



Collège de Maladies Infectieuses
Microbiologie, Parasitologie-Mycologie



Université de Tunis El Manar
Faculté de Médecine de Tunis

Diagnostic Biologique de la Toxoplasmose chez les PVVIH

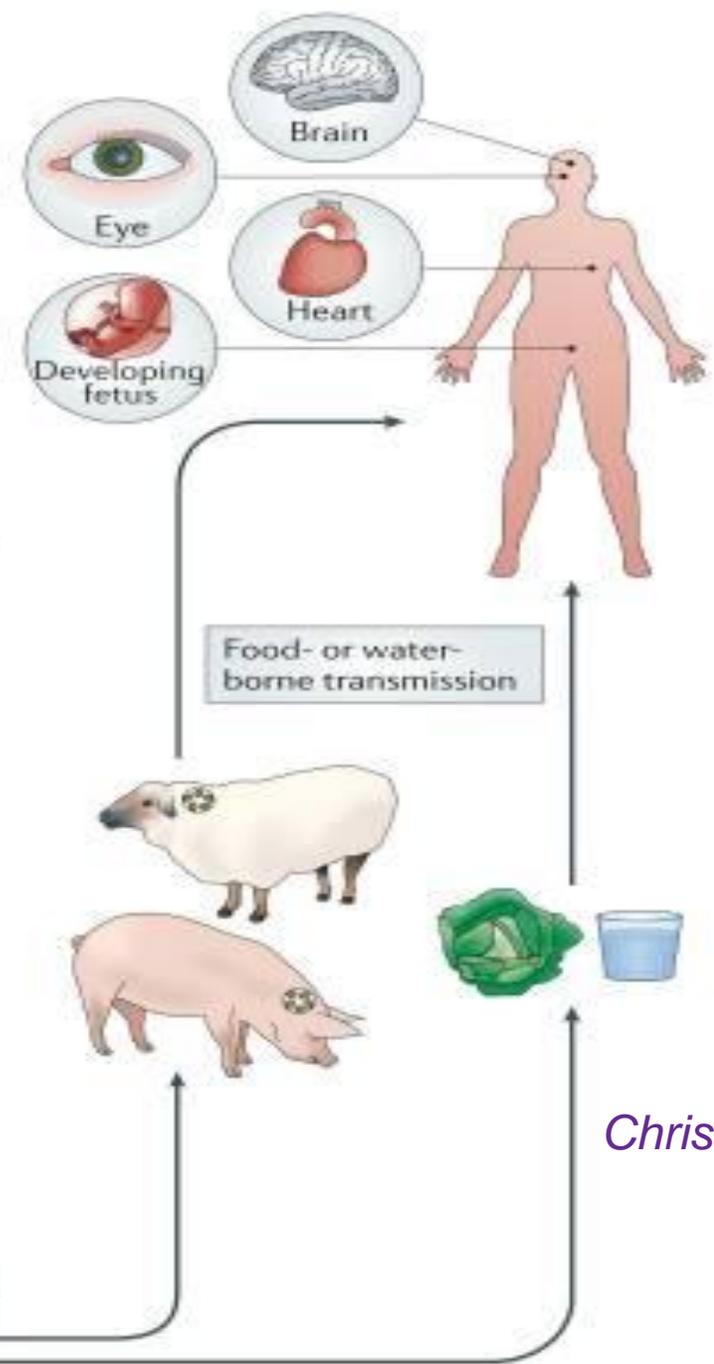
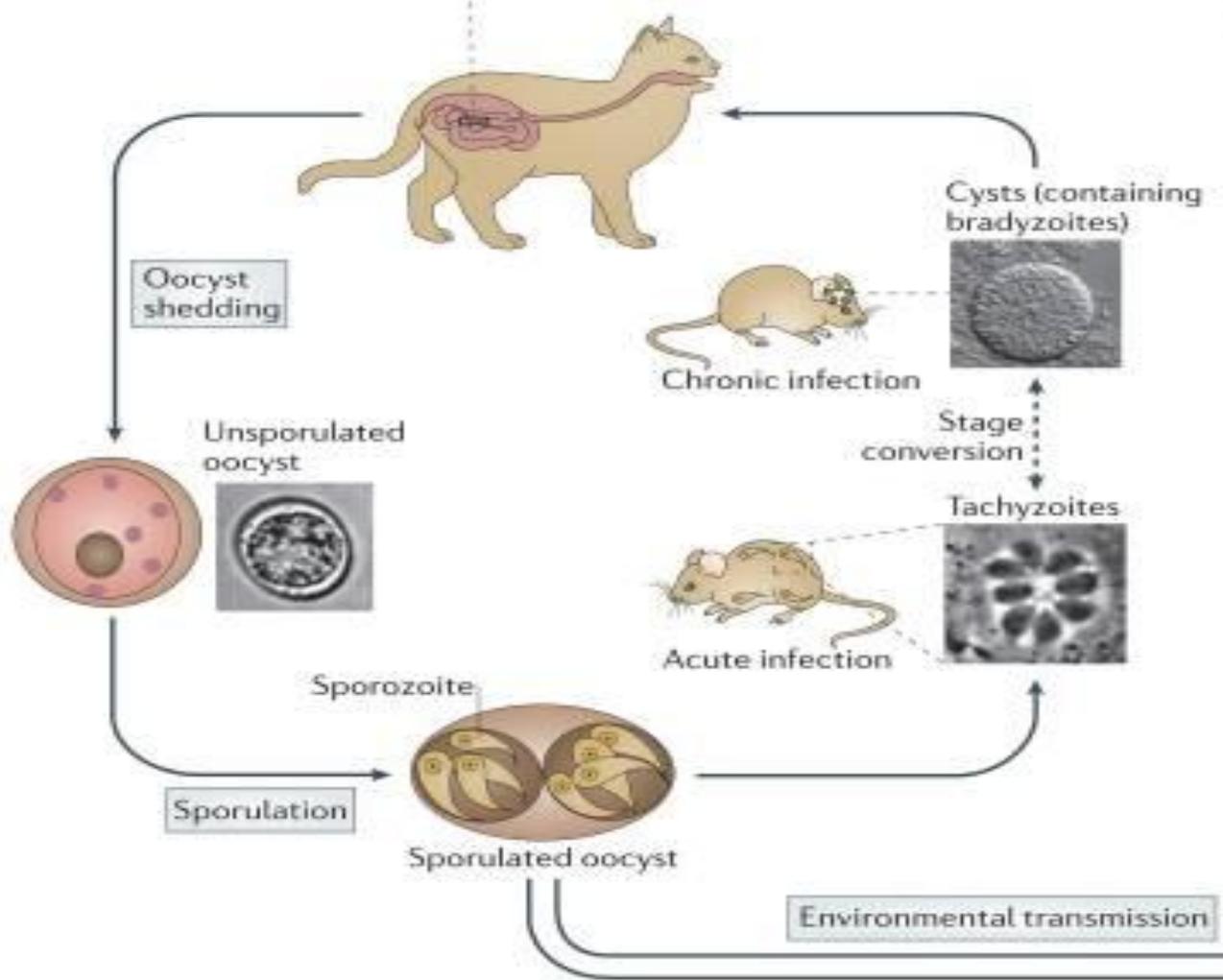
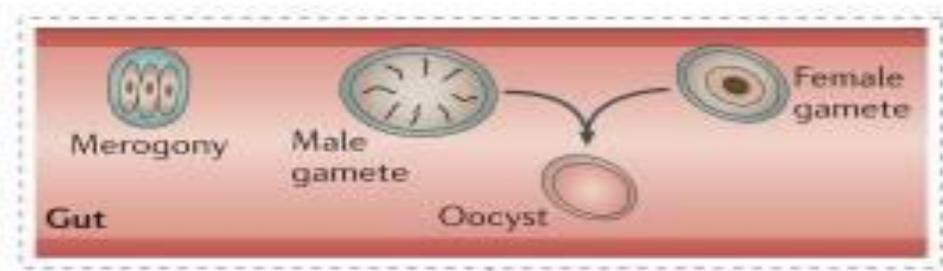
Aicha Kallel Elloumi

