apparition des IgM seule peut être le témoin du début d'une infection aiguë ou d'une réaction non spécifique. C'est pourquoi l'on ne peut conclure à une infection aiguë sur la détection d'IgM isolées et que seule l'apparition d'IgG permettra d'établir le diagnostic de séroconversion. De plus il a été reporté des cas de séroconversion sans IgM ou avec IgM fugaces (54). Le dosage des IgG est, donc, l'élément clé du diagnostic de séroconversion d'où l'importance du choix du réactif. Le réactif doit être le plus précoce possible dans la détection des IgG, afin de pouvoir poser plus rapidement le diagnostic de séroconversion, ce qui permet une prise en charge adaptée et plus rapide de la femme enceinte et de son enfant. En effet, il a été montré qu'un traitement prénatal instauré rapidement après l'infection diminuerait la fréquence et la sévérité des lésions intracrâniennes et des chorioretinites chez l'enfant.

Pour la détection des IgG, la plupart des fabricants, pour une question de sécurité, proposent des seuils de positivité élevés rendant la technique plus spécifique mais moins sensible (59). Ainsi les techniques commercialisées ont de très bonnes spécificités et il n'existe pratiquement pas de faux positif en IgG et donc pas de femmes enceintes considérées à tort comme étant immunisées et donc non suivies durant leur grossesse (60). La sensibilité de ces réactifs est plutôt bonne mais très variable selon les trousse. Après plusieurs années d'utilisation de ces réactifs, il est apparu que malgré une sensibilité apparemment équivalente, les différentes trousse permettant la détection des IgG ne réagissaient pas de manière similaire en fonction de la date de l'infection.

Le but de notre étude est de comparer le temps de détection des IgG en zone grise et en zone positive de différents réactifs lors de la séroconversion de femmes enceintes. Un réactif détectant plus précocement les IgG en zone grise permet de donner l'alerte d'une éventuelle séroconversion plus rapidement mais nécessite des investigations complémentaires. Un réactif détectant plus précocement les IgG en zone positive permet d'établir le diagnostic de certitude de séroconversion plus rapidement et de prendre en charge la patiente plus vite. Nous avons testé 6 techniques immunoenzymatiques de routine et une technique de confirmation : le Western Blot LDBIO-Toxo II IgG®. Parmi les 6 réactifs de routine nous avons testé les trois plus utilisés en France (Elecsys Toxo IgG®, Architect Toxo IgG® et Vidas Toxo IgG II®) et un nouveau réactif le TGS TA Toxo IgG® qui à ce jour ne fait pas l'objet de publications.

Matériel et Méthodes

1. Population étudiée

Cette étude rétrospective a été réalisée sur les sérums de femmes enceintes, ayant fait une séroconversion durant leur grossesse diagnostiquée au CHU de Toulouse, dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie entre Mars 2007 et Décembre 2015. Le prérequis par patiente était d'avoir une séquence de sérums comprenant un premier sérum négatif en IgG et un sérum ultérieur positif en IgG par au moins l'une des techniques. Le diagnostic de séroconversion a été réalisé, prospectivement, par les techniques utilisées en routine par le laboratoire de parasitologie et au besoin par les techniques de deuxième intention disponibles sur place.

Les sérums ont été congelés à -20°C .

2. Réactifs utilisés

Au CHU de Toulouse, les réactifs utilisés en routine pour le dépistage de la toxoplasmose étaient les suivants : Architect Toxo IgG® et IgM® sur l'automate Architect i2000 (ABBOTT Laboratories Wiesbaden, Germany), Platelia Toxo IgG ® et IgM® sur l'automate Evolis (BIORAD, Marnes La Coquette, France), Vidas Toxo IgG II® et avidité® sur l'automate Mini-Vidas (BIOMERIEUX, Marcy l'Étoile, France) et LDBIO-Toxo II IgG® (LDBio, Lyon, France). Pour établir le diagnostic de séroconversion tous les sérums avaient été dosés avec la trousse Architect Toxo IgG ® et éventuellement Platelia Toxo IgG ®, Vidas Toxo IgG II® ou LDBIO-Toxo II IgG®. Pour les dosages manquants ou les autres techniques, les analyses ont été effectuées rétrospectivement durant l'année 2015. Les réactifs Liaison Toxo IgG II® sur l'automate Liaison XL (DIASORIN, Saluggia, Italy), Elecsys Toxo IgG® sur l'automate Cobas 8000 (ROCHE Diagnostics, Mannheim, Germany) et TGS TA Toxo IgG® (TGS Technogenetics, Milano, Italy) sur l'automate IDS-iSYS (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK) ont été évalués au sein du Laboratoire de Biologie Médicale du CHU de Toulouse.

Cent de ces sérums ont été re-dosés en parallèle sur l'Architect pour vérifier leur stabilité et les résultats étaient identiques au premier dosage.

Pour l'interprétation des résultats, nous avons utilisé les seuils de positivité recommandés par les fournisseurs (Tableau 2). Les résultats sont exprimés en UI/ml pour les 6 techniques d'EIA. LDBIO II ® étant une technique qualitative le résultat est soit positif soit négatif. Il n'existe pas de zone équivoque pour le LDBIO II ® et pour le TGS TA®.

Tableau 2 : Valeur des seuils recommandés par les fournisseurs pour le dosage des IgG

Réactif (UI/mL) / Automate	IgG négatives	IgG équivoques	IgG positives
LDBIO II®	< 3 bandes ou absence de la bande 30-kDa	NA	≥ 3 bandes incluant la bande 30-kDa
Elecsys®/Cobas 8000	< 1	$1 \leq x < 30$	≥ 30
TGS TA®/IDS-iSYS	< 1,5	NA	≥ 1,5
Architect®/Architect i2000	< 1,6	$1,6 \leq x < 3$	≥ 3
Vidas II®/Mini Vidas	< 4	$4 \leq x < 8$	≥ 8
Platelia ®/Evolis	< 6	$6 \leq x < 9$	≥ 9
Liaison II® /Liaison XL	< 7,2	$7,2 \leq x < 8,8$	≥ 8,8

NA: Non Applicable

2.1. Architect Toxo IgG® (Abbott Laboratories Wiesbaden, Germany)

Cette technique repose sur un dosage immunologique par chimiluminescence sur microparticule **CMIA**. Les microparticules paramagnétiques sont recouvertes **d'antigènes solubles re-combinants membranaires SAG1 (p30) et cytoplasmiques GRA8 (p35)** de toxoplasme. Le conjugué est marqué à l'acridinium. L'ajout du substrat, solution d'activation, va déclencher la réaction de chimiluminescence exprimée en **URL** et mesurée par le système optique **ARCHITECT iSystem**. La notice ne précise pas si la calibration est effectuée à partir d'un sérum IS de l'OMS

2.2. Elecsys Toxo IgG® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Cette technique EIA associe un dosage immunologique en double antigène sandwich à une détection finale par électrochimiluminescence **ECLIA**.

Le sérum est mis en présence **d'antigènes solubles recombinants membranaires SAG1 (p30)** marqués à la biotine pour une partie et marqués au ruthénium pour la deuxième partie.

Il va se former un sandwich entre les IgG du patient et les deux types d'antigènes. On ajoute la phase solide soit les microparticules magnétiques marquées à la streptavidine. Le complexe immun se fixe à la phase solide par la liaison streptavidine-biotine pour former le complexe : microparticules*streptavidine – antigène*biotinylés- IgG patients – antigène*ruthénium. Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure où les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. Une différence de potentiel appliqué à l'électrode entraîne la production de luminescence (ruthénium) mesurée par un photomultiplicateur. La calibration est effectuée à partir du 3^{ème} sérum IS de l'OMS (TOXM).

Etant donné l'architecture antigénique de la trousse, du dosage en double antigène sandwich et de la sensibilité de l'électroluminescence, les titres d'anticorps peuvent être plus élevés qu'avec d'autres techniques. Dans la notice du fournisseur deux types de seuils sont donnés :

- si le dépistage repose sur le dosage simultané des IgG et IgM, comme en France, le seuil de positivité est de 30 UI/ml
- si le dépistage ne repose initialement que sur le dosage des IgG, comme aux Etats-Unis, le seuil de positivité est de 3 UI/ml.

2.3. LDBIO-Toxo II IgG® (LDBio, Lyon, France)

Le **Western Blot** IgG est une technique qualitative qui permet de confirmer la présence d'IgG spécifiques. Le principe de cette technique ressemble à celui de l'ELISA classique au cours de laquelle la phase solide se déroulerait sur une bandelette de nitrocellulose cotée **d'antigènes solubles** de toxoplasme. dont cinq protéines spécifiques de poids moléculaire compris entre 30 et 45 kDa : p30 (SAG1), p31, p33, p40 et p45. La présence d'au moins **3**

bandes parmi les 5, **incluant la bande à 30kDa** permet d'affirmer la **présence d'anticorps IgG anti-Toxoplasma gondii** dans le sérum du patient.

2.4. Liaison Toxo IgG II® (Diasorin, Saluggia, Italy)

Cette technique repose sur un dosage immunologique par chimiluminescence **CLIA**. Les particules magnétiques sont recouvertes **d'antigènes solubles de toxoplasme vivant inactivé** (souche RH). Le conjugué est marqué par un dérivé de l'isoluminol. Le substrat est un réactif starter qui va entraîner la réaction de chimiluminescence soit un signal lumineux exprimé en **URL** et mesurée par un photomultiplicateur. La calibration est effectuée à partir du 2^{ème} sérum IS de l'OMS (E6 national).

2.5. Platelia Toxo IgG ® (BioRad, Marnes La Coquette, France),

Cette technique repose sur un dosage immunoenzymatique sur phase solide de type **ELISA** indirect pouvant être réalisé manuellement ou sur un gestionnaire de plaque tel que l'Evolis®. Une microplaque est sensibilisée par des **antigènes solubles de toxoplasme vivant inactivé**. Le conjugué est marqué par une enzyme : la peroxydase. Le substrat chromogène spécifique de la peroxydase, va être hydrolysé en un produit coloré, exprimé en **DO** et mesuré par un spectrophotomètre à 450/620 nm. La gamme étalon est effectuée à partir du 3^{ème} sérum IS de l'OMS (TOXM).

2.6. TGS TA Toxo IgG® (TGS Technogenetics, Milano, Italy)

Cette technique repose sur un dosage immunologique par chimiluminescence **CLIA**. Les particules magnétiques sont recouvertes **d'antigènes solubles de toxoplasme vivant purifiés**. Le conjugué est l'anticorps monoclonal conjugué à un dérivé de l'ester d'acridinium. Le substrat, une solution d'activation, va entraîner la réaction de chimiluminescence exprimé en **URL**. La notice ne précise pas si la calibration est effectuée à partir d'un sérum IS de l'OMS

2.7. Vidas Toxo IgG II® (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France)

Le principe du dosage associe la méthode immunoenzymatique en sandwich en deux étapes à une détection finale en fluorescence **ELFA**. Les cônes sont sensibilisés par des **antigènes solubles de toxoplasme vivant inactivé** (souche RH). Le conjugué est marqué par une enzyme : la phosphatase alcaline. Le substrat va être hydrolysé en un produit fluorescent. Le signal de **fluorescence** est mesuré par un fluorimètre à 450 nm. La calibration est effectuée à partir du 2^{ème} sérum IS de l'OMS.

3. Analyse statistique

Les caractéristiques de la population étudiée ont été décrites en utilisant les pourcentages et la médiane avec interquartile (IQR) au vu des distributions non gaussiennes.

Les réactifs ont été comparés par rapport à leur délai de détection des IgG dans la zone grise et dans la zone positive. Une analyse de survie a été conduite avec comme variable d'intérêt la détection des IgG. La 1^{ère} analyse s'est attachée à comparer le délai de détection des IgG en zone grise ou équivoque (titres faibles) et la 2^{ème} le délai de détection des IgG en zone positive. Pour TGS TA® et LDBIO II®, en l'absence de zone grise, le seuil positif a été utilisé pour les deux analyses.

Dans les deux cas, l'analyse multivariée a été faite à l'aide d'un modèle de Cox, avec stratification par patiente afin de limiter les variabilités interindividuelles (âge, terme de grossesse, traitement anti-*Toxoplasma gondii*). Le seuil de significativité était de 5% et les risques relatifs (RR) et leurs intervalles de confiances à 95% ([_{95%}IC]) ont été utilisés pour décrire les facteurs associés.

L'Architect®, étant le test utilisé en 1^{ère} intention dans le service, a été pris comme référence pour établir le différentiel en jours de délai de détection des IgG entre les différents automates.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel : Intercooled Stata 9.2 statistical package (StataCorp, College Station, TX).

Résultats

1. Population étudiée et nombre de sérums analysés

Entre 2007 et 2015, 620 sérums issus de 269 femmes enceintes ont été inclus avec une médiane de 2 sérums par patiente (IQR [2;3]) espacés par un temps médian de 20 jours (IQR [14;29]). L'âge médian était de 29 ans (IQR [27;33]).

Tous les sérums ont été dosés avec l'Architect® : 605 avec Platelia®, 418 avec Vidas II®, 412 avec l'Elecsys®, 382 avec Liaison II®, 336 avec TGS TA® et 291 avec LDBIO II®.

La Figure 10 montre la répartition des titres d'IgG équivoques et positifs selon les réactifs ce qui confirme le manque de standardisation entre les réactifs malgré la calibration en fonction d'un étalon standard.

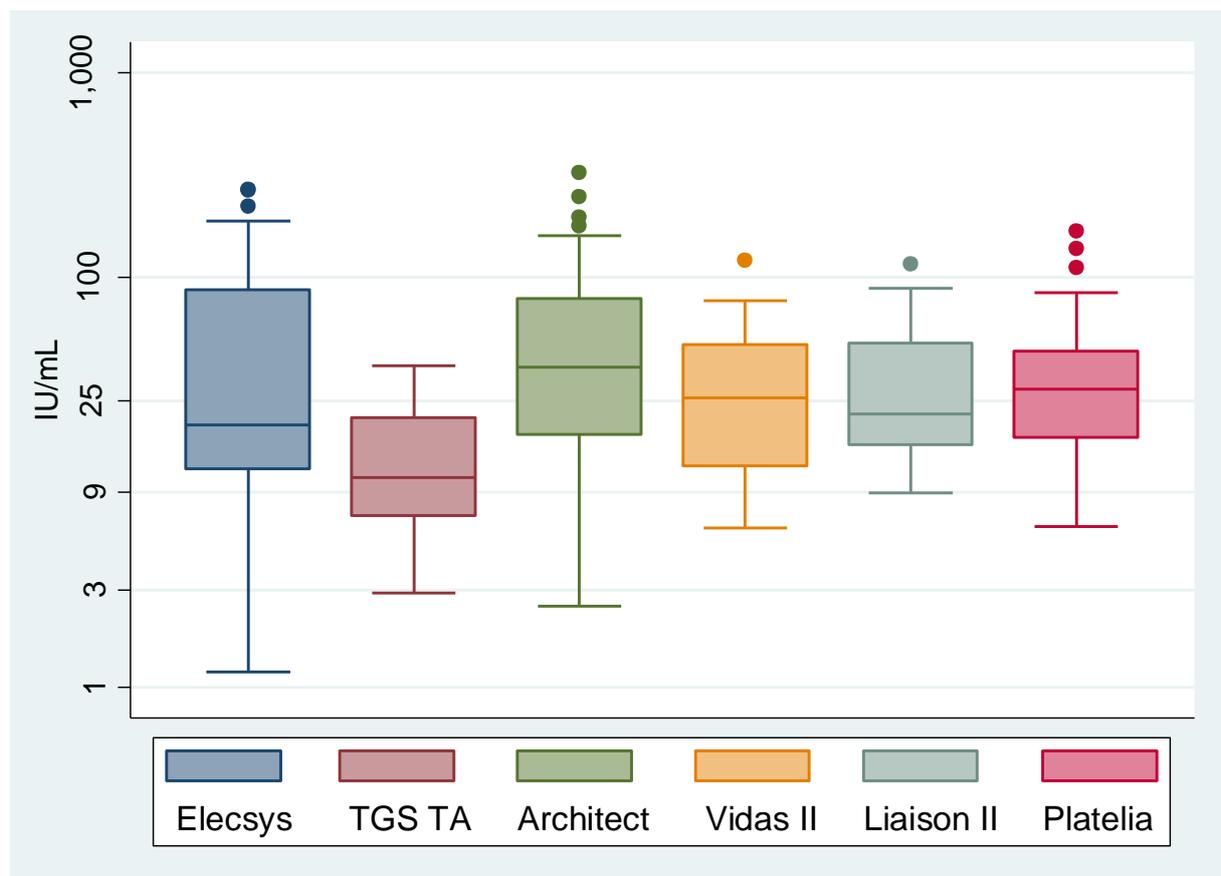


Figure 10 : Distribution des titres d'IgG (UI/ml) équivoques et positifs parmi les 6 réactifs d'EIA.

2. Etude des profils du Western Blot

Au cours de l'étude, 291 WB LDBIO II® ont été réalisés dont 101 négatifs.

Parmi les WB négatifs, 50% (50/101) n'avaient aucune bande. Parmi les **WB négatifs présentant au moins une bande, 84%** d'entre eux avaient la **bande 30 kDa** (42/51).

Concernant les WB positifs, les profils les plus représentés (Figure 11) était le 30-40-45 à 49% (92/190), le 30-31-40-45 à 24% et le 30-31-33-40-45 à 19% (37/190). Le profil **30-40-45** représente près de la **moitié des profils de WB positifs**.