Laboratoire de Parasitologie

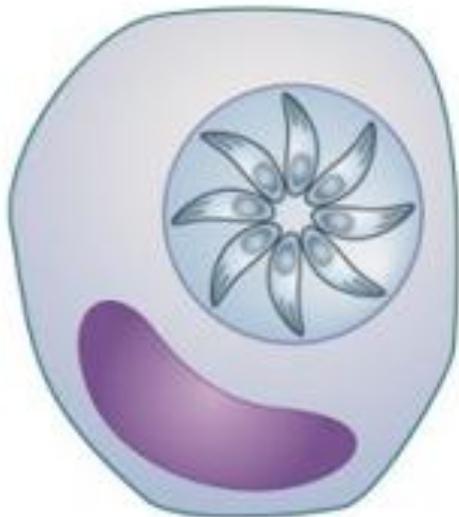
Hôpital La Rabta

Introduction

- Infection opportuniste fréquente du sujet infecté par le VIH
- Elle résulte :
 - Dans **95%** des cas, de la **réactivation** d'une infection ancienne latente.
 - Dans 5% des cas d'une **primo-infection** toxoplasmique



Christopher A et al, 2012



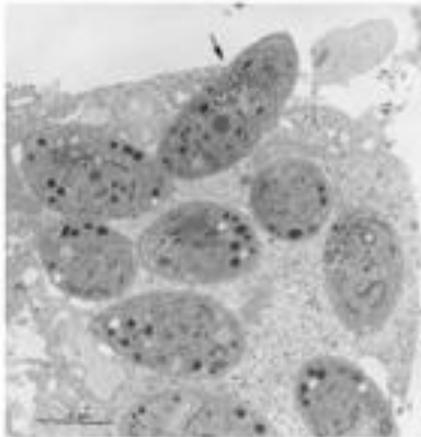
Tachyzoites



Brain



Eye



Infection active



Pression immunitaire

TNF- α , IFN- γ (Th1)

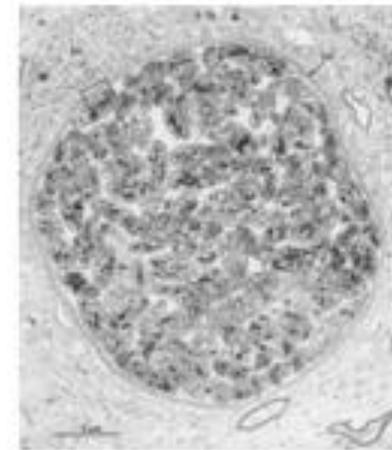


Bradyzoite cyst



Réactivation

Déficit immunitaire cellulaire



Infection latente

Détermination initiale (et suivi) du statut sérologique pour la toxoplasmose

- Intégré au bilan initial de synthèse du patient faisant suite à la découverte d'une séropositivité pour le VIH
- Sérologie IgG et IgM



Détermination initiale (et suivi) du statut sérologique pour la toxoplasmose

- **Si la sérologie est positive :**

- Patient chroniquement infecté par le toxoplasme, porteur de kystes et susceptible de réactiver son infection en cas d'évolution vers un déficit immunitaire.
- CP spécifique si leur taux de $CD4 < 200/mm^3$

- **Si la sérologie est négative :**

- Conseils hygiéno-diététiques pour éviter une contamination par le parasite
- Contrôle sérologique annuel ou bi-annuel

Toxoplasmose cérébrale (TC)

- Cerveau : siège principal de cette réactivation (organe doté d'une faible immunité)
- PVVIH dont le compte des LT CD4 < 200 C/mm³ et n'ayant pas reçu de CP primaire, avec un risque majeur lorsque le compte des LT CD4 < 100 C/mm³

THÈSE

Présentée et soutenue par

DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 03/09/2017 à 14h

par

Elmad MEGHICHE

né(e) le 01/01/1984 à Tunis

TITRE	COMPLICATIONS FONDSQUES ET PARASITAIRES CHEZ LES PERSONNES VIVANT AVEC LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (1990-2017)
Mots-clés	VIH, complications opportunistes, toxoplasmose, cryptococcose, toxoplasmose , toxoplasmose , toxoplasmose

Toxoplasmose cérébrale

- Etude La Rabta sur 28 ans (1990-2017)

- 202 cas de TC/ 899 PVVIH

→ prévalence de la TC de **11,3%** (17% avant l'ère du cART → 9,5% après l'introduction du cART).

- LT CD4 < 100 C/mm³ chez 64 patients (86,5%)

entre 100 et 200 C/mm³ chez 8 patients (10,8%)

et > 200 C/mm³ chez 2 patients (2,7%).

Diagnostic de la Toxoplasmose cérébrale

Présomptif ++:

- Terrain : VIH+, CD4+ < 200 C/mm³, statut sérologique pour la toxoplasmose +, sans CP
- Fréquence de la toxoplasmose
- Clinique
- Imagerie cérébrale

Diagnostic de la Toxoplasmose cérébrale

Confirmation

- Réponse à un traitement anti-toxoplasmique (réponse favorable clinique et radiologique attendue dans les quatorze jours de traitement), en l'absence de diagnostic alternatif probable
- Mise en évidence du parasite sur biopsie cérébrale et/ou de son ADN sur LCS et/ou sang périphérique

Sérologie toxoplasmique (IgM et IgG)

- Peu de place dans le diagnostic
 - Les patients VIH ayant une TC (ou autre localisation) sont quasiment toujours séropositifs pour les IgG anti-*Toxoplasma*
- Une sérologie **négative** constitue un argument fort d'exclusion d'une réactivation toxoplasmique en cours (excellente VPN) **sauf en cas d'immunodépression très profonde.**

Sérologie toxoplasmique négative

- 5% des cas de TC confirmée chez des patients VIH présentant une sérologie toxoplasmique négative au moment du développement des symptômes (*Contini C,2011*)
- Rabta : 3,3%
- Perte de séropositivité consécutive à l'altération de l'immunité humorale

Sérologie toxoplasmique positive

- Elle n'apporte que rarement un argument décisif
- Contributive au diagnostic dans deux rares situations :
 - **Ascension significative du titre des IgG** chez un malade **bien suivi** en cas de réactivation (<30%)
 - Une **séroconversion** en cas de primo-infection (surtout IgG, IgM soient souvent absentes à la phase aiguë (< 6-12 % des cas))

Biologie moléculaire : PCR

- Grand apport dans le diagnostic de confirmation de la TC
- Sur des prélèvements moins invasifs que la biopsie
- Particulièrement adaptées aux patients infectés par le VIH vu que ces méthodes ne sont pas affectés par l'immunodépression (≠sérologie)
- Techniques rapides
- recherche de l'ADN du parasite par PCR
 - sur **LCS**, s'il n'y a pas de contre-indication à réaliser une ponction lombaire,
 - et/ou sur **sang périphérique**

Indications de la PCR

- Présentation clinique et/ou radiologique initiale source d'incertitude diagnostique (notamment en cas d'encéphalite diffuse)
- Absence de réponse clinique au traitement empirique antitoxoplasmique dans les 7-14 jours de traitement

→ **LCS et sang** permettent la recherche du toxoplasme et autres agents infectieux pouvant constituer des diagnostics différentiels (*Cryptococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Epstein-Barr Virus*, ...).