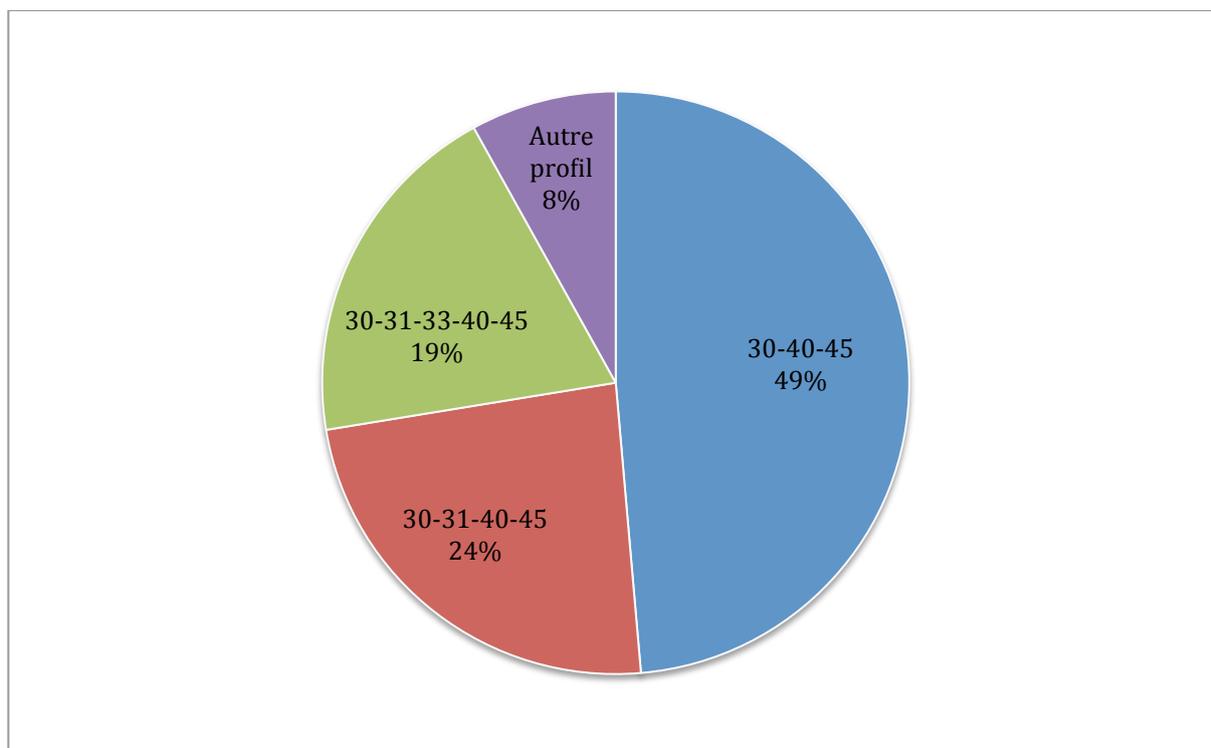


Figure 11 : Répartition des profils immunologiques au sein des Western Blot positifs

3. Délai de détection des IgG à de faibles titres

L'analyse de survie (Figure 12) montre les délais médians de détection des IgG à de faibles titres, soit dans la zone grise pour les réactifs en possédant une, soit dans la zone positive pour les réactifs TGS TA® et LDBIO II®. Ainsi par précocité de détection en zone grise, nous retrouvons l'Elecsys® avec un délai médian de 15 jours (IQR [1;33]), l'Architect® avec 17 jours (IQR [1;31]), le Vidas II® avec 25 jours (IQR [13;38]), le Liaison II® avec 30 jours (IQR [15;44]) et enfin le Platelia® avec 31 jours (IQR [17;46]).

Le délai moyen de détection des IgG en zone positive est de 8 jours (IQR [1;29]) pour LDBIO II® et de 22 jours (IQR[1;36]) pour TGS TA®.

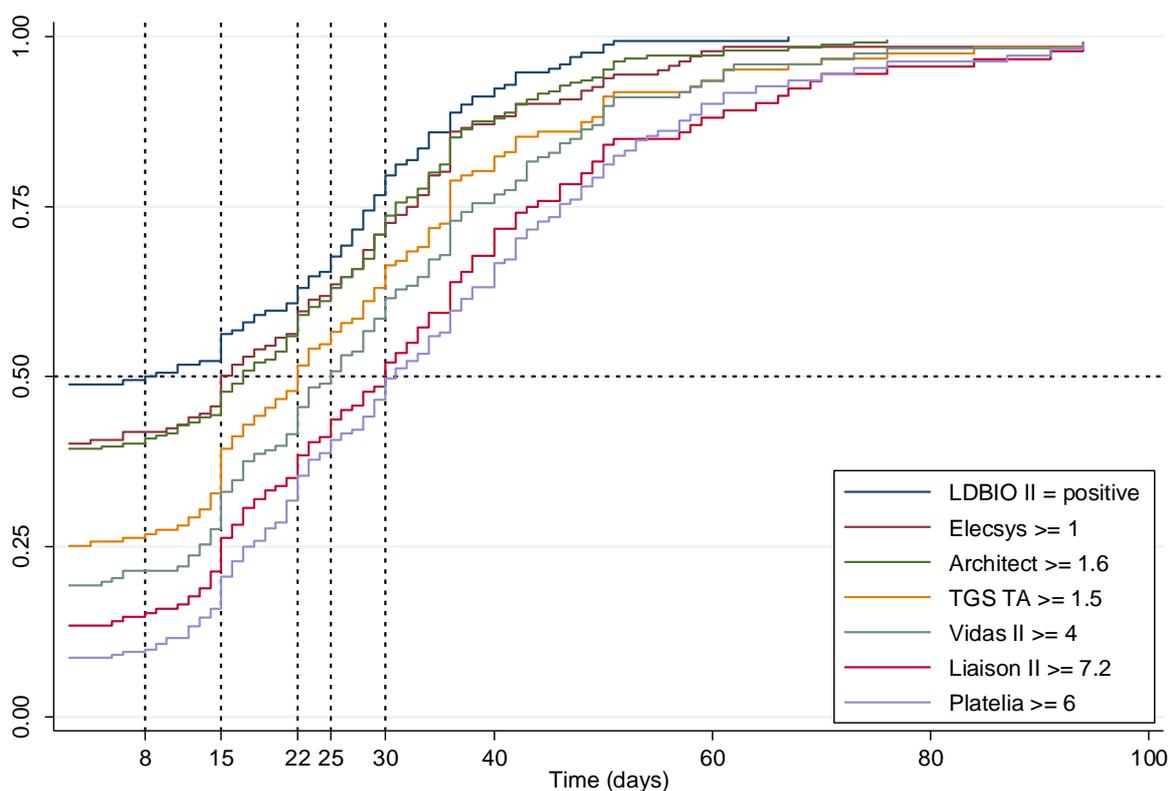


Figure 12 : Courbe de Kaplan-Meier représentant le délai avant la détection d'IgG à de faibles titres.

Comme le montre le Tableau 3, les délais de détection des IgG à de faibles titres étaient significativement plus longs avec TGS TA®, Vidas II®, Liaison II® ou Platelia® qu'avec l'Architect® variant de 5 à 14 jours. Le délai de détection était significativement plus court avec LDBIO II® avec un gain de détection de 9 jours par rapport à l'Architect®. Les délais de détection des IgG en zone équivoque pour l'Elecsys® n'est pas significativement différent de celui de l'Architect®.

Tableau 3 : Différentiel de délai de détection d'IgG à de faibles titres

Réactifs	Δ temps (jours)	RR [95%IC]	p
LDBIO II®	-9	1,27 [1,03;1,56]	0,022
Elecsys®	-2	0,98 [0,80;1,20]	0,839
Architect®	Reference	1	Reference
TGS TA®	+5	0,70 [0,60;0,87]	0,001
Vidas II®	+8	0,61 [0,50;0,75]	<0,001
Liaison II®	+13	0,49 [0,39;0,61]	<0,001
Platelia®	+14	0,41 [0,33;0,61]	<0,001

4. Délai de détection des IgG dans la zone positive

L'analyse de survie (Figure 13) montre les délais médians de détection des IgG dans la zone positive. Ainsi par précocité de détection on retrouve le LDBIO II® avec un délai moyen de 8 jours (IQR [1;29]), l'Architect® avec 21 jours (IQR [1;34]), TGS TA ® avec 22 jours (IQR[1;36]), le Vidas II® avec 32 jours (IQR [21;49]), le Liaison II® avec 33 jours (IQR [17;49]), le Platelia® avec 34 jours (IQR [20;49]) et enfin l'Elecsys® avec un délai médian de 49 jours (IQR [36;64]).

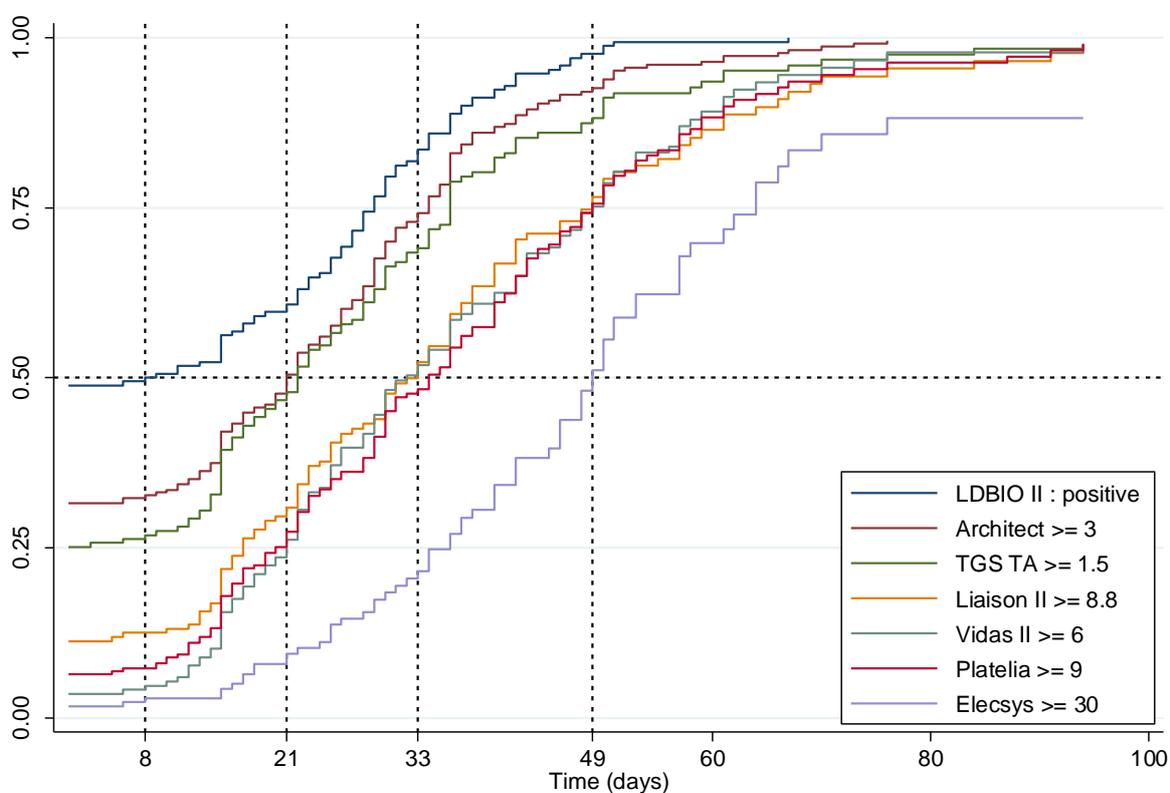


Figure 13 : Courbe de Kaplan-Meier représentant le délai avant la détection d'IgG dans la zone positive.