PCR dans le LCS

- Nécessite 0,5 mL LCS (0,2mL du culot)
- Acheminement à température ambiante dans la journée ; si acheminement différé, conserver à +4°C
- Sensibilité très variable :
 - moyenne de 50 %
 - entre 35 et 72 % en fonction des études
- Spécificité élevée : 96-100 %
 - une PCR positive dans le LCS confirme le diagnostic de TC

Performances de la PCR dans le sang périphérique

- Tube contenant EDTA (1mL)
 - Acheminement à température ambiante sinon conserver à 4°C
 - Sensibilité médiocre : moyenne de 30 % (16-80%)
 - Spécificité 100%
-
- La négativité d'une PCR dans le LCS et/ou le sang ne doit pas exclure le diagnostic de toxoplasmose cérébrale
 - L'extrait peut être utilisé pour la recherche d'autres agents infectieux



Molecular diagnosis of toxoplasmosis in

Table 2. Main studies evaluating the sensitivity of molecular techniques for the diagnosis of cerebral toxoplasmosis

Number of patients	Number of confirmed CT	Country	Samples (number)	PCR Target	PCR technique	Sensitivity n/N (%)	Specificity (%)	HIV status	Reference	Year
14	9	USA	CSF	B1	cnPCR + hyb	4/9 (44.5)	100	HIV+	[37]	1992
38	13	France	Blood (71)	P30	cnPCR + hyb	9/13 (69)	76.5	HIV+	[38]	1993
33	20	The Netherlands	CSF (49)	B1	cnPCR + hyb	13/20 (65)	100	HIV+	[39]	1993
82	35	Italy	CSF (82)	B1	Nested PCR	18/35 (51)	100	HIV+	[40]	1994
52	15	Germany	CSF (8) Blood (15)	B1	cnPCR + hyb	3/8 (37.5) 2/15 (13)	100	HIV+	[41]	1994
72	13	France	Blood (72) CSF (48)	18SrDNA	cnPCR + hyb	5/13 (38.5) 6/13 (46)	100 100	HIV+	[42]	1995
88	18	Italy	CSF	B1	Nested PCR	6/18 (33)	100	HIV+	[43]	1996
100	19	France	Blood (19)	B1 TGR1E	cnPCR + hyb	5/19 (26)	95	HIV+	[44]	1996
83	18	France	CSF (33) Blood (93)	B1 TGR1E	cnPCR + hyb	1/6 (17) 10/17 (59)	86 81	HIV+	[45]	1996
59	20	Germany	Blood (89)	B1 TGR1E	cnPCR + hyb	5/20 (25)	100	HIV+	[46]	1997
192	64	Brazil	Blood (192)	B1	cnPCR	51/64 (80)	98	HIV+	[47]	2005
51	16	Brazil	CSF	REP-529	qPCR	11/16 (69)	100	39 HIV+12 HIV-	[48]	2009
135	85	Brazil	CSF (120) Blood (120)	B1	qPCR	30/85 (35) 1/67 (1.5)	100 100	HIV+	[49]	2010
207	59	Cuba	CSF (207)	T1-T4 (B1) S1-AS1 (B1) B22-B23 (B1)	Nested PCR Nested PCR cnPCR	30/59 (51) 40/58 (69) 42/58 (72.5)	98 97 95	147 HIV+60 HIV-	[50]	2013
28	16	Japan	CSF (16)	18SrDNA B1	Nested PCR LAMP LAMP	8/16 (50) ND (lower) ND (lower)	100	HIV+	[51]	2013
13	13	Japan	CSF (13)	18SrDNA	Nested PCR	3/7 (43)	NA	HIV+	[52]	2014
79	27	Brazil	CSF (79)	B1	Nested PCR	15/27 (56)	100	78 HIV+1 HIV-	[53*]	2014

Sensibilité augmente si

- Amplification du gene REP-529 : Se de 69% [Nogui FL et al, 2009] >>
amplification du gene B1 : Se de 35% [Correia C et al, 2010]

Table 1. Gene targets used in molecular diagnosis of toxoplasmosis

Target	Number of repetitions	Main use	First description for each application (reference)
P30	Single	Diagnosis	1988 [7]
B1	30–35	Diagnosis	1989 [8]
rDNA	≈110	Diagnosis, genotyping	1991 [9], 1987 [12]
TGR1E	≈100	Diagnosis, genotyping	1992 [13], 1991 [10]
REP-529	200–300	Diagnosis	2000 [11]

Sensibilité augmente si

- Amplification du gene REP-529 : Se de 69% [Nogui FL et al, 2009] >>
amplification du gene B1 : Se de 35% [Correia C et al, 2010]
- qPCR > cnPCR si < 20 parasites/ml