Comme le montre le Tableau 4, les délais de détection des IgG dans la zone positive étaient significativement plus longs avec le Vidas II®, le Liaison II® le Platelia® ou l'Elecsys® qu'avec l'Architect® variant de 11 à 28 jours. Le délai était significativement plus court avec LDBIO II® avec un gain de détection de 13 jours par rapport à l'Architect®. Le délai de détection d'une IgG en zone positive pour TGS TA® n'était pas significativement différent de celui de l'Architect®.

Tableau 4 : Différentiel de délai de détection des IgG en zone positive

Réactifs	Δtemps (jours)	RR [95%IC]	p
LDBIO II®	-13	1,66 [1,34;2,06]	< 0,001
Architect®	Reference	1	Reference
TGS TA®	+1	0,84 [0,67;1,04]	0,105
Vidas II®	+11	0,43 [0,35;0,55]	< 0,001
Liaison II®	+12	0,48 [0,38;0,61]	< 0,001
Platelia®	+13	0,40 [0,32;0,50]	< 0,001
Elecsys®	+28	0,19 [0,15;0,26]	< 0,001

5. L'Elecsys Toxo IgG®

L'Elecsys® montre de très bons délais de détection des IgG dans la zone équivoque, aussi précocement que l'Architect®, cependant pour la détection des IgG dans la zone positive il a un important retard de détection de l'ordre de 28 jours. Au bout de 64 jours, environ 25% des patientes ne sont toujours pas positives en IgG et 10% des patientes ne le seront jamais en restant dans la zone grise pendant toute la période d'étude. L'utilisation du seuil de positivité à 3 UI/mL au lieu de 30 UI/mL permettrait d'avoir un délai médian de détection des IgG en zone positive à 26 jours (IQR [14;42]) au lieu de 49 jours (IQR [36;64]) et un retard de détection des IgG en zone positive de 5 jours au lieu de 28 jours. En conséquence, en cas d'IgM positive, pour l'Elecsys® l'utilisation du seuil de positivité à 3 UI/mL permettrait un gain de 23 jours pour le diagnostic de séroconversion.

Discussion

Cette étude présente une comparaison des délais de détection des IgG anti-*Toxoplasma gondii* par 7 réactifs sur une large cohorte de patientes (269 panels), pour le diagnostic de séroconversion au cours de la grossesse. Pour un médecin alerté par la détection d'IgM isolées, les réactifs permettant, le plus précocement, de renforcer l'hypothèse de la séroconversion sont l'Elecsys® et l'Architect®, souvent confirmée par la positivité du Western Blot. Ils sont capables de détecter des titres douteux d'IgG au moins 5 jours avant les autres réactifs de dépistage de routine. Pour faire le diagnostic de certitude de séroconversion, l'Architect® et le TGS TA® sont les plus sensibles en détectant des titres positifs d'IgG au moins 10 jours avant les autres réactifs de routine. Il n'y a pas d'études sur TGS TA® mais il semble avoir les qualités requises pour le diagnostic précoce de séroconversion si ce n'est le fait qu'il ne possède pas de zone grise. En cas d'IgM positive, l'utilisation pour l'Elecsys® au seuil de positivité à 3 UI/mL (seuil recommandé aux Etats-Unis) au lieu de 30 UI/mL permettrait un gain de 23 jours pour le diagnostic de séroconversion.

Un des principaux problèmes d'interprétation des sérologies est le **manque de standardisation des tests sérologiques** en dépit de l'existence du standard international à partir duquel sont calibrées les trousse et de l'expression des résultats en UI/mL. Les **titres** et la cinétique des IgG sont complètement **différents** pour un **même échantillon** selon les trousse. Des variations de médianes de titre d'IgG jusqu'à un facteur 28 (9 UI pour l'AxSYM® - Abbott, 32 UI pour le Vidas II® - BioMérieux, 248 pour le Modular® - Roche) ont été observées sur des sérums positifs en Western Blot (60). Cette variation peut avoir deux explications. D'une part, le **titrage des IgG** s'effectue en **UI/mL** grâce à un **étalonnage** par rapport à un des **différents sérums international IS de l'OMS** qui existent. Le choix du 2^{ème} IS OMS (TOXS) (Vidas II®, Liaison II®) ou du 3^{ème} IS OMS (TOXM) (Elecsys®, Platelia®) pourrait contribuer à la variation quantitative des résultats même si l'étude de Rigsby (61) n'a pas mis en évidence de

différences significatives. D'autre part, les **différences épitopiques des antigènes solubles utilisés dans les trousse**s, influencent la cinétique des anticorps détectés et empêchent la comparaison des résultats d'une technique à l'autre (62). Les différentes trousse immunoenzymatiques de détection des anticorps utilisent des antigènes solubles dont la **proportion membranaire/cytoplasmique** est variable (et confidentielle). Une proportion plus importante d'antigènes membranaires entraînera une détection plus précoce des anticorps. Les antigènes peuvent provenir de la lyse du tachyzoïte (natifs inactivés) ou être fabriqués (recombinants). Les réactifs utilisant les antigènes **recombinants** (Architect® et Elecsys®) ont l'avantage d'avoir une meilleure reproductibilité et d'être plus standardisés mais leur sensibilité pourrait être plus faible surtout en phase chronique par rapport à ceux utilisant les antigènes parasitaires **natifs inactivés**. Les anticorps produits lors de l'infection contre les antigènes natifs n'auraient pas la même affinité pour l'antigène recombinant car celui-ci n'a pas exactement la même structure tridimensionnelle (63). Pour optimiser la sensibilité, il faudrait faire une combinaison de plusieurs antigènes recombinants. Aubert a montré que la combinaison d'antigènes recombinants tels que SAG1, GRA8 et GRA7 serait plus efficace que les antigènes natifs inactivés (64,65).

Ainsi chaque trousse a sa propre composition antigénique, souvent gardée secrète, et ses propres seuils de positivité (variant de 3 à 30 UI/mL selon les trousse). Les variations quantitatives des titres d'IgG inter-techniques sont compensées par les **seuils de positivité variants** de 3 pour l'Architect® à 30 pour l'Elecsys® entraînant une bonne corrélation qualitative des automates. En effet la **concordance globale** entre les techniques reste très **satisfaisante** entre 91% et 100% selon les comparaisons. L'AxSYM® et l'Architect® (du fournisseur ABBOTT) sont corrélés à 99,5% et ont une sensibilité de séroconversion comparable (41). Le Liaison II®, le Vidas II® et le Platelia® sont corrélés à 100% alors que l'AxSYM® n'est corrélé qu'à

91% avec le Liaison II® (56). Le Vidas II® est plus corrélé au Liaison II® 97% qu'à l'Architect® 94-95% (66,67).

La plupart des compagnies ont choisi un seuil de positivité plus haut privilégiant la spécificité par rapport à la sensibilité. Ainsi les différentes trousse ont de très **bonnes spécificités** entre 98% et 100% (41,48,68,69) avec de rares faux positifs, ceux-ci n'étant jamais retrouvés par deux techniques différentes sur un même sérum (60). Roche a choisi un seuil de positivité plus bas à 30 UI/mL (par rapport à sa médiane) le rendant plus sensible mais moins spécifique que les autres fournisseurs (60). L'étude de Leslé confirme ce manque de spécificité de l'Elecsys®, conseillant de confirmer les résultats équivoques par un Western Blot (70).

La **sensibilité** est bonne mais très **variable** selon les réactifs surtout dans la détection des IgG à des concentrations très faibles et proches du seuil de positivité. Cette variabilité entraîne de nombreux résultats **discordants, de l'ordre de 8 à 9%** (60,69), posant des problèmes majeurs d'interprétation sérologique. La majorité des fournisseurs, a donc défini une **zone grise ou équivoque** correspondant à ces faibles titres d'IgG. Il ressort de l'analyse de la littérature que le LDBIO II® a une des sensibilités les plus élevées à 99,2%. L'Elecsys® a une sensibilité supérieure à celle du Vidas II® (48). L'IMX® et l'Architect® ont une sensibilité supérieure au Vidas II® dans les infections aiguës (41,46) celui-ci ayant une sensibilité supérieure au Platelia® (69). A contrario dans les infections chroniques, l'étude de Murat montre que le Vidas II® et le Liaison II® ont une meilleure sensibilité par rapport à l'Architect® (66). Le Modular® a une meilleure sensibilité que l'AxSYM® et le Vidas II® (60). Platelia® a la sensibilité la plus médiocre mais celle-ci pourrait être considérablement améliorée par une diminution de son seuil de positivité de 9 à 4,4 UI/ml (70,71). Les différentes publications étudient les performances des réactifs en calculant des sensibilités relatives par rapport à une technique de référence choisie. La technique prise pour référence peut être le Dye-test, gold-standard, ou

une autre technique comme le LDBIO II®, l'IFI, les techniques d'agglutination ou les EIA. Ces sensibilités sont calculées à partir d'un échantillonnage de sérums provenant de différentes situations cliniques. L'échantillonnage des infections aiguës et/ou chroniques ne comprend pas forcément des sérums à faibles titres d'IgG ce qui augmente la sensibilité relative et la concordance des techniques. Sachant que les IgG détectées en phase aiguë sont différentes de celles détectées en phase chronique compte tenu de leur maturation au cours du temps, il paraît plus pertinent d'évaluer les sensibilités des réactifs sur des titres faibles d'infections aiguës (sensibilité de séroconversion) et sur des titres faibles d'infections chroniques avec pour méthode de référence le Dye test ou une technique ayant fait preuve des mêmes performances analytiques.

Quelques études proposent une évaluation de la **sensibilité de séroconversion** qui permet de définir la technique la plus précoce pour diagnostiquer une séroconversion à partir de panels (entre 12 et 39 selon les études), de femmes enceintes ayant fait une séroconversion au cours de la grossesse. Un panel est composé d'au minimum 3 sérums séquentiels (dont le premier négatif en IgG) pour une même patiente. Sickinger (41) a montré en 2008 une sensibilité de séroconversion comparable entre l'AxSYM® et l'Architect®. Roux (68) a montré que l'AxSYM® (et l'IFI) était plus précoce que le Vidas II® (10/20 panels). Gay-Andrieu (67) a montré que l'Architect® était plus précoce que le Vidas II® (18/28). Une troisième étude le confirme, l'Architect® détecte plus précocement les IgG que le Vidas II® (7/15) mais également que le Liaison II® dans une moindre mesure (3/15) (66). L'étude de Franck (48) a montré que le LDBIO II® était plus précoce (8 /17) que l'Elecsys® avec pour une patiente une positivité du Western Blot plus de 21 jours avant la détection en zone grise des IgG pour le Elecsys®. L'étude de Jost (58) montre que le Western Blot est plus précoce dans le diagnostic de séroconversion dans 92% des cas par rapport au Platelia® et à l'Elecsys® qui donnent des résultats négatifs ou équivoques. Le Western Blot est plus précoce que l'IFI dans un

tiers des cas, qui lui même est plus précoce que l'Elecsys® et Platelia® sur 49% des sérums. En considérant la détection en zone équivoque, l'Elecsys® est beaucoup plus sensible et plus précoce que le Platelia®. L'utilisation pour l'Elecsys® du seuil de positivité à 3 UI/mL au lieu de 30 UI/mL entraîne un gain de sensibilité de diagnostic de séroconversion sur le 1^{er} sérum de 56% (58). Ces résultats supportent deux hypothèses principales. La première que le **LDBIO II® est le plus précoce** pour confirmer un diagnostic de séroconversion (par comparaison à l'IFI, à l'Elecsys® et au Platelia®). La deuxième est le **retard de détection** des IgG lors de séroconversion par le **Vidas II®, le Liaison II® ou le Platelia® par rapport à l'Architect®**. A noter que **L'Elecsys® est plus précoce que le Platelia®** mais qu'il n'y a pas d'études comparant l'Elecsys® et l'Architect®.

Des titres faibles d'IgG autour du seuil de positivité ou des résultats discordants nécessitent d'effectuer une **technique de confirmation**. Le gold standard pour la détection des IgG spécifiques est le Dye Test mais il n'est disponible que dans de rares centres de référence compte tenu du fait qu'il requiert du toxoplasme vivant. L'alternative de choix, en tant que technique de confirmation, est le LDBIO II® avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 99,2%. D'après l'étude de Franck (48), le LDBIO II® présente une excellente concordance avec le test de lyse de Sabin et Feldman. Il peut donc être utilisé comme technique de confirmation dans les laboratoires où le Dye Test ne peut être réalisé (48). D'autres techniques de confirmation peuvent être utilisées telle que l'IFI et le test d'agglutination directe sensibilisé Toxoscreen®. Le Toxoscreen® a une bonne sensibilité mais il est moins fiable que le Dye Test. L'IFI, technique considérée comme une des plus précoces dans la détection des IgG, est plus précoce que les techniques immunoenzymatiques mais a un retard de détection des IgG par rapport au LDBIO II® sur 13 des 33 séroconversions (58) et sur 8 des 17 séroconversions (72). Notre étude confirme que le **LDBIO II® est une excellente alternative de confirma-**

tion de séroconversion en première ligne chez les femmes enceintes avec un **gain de 13 à 41 jours par rapport aux techniques de routine.**

L'analyse de l'ordre d'apparition des bandes sur le Western Blot montre que la bande 30 est la première à apparaître. Il n'existe pas de zone grise cependant **la présence** de moins de 3 bandes mais incluant la **bande 30** doit **alerter sur un début de séroconversion**. En effet, dans l'étude de Jost (58), sur 13 WB négatif, 88% (7/8) de ceux qui possédaient au moins une bande avaient la bande 30 positive et sur 26 WB positifs de séroconversion il a été retrouvé par ordre de fréquence les bandes : 40 (100%) 45 (80,8%) 31 (77%) et 33 (11,5%). Dans notre étude, nous confirmons la précocité de la positivité de la bande 30 chez 84% (42/50) des WB négatif qui possédaient au moins une bande. Sur les 190 WB positifs de séroconversion nous avons retrouvé par ordre de fréquence les bandes: 45 (98%), 40 (97%), 31 (90%), et 33 (46%). Les **profils** de Western Blot positifs les **plus fréquents** dans l'ordre décroissant étaient le **30-40-45**, le 30-31-40-45 et le 30-31-33-40-45.

Une des limites de notre étude est que le diagnostic des séroconversions s'est basé sur les résultats de l'Architect®, du Platelia® et/ou du Vidas II® avec possiblement un biais de sélection. Cependant d'après nos résultats et différentes études, ce biais serait très limité compte tenu du fait que l'Architect® est probablement la technique de dépistage la plus précoce pour la détection d'IgG en zone équivoque et positive lors de séroconversion.

Conclusion

Une infection toxoplasmique au cours de la grossesse peut, en cas de transmission au fœtus, être responsable d'une toxoplasmose congénitale dont les séquelles seront plus ou moins graves et atténuées par le traitement antiparasitaire d'autant plus que celui-ci est administré précocement après l'infection maternelle. La fréquence et la gravité des toxoplasmoses congénitales ont conduit à la mise en place d'un programme de prévention avec le dépistage sérologique de toutes les femmes enceintes et le suivi sérologique mensuel des femmes non immunisées. Le dosage des IgG est l'élément clé du diagnostic de séroconversion car en cas d'apparition d'IgG chez une femme non immunisée, il permet d'établir le diagnostic de séroconversion. Le dosage des IgG à des titres faibles proches des seuils de positivité est difficile, surtout si la sensibilité de la trousse n'est pas suffisante, posant des difficultés dans l'établissement du statut immunitaire chez les femmes enceintes. Le manque de coopération et de transparence des fabricants limite l'harmonisation et la standardisation de la titration et des seuils de positivités. Ainsi chaque trousse a sa propre composition antigénique et ses propres seuils de positivité dont doit tenir compte le biologiste pour l'interprétation des résultats. Comme le rappelle l'AFSSAPS dans sa note de 2008 (Annexe 4), chez la femme enceinte, la comparaison de titres d'IgG de sérums successifs ne peut être faite que si les dosages ont été réalisés par la même trousse pour interpréter la cinétique des anticorps. Pour comparer deux titres d'IgG, il convient de repasser les deux sérums dans le même laboratoire avec la même technique et dans la même série. La capacité d'un test à détecter de façon plus précoce les IgG et donc d'établir plus rapidement le diagnostic de séroconversion au cours de la grossesse permet une meilleure prise en charge de la femme et de son futur enfant. Bien que de nombreuses études montrent des performances analytiques sensiblement égales entre les différents réactifs, la capacité de détection précoce des faibles titres d'IgG en cas de séroconversion est différente entre les tests. Dans notre étude, parmi les techniques de routine, l'Architect® et l'Elecsys® ont les meilleures sensibilités de détection des IgG en zone équi-

voque avec un gain de détection jusqu'à 2 semaines avant les autres réactifs. L'Architect® et le TGS TA® ont les meilleures sensibilités de séroconversion avec un gain jusqu'à 4 semaines. Des titres bas d'IgG proches du seuil de positivité rendent difficile l'interprétation sérologique et nécessitent d'être confirmés ou infirmés par une technique de deuxième intention. Le Western Blot de LDBIO II® est l'alternative de choix du Dye Test, technique de confirmation de référence.