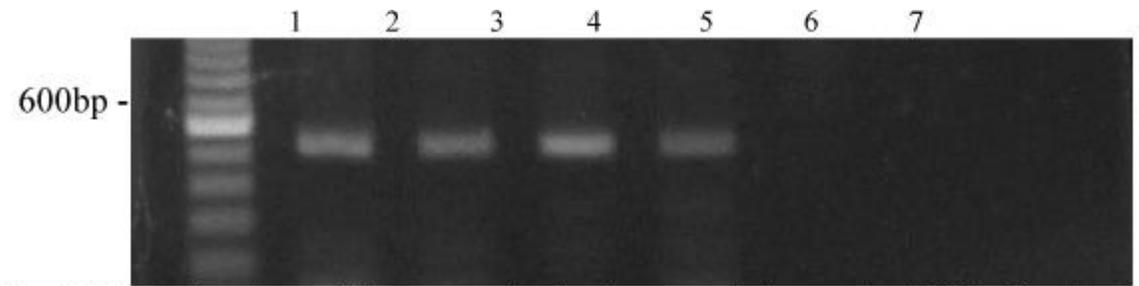
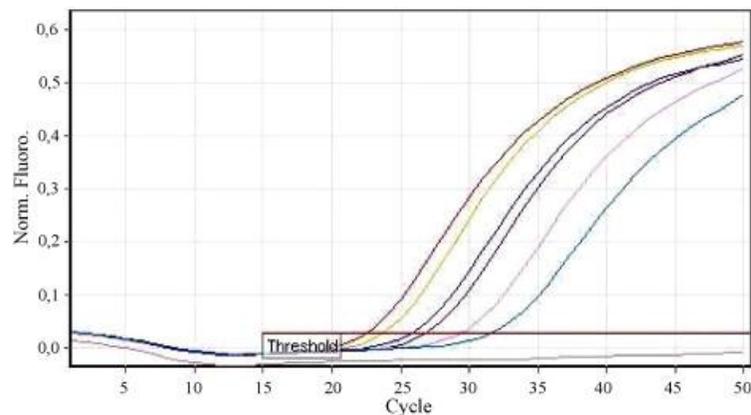


Fig. 1. Electrophoresis, on 1% agarose gel, of polymerase chain reaction (PCR) of tachyzoite dilutions showing sensitivity of 529bp PCR. Lanes 1 to 6 represent dilutions: 1.13×10^6 ; 1.13×10^5 ; 1.13×10^4 ; 1.13×10^3 ; 113; 11.3 of tachyzoites, respectively. Lane 7: negative control.

Sensibilité augmente si

- Amplification du gene REP-529 : Se de 69% [Nogui FL et al, 2009] >>
amplification du gene B1 : Se de 35% [Correia C et al, 2010]
- qPCR > cnPCR si < 20 parasites/ml
- Prélèvement précoce : les échantillons cliniques devraient être prélevés **avant ou jusqu'à trois jours maximum** après la mise en place du traitement [Pereira-Chioccola VL et al, 2009]

Sensibilité augmente si

- Amplification du gène REP-529
- qPCR > cnPCR si < 20 parasites/ml
- Prélèvement précoce
- Forme sévère, plusieurs lésions cérébrales, Forme disséminée [*Ajzenberg D, 2016*]
- Virulence des souches type I (Amérique du Sud) :

Etude brésilienne : sur 192 TC Se 80% Sp 98% [*Colombo FA, 2005*]

- Coupler LCS + sang

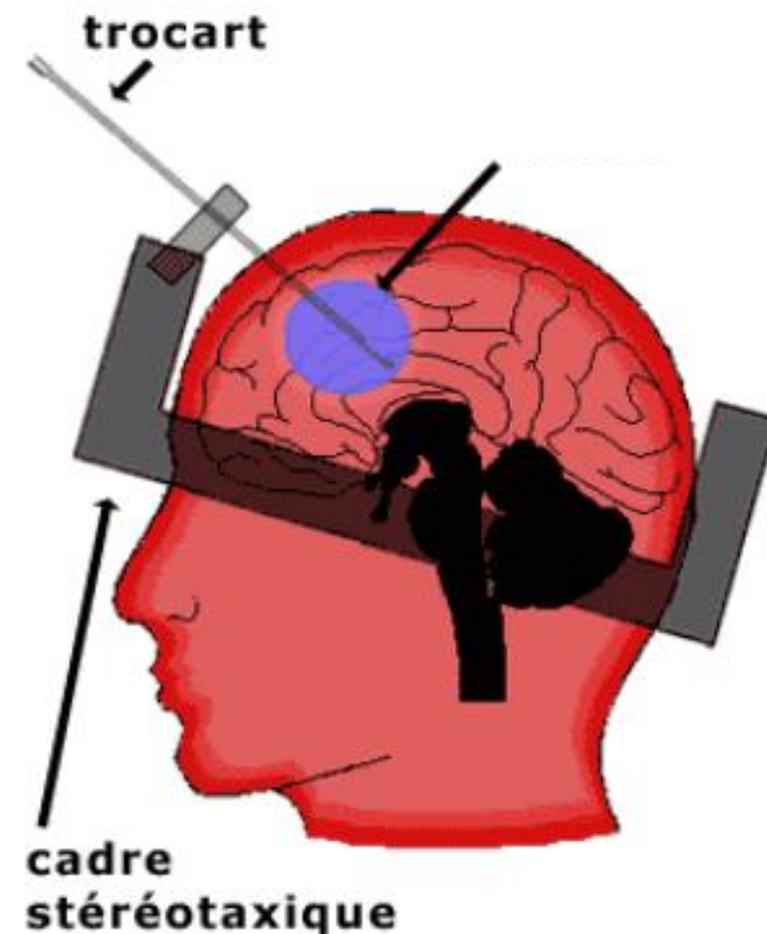
Recherche d'une synthèse locale d'anticorps dans le LCS par Immunoblot