Du fait de la maturation des immunoglobulines au cours du temps, les résultats de cette étude ne sont pas extrapolables aux détections des faibles titres d'IgG dans les immunités anciennes. L'association de plusieurs techniques, comme recommandé par le CNR, permettrait de diagnostiquer, précocement les infections aiguës sans passer à côté du dépistage des infections anciennes à titres faibles. Il se peut qu'un seul et même kit ne suffise pas à répondre de façon optimale à ces deux exigences. D'autres études sur la sensibilité de la détection des titres limites d'IgG dans les infections anciennes seraient nécessaires pour éviter de considérer à tort comme séronégatives des femmes enceintes immunisées et économiser un suivi sérologique mensuel, inutile, anxiogène et coûteux.

Annexes

1. Résultats du CNQ Toxoplasmose 2012 (33)

Résultats des participants

1 - Titrage des IgG anti-toxoplasme

En ce qui concerne le titrage des IgG anti-toxoplasme, 1162 laboratoires ont rendu un résultat, soit avec un réactif (79,8%), soit avec deux réactifs (20,2%).

Les techniques employées ainsi que le détail des réactifs correspondant à chaque technique sont rapportés dans le tableau VII.

Les conclusions (« négatif », « limite » ou « positif ») rendues par les laboratoires ayant testé les échantillons 1201-1202 et 1209-1210 négatifs en IgG anti-toxoplasme sont détaillées dans le tableau VIII.

Pour chacun des deux autres échantillons qui contenaient des IgG anti-toxoplasme, les résultats des titrages IgG ainsi que les conclusions données par les laboratoires en fonction de la technique utilisée sont rassemblés dans les tableaux IX et X.

tableau VII - Réactifs utilisés

Techniques / réactifs	Nombre d'utilisateurs (%)
IMMUNOENZYMOLOGIE (IE) :	1263 (90,3%)
BIOMERIEUX "Vidas Toxo IgG"	304
ABBOTT "Architect Toxo IgG"	242
ROCHE "Elecsys/modular Toxo G"	205
SIEMENS "ToxoG/ADVIA Centaur"	98
BECKMAN "DXI Toxo IgG"	85
BECKMAN COULTER "ACCESS Toxo IgG"	85
ROCHE "Cobas Core Toxo IgG EIA"	64

SIEMENS "Immulite 2000 toxoplasmose G"	51
ABBOTT "AXSYM Toxo IgG"	47
ORTHO CLIN. DIAG. "Vitros Toxo IgG"	26
BIORAD "Platelia Toxo IgG"	20
DIASORIN "Liaison Toxo IgG"	19
BIOMERIEUX "Vidas Toxo Compétition"	9
SIEMENS "Enzygnost Toxoplasmose IgG"	6
SIEMENS "Immulite toxoplasmose G"	2
LATEX :	99 (7,1%)
FUMOUE "Toxolates"	72
BIORAD "Pastorex Toxo"	22
SERVIBIO "Servitex Toxo"	2
INSTR.LABORATORY "Toxocell latex"	3
HEMAGGLUTINATION (Hémaggl.) :	11 (0,8%)
FUMOUE "Toxo-HAI"	
IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI) :	15 (1,1%)
BIOMERIEUX "Toxo-spot IF"	
AGGLUTINATION SENSIBILISEE (Aggl. sens.) :	2 (0,1%)
BIOMERIEUX "Toxo screen DA"	
REACTIF autre ou non précisé (NP) :	8 (0,6%)
Total	1398 (100%)

2. Résultats du CTCB Toxoplasmose 2016 (73)

11.4 Sérum 1611 - IgG

Analyse des réponses qualitatives

Trousses	N	%	Négatif	Douteux	Positif =Assigné
Abbott - Architect IgG	138	21,4	0	0	138
Abbott - AxSYM Toxo G	1	0,15	0	0	1
Beckman Coulter - Access Toxo IgG (depuis 2008)	12	1,86	0	0	12
Beckman Coulter - DXI Toxo IgG	64	9,91	0	0	64
Biokit - Toxocell latex	1	0,15	0	0	1
BioMérieux - Toxo Screen DA	1	0,15	0	0	1
BioMérieux - Toxo Spot IF	6	0,93	0	0	6
BioMérieux - Vidas Toxo Compétition	3	0,46	0	0	3
BioMérieux - Vidas Toxo IgG	106	16,4	0	0	106
Biorad - Bioplex	2	0,31	0	0	2
Biorad - Pastorex Toxo	5	0,77	0	0	5
Biorad - Platelia Toxo IgG	9	1,39	0	0	9
Diasorin - Liaison Toxo IgG	1	0,15	0	0	1
Diasorin - Liaison XL Toxo IgG	19	2,94	0	0	19
Fumouze - Toxolax	10	1,55	0	0	10
Fumouze - Toxoplasmose HAI	3	0,46	0	0	3
LDBIO Diagnostics - Toxoplasma ICT IgG-IgM	1	0,15	0	0	1
LDBIO Diagnostics - Western Blot Toxo II IgG	1	0,15	0	0	1
Orthoclinical Diag - Vitros Toxo IgG	8	1,24	0	0	8
Roche - Cobas 6000 e601, Cobas 8000 e602, Modular E170	164	25,4	0	0	164
Roche - Cobas Core Toxo IgG EIA 2	1	0,15	0	0	1
Roche - Elecsys 2010, Cobas e411	9	1,39	0	0	9
Siemens - ADVIA Centaur Toxoplasma G	60	9,29	0	0	60
Siemens - Enzygnost Toxo IgG	4	0,62	0	0	4
Siemens - IMMULITE 2000/XPI Toxoplasmose IgG	15	2,32	0	0	15
TECHNOGENETICS - TGS TA Toxo IgG	1	0,15	0	0	1
Test de lyse des toxoplasmes	1	0,15	0	0	1
TOTAL	646	100%	0	0	646

Techniques	Participants	%
Techniques immunoenzymatiques	614	95,0%
Techniques d'agglutination dont	20	3,1%
Agglutination indirecte au latex	16	80%
Hémagglutination indirecte HAI	3	15%
Agglutination directe sensibilisé	1	5%
Immunofluorescence indirecte IFI	6	0,9%
Dye test DT	1	0,2%
Techniques de confirmation : avidité, Western Blot	5	0,8%
	646	100,0%

3. Table de codage des réactifs pour la sérologie toxoplasmose (74)

SERODIAGNOSTIC TOXOPLASMOSE - 15PAR1

ANSM septembre 2015

Table de codage des réactifs (liste non exhaustive)

IgG ou Ig totales anti-toxoplasme			IgM anti-toxoplasme		
CODE	REACTIF	DISTRIBUTEUR	CODE	REACTIF	DISTRIBUTEUR
RDAC	AXSYM Toxo IgG	ABBOTT	RDAP	AXSYM Toxo IgM	ABBOTT
RDAD	ARCHITECT Toxo IgG	ABBOTT	RDAR	ARCHITECT Toxo IgM	ABBOTT
RDPB	ACCESS Toxo IgG	BECKMAN COULTER	RDPO	ACCESS Toxo IgM II	BECKMAN COULTER
RDPC	DXI Toxo IgG	BECKMAN COULTER	RDPN	DXI Toxo IgM	BECKMAN COULTER
RDEA	Vidas Toxo Compétition	BIOMERIEUX	RDEA	Vidas Toxo Compétition	BIOMERIEUX
RDEB	VIDAS Toxo IgG	BIOMERIEUX	RDEM	VIDAS Toxo IgM	BIOMERIEUX
RJEA	Toxo Screen DA	BIOMERIEUX	RJEA	Toxo Screen DA	BIOMERIEUX
RFEB	Toxo-spot IF	BIOMERIEUX	RFEB	Toxo-spot IF	BIOMERIEUX
RDPA	Platelia Toxo IgG	BIORAD	RUEM	Toxo ISAGA	BIOMERIEUX
RQPA	Pastorex Toxo	BIORAD	RDPM	Platelia Toxo IgM	BIORAD
RDRC	LIAISON Toxo IgG	DIASORIN	RDRN	LIAISON Toxo IgM	DIASORIN
RDRD	LIAISON XL Toxo IgG	DIASORIN	RDRO	LIAISON XL Toxo IgG	DIASORIN
RQHA	Toxolatem	FUMOUCHE	RKHA	TOXO - HAI	FUMOUCHE
RKHA	TOXO - HAI	FUMOUCHE	RDKM	VITROS Toxo IgM	ORTHO CLINICAL DIAG.
RQJA	Toxocell latex	BIOKIT	RDON	Cobas Elecsys Modular Toxo M	ROCHE DIAGNOSTICS
RDKB	VITROS toxo IgG	ORTHO CLINICAL DIAG.	RDVM	Immulite toxoplasmose IgM	SIEMENS
RDOB	Cobas Elecsys Modular Toxo G	ROCHE DIAGNOSTICS	RDVN	Immulite 2000 toxoplasmose IgM	SIEMENS
RQSA	Servitex Toxo	SERVIBIO	RDBN	Toxo M / ADVIA Centaur	SIEMENS
RDVA	Immulite toxoplasmose IgG	SIEMENS	RDCM	Enzygnost Toxoplasmose IgM	SIEMENS
RDVB	Immulite 2000 toxoplasmose IgG	SIEMENS			
RDBB	Toxo G / ADVIA Centaur	SIEMENS			
RDCA	Enzygnost Toxoplasmose IgG	SIEMENS			

Si vous ne trouvez pas le code correspondant à votre réactif :
Ecrivez en clair le nom du réactif et le nom du distributeur sur votre bordereau réponse.

4. Point de l'AFSSAPS sur la sérologie toxoplasmose (75)



REPUBLIQUE FRANÇAISE

**DIRECTION DE L'EVALUATION
DES DISPOSITIFS MEDICAUX**

DEPARTEMENT DES VIGILANCES

UNITE REACTOVIGILANCE

Saint Denis, le 12/11/2008

Point sur la sérologie de la toxoplasmose en France

Dans le cadre de ses missions et suite à l'évaluation d'incidents de réactovigilance, l'AFSSAPS a rédigé, en collaboration avec le groupe de travail du pôle sérologie du Centre National de Référence de la Toxoplasmose (contact : Professeur Ermanno CANDOLFI, site internet du CNR https://www.chu-reims.fr/services/laboratoires/CNRtoxo/accueil_structuration.htm), ce document destiné aux professionnels de santé relatif à la sérologie de la toxoplasmose en France.

→ Rappel des données issues de la nomenclature des actes de biologie médicale:

- La sérologie de la toxoplasmose en France est l'association de deux isotypes différents (de manière générale, titrage des IgG et recherche des IgM) ;
- Le résultat rendu doit être accompagné d'une interprétation du profil sérologique (l'absence ou la présence d'anticorps, absence d'immunité, réalisation d'examen complémentaire, profil en faveur d'une immunité ancienne probable ou d'une infection récente) ainsi que des modalités de suivi sérologique, le cas échéant ;
- La ou les techniques utilisées ainsi que leurs valeurs seuil doivent être précisées explicitement sur le compte rendu.

Par ailleurs, l'attention des biologistes et des prescripteurs est attirée sur le fait que les titres d'anticorps peuvent varier de manière importante en fonction de la technique employée.

→ A ce titre, il est recommandé :

- De ne pas comparer ou interpréter conjointement les titres obtenus avec des trousse différentes ; Ces pratiques peuvent être source d'erreur d'interprétation ;
- D'utiliser une même trousse (dénomination et référence catalogue), dans le cadre des suivis sérologiques, afin d'interpréter la cinétique des taux d'anticorps.

Toute défaillance ou altération d'un dispositif médical de diagnostic in vitro susceptible d'entraîner des effets néfastes pour la santé des personnes doit être déclarée dans le cadre de la réactovigilance à l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé – département des vigilances – Fax : 01.55.87.42.82 Tel : 01.55.87.42.81

Ce courrier est disponible sur le site Internet de l'afssaps www.afssaps.sante.fr à la rubrique réactovigilance.

Bibliographie

1. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol.* 1 juill 2009;39(8):895-901.
2. Rapport annuel d'activités du CNR Toxoplasmose 2015 pour l'année d'exercice 2014. [Internet]. InVS; 2015. Disponible sur: http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2015/10/1_Rap-Act-ann%C3%A9e-dexercice-2014-CNR-TOXOPLASMOSE-090415-DEF.pdf
3. Bessières M-H, Cassaing S, Fillaux J, Berrebi A. Toxoplasmose et grossesse. *Revue Francophone des Laboratoires.* mai 2008;38(402):39-50.
4. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* avr 1998;11(2):267-99.
5. Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* juill 1998;28(7):1019-24.
6. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med.* 6 janv 2001;2001:1-19.
7. Dardé M-L, Peyron F. Toxoplasme et toxoplasmose. *Pédiatrie - Mal Infect.* oct 2012;7(4):1-12.
8. Dubey JP, Kotula AW, Sharar A, Andrews CD, Lindsay DS. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *J Parasitol.* avr 1990;76(2):201-4.
9. Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am J Vet Res.* juin 1988;49(6):910-3.
10. Rapport du groupe de travail "Toxoplasma gondii" de l'Afssa. Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation. [Internet]. 2005 déc. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-Toxoplasmose.pdf>

11. Robert-Gangneux F, Murat J-B, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Gangneux J-P, Pelloux H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* déc 2011;27(12):530-6.
12. Fillaux J. Toxoplasmose. In: *Infectiologie. Les éditions le Moniteur des pharmacies* (4ème ed). Wolters Kluwer; 2013. (Le Moniteur Internat; vol. 3).
13. Bellali H, Pelloux H, Villena I, Fricker-Hidalgo H, Le Strat Y, Goulet V. Prevalence of toxoplasmosis in France in 1998: is there a difference between men and women? At what age do children become infected? *Rev Dépidémiologie Santé Publique.* août 2013;61(4):311-7.
14. Tourdjman M, Tchéandjieu C, De Valk H, Goulet V, Le Strat Y. Toxoplasmose chez les femmes enceintes en France : évolution de la séroprévalence et des facteurs associés entre 1995 et 2010, à partir des Enquêtes nationales périnatales. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire InVS [Internet].* 2015; Disponible sur: http://www.invs.sante.fr/beh/2015/15-16/pdf/2015_15-16.pdf
15. Enquete nationale perinatale 2003 [Internet]. INSERM; 2005. Disponible sur: http://lara.inist.fr/bitstream/handle/2332/1299/Inserm_enquete.pdf%3Fsequence=1
16. Recommandations en sante publique de l'HAS. Surveillance sérologique et prévention de la toxoplasmose et de la rubéole au cours de la grossesse. [Internet]. HAS; 2009 oct. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-12/depistages_prenatals_obligatoires_argu_vf.pdf
17. Berger F, Goulet V, Le Strat Y, Desenclos J-C. Toxoplasmosis among pregnant women in France: risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. *Rev Dépidémiologie Santé Publique.* août 2009;57(4):241-8.
18. Rapport sur la toxoplasmose en France chez la femme enceinte en 2003 : séroprévalence et facteurs associés. [Internet]. InVS; 2007. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/publications/2007/toxoplasmose/toxoplasmose.pdf>

19. Nogareda F, Le Strat Y, Villena I, De Valk H, Goulet V. Incidence and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in women in France, 1980-2020: model-based estimation. *Epidemiol Infect.* août 2014;142(8):1661-70.
20. Rapport annuel d'activités du CNR Toxoplasmose 2014 pour l'année d'exercice 2013. [Internet]. InVS; 2014. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2014/09/RAPPORT-CNR-Toxoplasmose-2013.pdf>
21. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Toxoplasma gondii*. [Internet]. ANSES; 2011. Disponible sur: <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2015/10/Toxoplasma-gondii-06.12.11.pdf>
22. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet Lond Engl.* 29 mai 1999;353(9167):1829-33.
23. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* déc 1995;172(6):1561-6.
24. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* avr 2012;25(2):264-96.
25. Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières M-H, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis.* 1 sept 2002;186(5):684-9.
26. Nizard J. Toxoplasmose et grossesse. *Rev Sage-Femme.* mars 2008;37(HSA):4-9.
27. Peyron F, Wallon M, Bernardoux C. Long-term follow-up of patients with congenital ocular toxoplasmosis. *N Engl J Med.* 11 avr 1996;334(15):993-4.
28. Peyron F, Garweg JG, Wallon M, Descloux E, Rolland M, Barth J. Long-term impact of treated congenital toxoplasmosis on quality of life and visual performance. *Pediatr Infect Dis J.* juill 2011;30(7):597-600.
29. Roizen N, Swisher CN, Stein MA, Hopkins J, Boyer KM, Holfels E, et al. Neurologic

and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. *Pediatrics*. janv 1995;95(1):11-20.

30. Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, et al. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. déc 2005;94(12):1721-31.

31. McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. mars 2009;104(2):320-44.

32. Rapport annuel d'activités du CNR Toxoplasmose 2007. [Internet]. InVS; 2007. Disponible sur: <http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2012/06/RAPPORTCNRToxoplasmose-2007.pdf>

33. Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale [Internet]. 2013. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/39d15418d456a7562d9c534d35355cb9.pdf

34. Sickinger E, Braun H-B, Praast G, Stieler M, Gundlach C, Birkenbach C, et al. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Toxo IgM assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. juill 2009;64(3):275-82.

35. Bobić B, Sibalić D, Djurković-Djaković O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. Case report. *Gynecol Obstet Invest*. 1991;31(3):182-4.

36. Gras L, Gilbert RE, Wallon M, Peyron F, Cortina-Borja M. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. *Epidemiol Infect*. juin 2004;132(3):541-8.

37. Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, et al. False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol*. janv 1997;35(1):174-8.

38. Prusa A-R, Hayde M, Unterasinger L, Pollak A, Herkner KR, Kasper DC. Evaluation of the Roche Elecsys Toxo IgG and IgM electrochemiluminescence immunoassay for the detection of gestational *Toxoplasma* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* déc 2010;68(4):352-7.
39. Golkar M, Rafati S, Abdel-Latif MS, Brenier-Pinchart M-P, Fricker-Hidalgo H, Sima BK, et al. The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis.* août 2007;58(4):419-26.
40. Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Paul M, et al. Usefulness of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, GRA7 and SAG1) in an immunoglobulin G avidity test for the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Parasitol Res.* 8 août 2006;100(2):333-7.
41. Sickinger E, Gay-Andrieu F, Jonas G, Schultess J, Stieler M, Smith D, et al. Performance characteristics of the new ARCHITECT Toxo IgG and Toxo IgG Avidity assays. *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 2008;62(3):235-44.
42. Reiter-Owona I, Petersen E, Joynson D, Aspöck H, Dardé ML, Disko R, et al. The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull World Health Organ.* 1999;77(11):929-35.
43. Kulasiri C. The specificity of the Sabin-Feldman dye test with reference to protozoal infections. *J Clin Pathol.* juill 1960;13:339-48.
44. Ashburn D, Evans R, Chatterton JMW, Joss AWL, Ho-Yen DO. Strategies for detecting toxoplasma immunity. *Br J Biomed Sci.* 2003;60(2):105-8.
45. Walton BC, Benchoff BM, Brooks WH. Comparison of the indirect fluorescent antibody test and methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg.* mars 1966;15(2):149-52.
46. Olsen MA, Root PP. Comparison of four different immunoassays for detection of

Toxoplasma-specific immunoglobulin G. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mai 1994;19(1):19-24.