profil comparatif LCS-Sérum

- Recherche de bandes supplémentaires dans le LCS/sérum
- Qlq essais mais non validés sur LCS
- Il existe peu de cas rapportés montrant l'intérêt de cette recherche pour le diagnostic de TC chez le patient VIH+ (ID++).
- Réserver l'utilisation du LCS, échantillon précieux disponible en faible quantité, à la PCR toxo et éventuellement d'autres micro-organismes opportunistes du sujet infecté par le VIH.

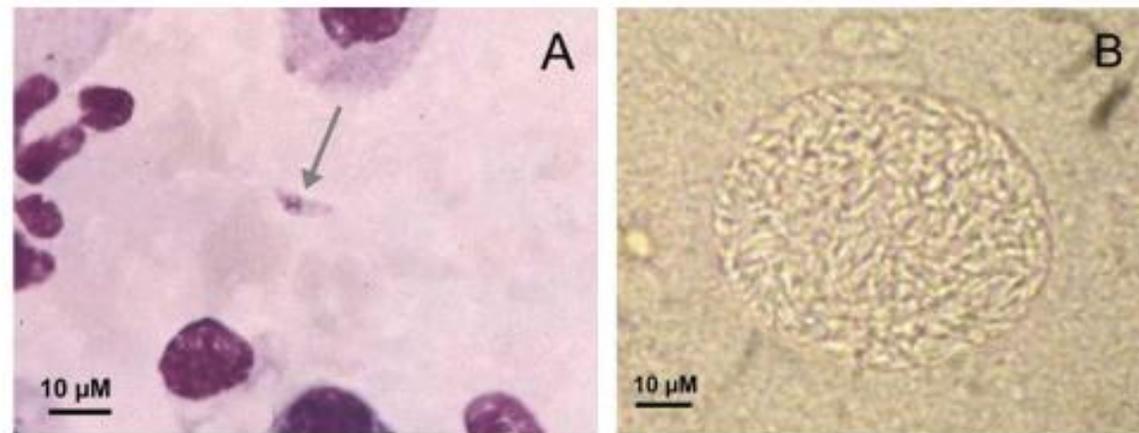
Diagnostic définitif : Biopsie cérébrale stéréotaxique

- Preuve définitive de l'encéphalite toxoplasmique
- Prélever, à la fois le centre et la périphérie de la lésion
- Plusieurs fragments pour la microbiologie (fragment non fixé), l'anatomopathologie et l'immunohistochimique



Diagnostic définitif : Biopsie cérébrale stéréotaxique

- Mise en évidence directe de la forme tachyzoïte et/ou kystique du parasite par:
 - Apposition de biopsie colorés au MGG
 - Examen anatomopathologique : immunohistochimie sur biopsie cérébrale (préférentiellement par technique d'immunopéroxydase)



(A) tachyzoïte [grossissement x500], (B) kyste cérébral [grossissement x500] *Adapté de Robert-Gangneux et Dardé, 2012*

Biopsie cérébrale stéréotaxique : indications

- Prélèvement invasif, n'est pas indiqué de 1^{ère} intention
- Indications :
 - patients en échec du traitement empirique d'encéphalite toxoplasmique : détérioration clinique ou radiologique pendant la 1^{ère} semaine de traitement **ou** absence d'amélioration clinique dans les 14 jours de traitement.
 - résultats d'imagerie, de sérologie ou de PCR suggèrent la possibilité d'une étiologie autre que la toxoplasmose :
 - présentation clinique ou radiologique atypique
 - Prophylaxie primaire bien suivie
 - taux de CD4 > 200/mm³
 - PCR négative

Biopsie cérébrale stéréotaxique

Méta-analyse (*Zhang et al, 2016*) :

19 études sur 820 patients(VIH +)

- Diagnostic fait dans **92.2%** (89.3%-94.5%),
- Morbidité (hémorragie+++): 5.1% (2.5%-8.3%)
- Mortalité : 0.7% (0-1.9%)

Sur le plan pratique

- Statut sérologique pour la toxoplasmose
- **PCR** sur LCS et ou sang périphérique +++
- Western blot LCS/Sérum : non validé
- Biopsie cérébrale : exceptionnellement pratiquée
- Ttt d'épreuve