47. Villard O, Cimon B, Franck J, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* juill 2012;73(3):231-5.

48. Franck J, Garin YJ-F, Dumon H. LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-toxoplasma antibody detection. *J Clin Microbiol.* juill 2008;46(7):2334-8.

49. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* janv 2016;84(1):22-33.

50. Sensini A, Pascoli S, Marchetti D, Castronari R, Marangi M, Sbaraglia G, et al. IgG avidity in the serodiagnosis of acute *Toxoplasma gondii* infection: a multicenter study. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* août 1996;2(1):25-9.

51. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J Clin Microbiol.* août 1997;35(8):1972-7.

52. 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 CVI.* nov 2012;19(11):1838-43.

53. Villard O, Jung-Etienne J. Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage. *Feuillets de Biologie.* janv 2011;LII(298):43-9.

54. Fricker-Hidalgo H, Cimon B, Chemla C, Darde ML, Delhaes L, L'ollivier C, et al. *Toxoplasma* seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicenter retrospective study. *J Clin Microbiol.* juill

2013;51(7):2103-11.

55. Murat J-B, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev Anti Infect Ther.* sept 2013;11(9):943-56.

56. Petersen E, Borobio MV, Guy E, Liesenfeld O, Meroni V, Naessens A, et al. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. *J Clin Microbiol.* avr 2005;43(4):1570-4.

57. Meek B, van Gool T, Gilis H, Peek R. Dissecting the IgM antibody response during the acute and latent phase of toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 2001;41(3):131-7.

58. Jost C, Touafek F, Fekkar A, Courtin R, Ribeiro M, Mazier D, et al. Utility of immunoblotting for early diagnosis of toxoplasmosis seroconversion in pregnant women. *Clin Vaccine Immunol CVI.* nov 2011;18(11):1908-12.

59. Flori P, Chene G, Varlet M-N, Sung RTM. [Toxoplasma gondii serology in pregnant woman: characteristics and pitfalls]. *Ann Biol Clin (Paris).* avr 2009;67(2):125-33.

60. Maudry A, Chene G, Chatelain R, Patural H, Bellete B, Tisseur B, et al. Bicentric evaluation of six anti-toxoplasma immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot. *Clin Vaccine Immunol CVI.* sept 2009;16(9):1322-6.

61. Rigsby P, Rijpkema S, Guy EC, Francis J, Das RG. Evaluation of a candidate international standard preparation for human anti-Toxoplasma immunoglobulin G. *J Clin Microbiol.* nov 2004;42(11):5133-8.

62. Petithory JC, Ambroise-Thomas P, De Loye J, Pelloux H, Goullier-Fleuret A, Milgram M, et al. Le sérodiagnostic de la toxoplasmose: étude comparative multicentrique d'une gamme étalon, par les différents tests actuels et avec expression des résultats en unités internationales. Groupe de travail toxoplasmose du Contrôle national de qualité en parasitologie,

Syndicat des fabricants de réactifs de laboratoire, Groupe de travail standardisation des tests sérologiques du Réseau européen de lutte contre la toxoplasmose congénitale. Bull World Health Organ. 1996;74(3):291-8.

63. Kim K, Bülow R, Kampmeier J, Boothroyd JC. Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma* antigen SAG1 (p30) in CHO cells. Infect Immun. janv 1994;62(1):203-9.

64. Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. mars 2000;38(3):1144-50.

65. Li S, Galvan G, Araujo FG, Suzuki Y, Remington JS, Parmley S. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. Clin Diagn Lab Immunol. sept 2000;7(5):781-7.

66. Murat J-B, Dard C, Fricker Hidalgo H, Dardé M-L, Brenier-Pinchart M-P, Pelloux H. Comparison of the Vidas system and two recent fully automated assays for diagnosis and follow-up of toxoplasmosis in pregnant women and newborns. Clin Vaccine Immunol CVI. août 2013;20(8):1203-12.

67. Gay-Andrieu F, Fricker-Hidalgo H, Sickinger E, Espern A, Brenier-Pinchart M-P, Braun H-B, et al. Comparative evaluation of the ARCHITECT Toxo IgG, IgM, and IgG Avidity assays for anti-*Toxoplasma* antibodies detection in pregnant women sera. Diagn Microbiol Infect Dis. nov 2009;65(3):279-87.

68. Roux-Buisson N, Fricker-Hidalgo H, Foussadier A, Rolland D, Suchel-Jambon A-S, Brenier-Pinchart M-P, et al. Comparative analysis of the VIDAS Toxo IgG IV assay in the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. Diagn Microbiol Infect Dis. sept 2005;53(1):79-81.

69. Hofgärtner WT, Swanzy SR, Bacina RM, Condon J, Gupta M, Matlock PE, et al. Detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: evaluation of

four commercial immunoassay systems. *J Clin Microbiol.* déc 1997;35(12):3313-5.

70. Leslé F, Touafek F, Fekkar A, Mazier D, Paris L. Discrepancies between a new highly sensitive *Toxoplasma gondii* ELISA assay and other reagents: interest of Toxo IgG Western blot. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* oct 2011;30(10):1207-12.

71. Mouri O, Kendjo E, Touafek F, Fekkar A, Konte O, Imbert S, et al. The impact of lowering the cut-off value on the sensitivity of the Platelia Elisa IgG (Bio-Rad) test for toxoplasmosis diagnosis. *Parasite Paris Fr.* 2015;22:22.

72. Fiche technique LDBIO TOXO II IgG CONFIRMATION [Internet]. Disponible sur: http://www.ldbiodiagnostics.com/fichiers_site/a1181ldb/contenu_pages/wb_toxo2_vs08_fr.pdf

73. Compte rendu 161 : Toxoplasmose - Rubéole -EBV - CMV. CTCB; 2016.

74. Codage Parasitologie 15PAR1 (Liste non exhaustive) [Internet]. ANSM; 2015. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/e9d93edd50e3e8b0ce54a68dce707798.pdf

75. Point sur la sérologie de la toxoplasmose en France. [Internet]. AFSSAPS Unité Reac-tovigilance; 2008. Disponible sur: http://ansm.sante.fr/content/download/15788/184644/version/2/file/point_toxo.pdf

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruits dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèles à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

TITLE

Comparison of seven commercial assays in the diagnosis of toxoplasmosis seroconversion in pregnant woman at CHU Toulouse

SUMMARY

We assessed the ability to detect early toxoplasmic seroconversion between one immunoblot (LDBIO II®) and six automated assays (TGS TA®, Architect®, Vidas II®, Liaison II®, Platelia® and Elecsys®), comparing the time before anti-*Toxoplasma gondii* IgG detection during infection in pregnant women. From 2007 to 2015, 620 sera of 269 women were included. The median time before positive IgG detection with Vidas II®, Liaison II®, Platelia® and Elecsys® was significantly longer than with Architect® with differential times from 11 to 28 days ($p < 0.001$). This time was significantly shortened by the use of LDBIO II®, resulting in a saving of 13 days ($p < 0.001$). The detection of a positive titer of IgG with TGS TA® was as early as with Architect® ($p = 0.105$). The ability to early detect a toxoplasmic seroconversion is not equivalent between the assays and has to be considered when selecting reagents.

RESUME

Le but de l'étude est de comparer le délai de détection des IgG entre sept réactifs afin de déterminer les plus précoces dans le diagnostic de séroconversion toxoplasmique. Entre 2007 et 2015 les sérums de 269 femmes, ayant fait une séroconversion pendant leur grossesse diagnostiquée au CHU de Toulouse, ont été recueillis. Le délai de détection des IgG en zone positive par Vidas II®, Liaison II®, Platelia® ou Elecsys® était significativement plus long que par Architect® avec un retard allant de 11 à 28 jours. Ce délai était significativement raccourci par l'utilisation de LDBIO II® avec un gain de 13 jours par rapport à Architect®. Il n'y avait pas de différence significative entre TGS TA® et Architect®. Bien que de nombreuses études montrent des performances analytiques sensiblement égales entre les différents réactifs, la capacité de détection précoce des IgG en cas de séroconversion est différente. Cet élément est à prendre en compte lors du choix d'un réactif.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Biologie médicale

MOTS-CLES : Toxoplasma gondii - toxoplasmose - grossesse - séroconversion - sérologie - IgG - immunoenzymatique - Architect® - Elecsys® - Liaison II® - Platelia® - Vidas II® - TGS TA® - Western Blot - LDBIO II®

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier – Toulouse III
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, chemin des Maraîchers
31062 TOULOUSE Cedex 9

Directeur de thèse : Judith Fillaux