Toxoplasmose oculaire (TO)

- Lésions de Chorioretinite (lésions focales blanches souvent associées à une réaction inflammatoire au niveau du vitré) ou atypiques
 - PVVIH avec Lc TCD4<200
- Prélèvements sanguin et oculaire pour confirmer le diagnostic

Prélèvement sanguin

- **Tube sec** : (au moins 1 mL), acheminement rapide sinon conserver à +4°C

Pendant 24h

- Sérologie (IgG et IgM) (20µL)
- Immunoblot IgG (10µL)



- **Tube EDTA** :

- PCR : 200µL pour l'extraction
- Peut être conservé +4°C



Sérologie toxoplasmique

- Positive : ne confirme pas
- Négative : n'excluant pas le diagnostic si forte suspicion clinique

Prélèvement oculaire

- Humeur aqueuse (HA)
- **Prélèvement de vitré** : plus dangereux, justifié que dans les cas atypiques sévères ou compliqués, ainsi que chez les patients qui ne répondent pas au traitement anti-toxoplasmique



Prélèvement oculaire

- Microtube/seringue stérile
- 2h à température ambiante
- 4°C
- Détection de l'ADN du toxoplasme par **PCR** (culot) : 50-100 μ L
- **Synthèse locale** intraoculaire d'Ig (surnageant) 25 μ L

⇒ Deux approches complémentaires

⇒ **PCR** >> immuno : Apport particulier chez l'immunodéprimé
dont la synthèse d'AC est perturbée
À privilégier si quantité faible



PCR



Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients

Florence Robert-Gangneux^{a,b} and Sorya Belaz^{a,b}

- Spécificité : 100%
- Sensibilité :
 - ID : 61.5-100% (charge parasitaire+)
 - IC : 25-53%
 - ID et IC : 21-100%
- **Un résultat négatif ne permet pas d'exclure une TO**

Sensibilité de la PCR meilleure si

- Quantité prélevée importante
- Première semaine après le début des symptômes (*De Groot-Mijnes JD, 2006*)
- Nombre de lésions > 3
- Vitré> HA> sang
- Combinaison des qPCR amplifiant les gènes B1 et REP-529 → Se : 61.5%, chez l'ID et 24% chez l'IC (*Bourdin C et al, 2014*).

Table 3. Main studies reporting the evaluation of molecular methods for the diagnosis of ocular toxoplasmosis in immunocompromised patients

Number of patients	Number of confirmed OT	Country	Samples	PCR target	PCR technique	Sensitivity n/N (%)	Specificity (%)	Immune background ^a	Reference
15	7	USA	VF	B1	cnPCR	7/7 (100) IC 3/3 (100)	100	OT: 3 IC, 4 non IC	[69]
67	43	France	AH	B1	cnPCR	9/43 (21) IC 8/9 (89)	100	All: 14 IC OT: 9 IC, 25 non IC	[64]
22	16	USA Argentina Puerto Rico	5 AH, 13 VF, 3 retinal biopsies	B1	qPCR	All: 7/16 (44) IC: 5/7 (71)	ND	All: 17 IC (6 HIV+), 5 non IC OT: 7 IC	[65]
56	11	The Netherlands	27 AH	B1	cnPCR	4/10 (40)	100	All: 56 IC (27 HIV+) OT: 11 IC (1 HIV+)	[66]
110	34	France	102 AH, 18 VF	B1 REP-529	qPCR qPCR	9/34 (26.5) 13/34 (38) IC: 4/13 (31)	100 100	OT: 4 HIV+; 30 non IC	[70]
54	40	France	51 AH, 3 VF	REP-529	qPCR	22/40 (55) IC : 8/11 (73)	100 93	OT: 11 IC (6 HIV+); 29 non IC	[66]
133	18	USA	105 AH + 38 VF	B1	qPCR	12/18 (67)	100	79 IC (61 HIV+), 54 non IC	[58]
132	61	France	133 AH, 7 VF	?	qPCR	15/55 (27) IC: 4/5 (80)	100 100	All: 16 IC OT: 5 IC	[63]
159	16	South Africa	150 AH + VF	B1	Nested PCR	11/16 (69)	100	All: 142 HIV+	[59 ^{**}]
405	114	France	Blood (200 µl) Blood (2 ml) 368 AH, 82 VF	B1 and REP-529	qPCR	ND/ND (4) ND/ND (25) ND/ND (36) IC: ND/ND (61.5)	99.6 89.5 100	All: 157 non HIV, 57 IC (31 HIV+) OT: 66 non IC, 18 IC (15HIV+)	[68 ^{***}]

AH, aqueous humor; cnPCR, conventional PCR; IC, immunocompromised; ND, not determined; OT, ocular toxoplasmosis; qPCR, quantitative real-time PCR; VF, vitreous fluid.

^aThe number of immunocompromised patients in the group of confirmed OT is given, and when available, the number of immunocompromised patients in the whole population study ('all').

Comparaison des profils ou charges immunitaires du couple sérum/HA

- Immunoblot IgG
- Coefficient de Witmer-Desmonts

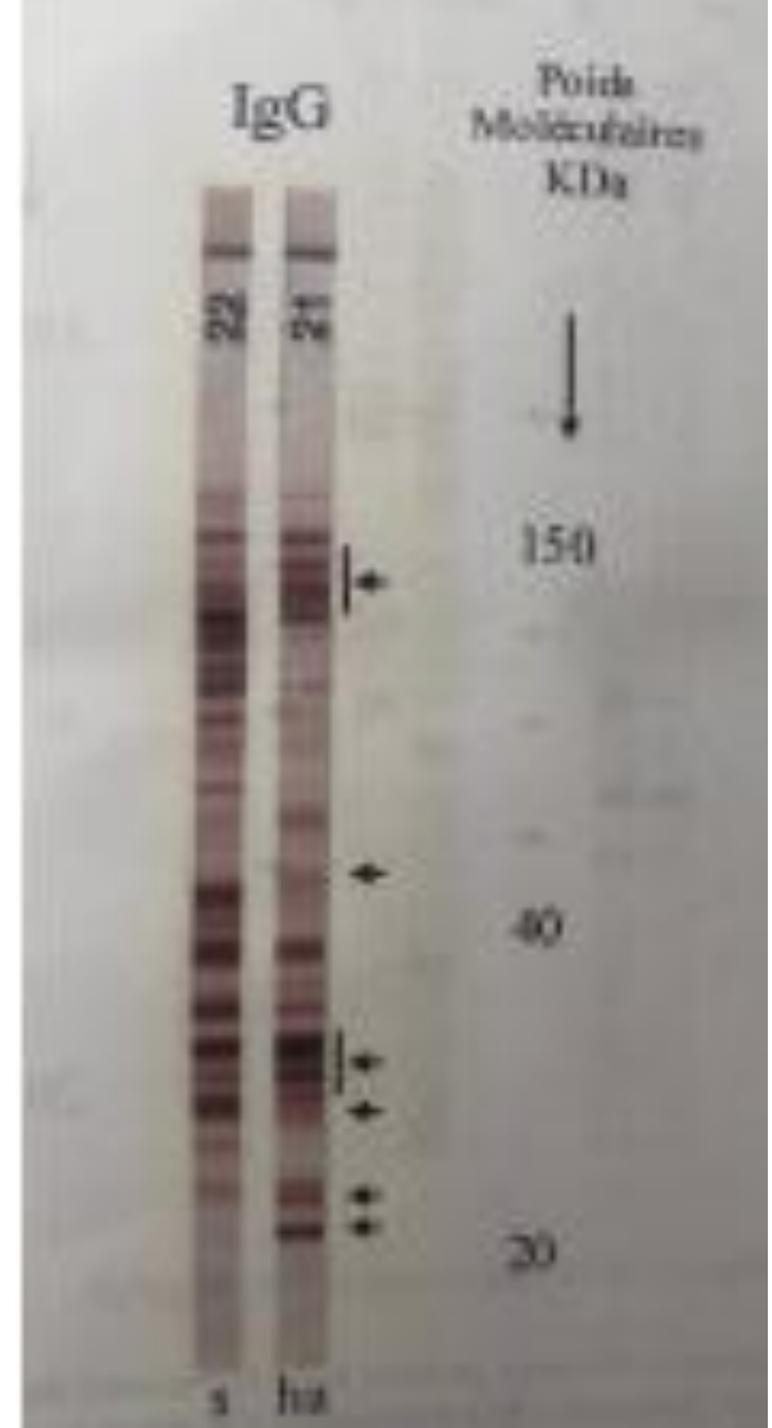
Immunoblot HA/sérum

- Détermination d'une synthèse locale d'anticorps basée sur la comparaison des profils immunologiques entre l'HA et le sérum
- bande(s) supplémentaire(s) au niveau de l'HA par rapport au sérum

Immunoblot

Sensibilité : 53%-98% (combiné à la PCR > 89%)

Villard O, 2003



Coefficient de Witmer-Desmonts (C)

- Rapport entre la charge immunitaire (CI) de l'HA et celle du sérum :
CI (HA) = IgG spécifiques de *T. gondii* de l'HA/IgG totaux de l'HA
CI (sérum) = IgG spécifiques de *T. gondii* du sérum/IgG totaux du sérum
- $C > 3$: synthèse locale d'IgG spécifiques → Toxoplasmose oculaire
- $2 < CCI < 3$: synthèse locale probable
- $CCI < 2$: pas de synthèse locale → n'élimine pas le diagnostic
- Sensibilité : 72%

Diagnostic de la TO

- Suspicion clinique d'une TO
- Sérologie toxoplasmique
- PCR sur HA +/- sang périphérique
- Profil comparé HA/sérum

Toxoplasmose disséminée

Observation directe du parasite sur frottis coloré au MGG de :

- LBA
- Sang périphérique
- Moelle osseuse
- Biopsie ...

Sensibilité faible 15-20 %

Nécessite un lecteur expérimenté

VPP : 100 %

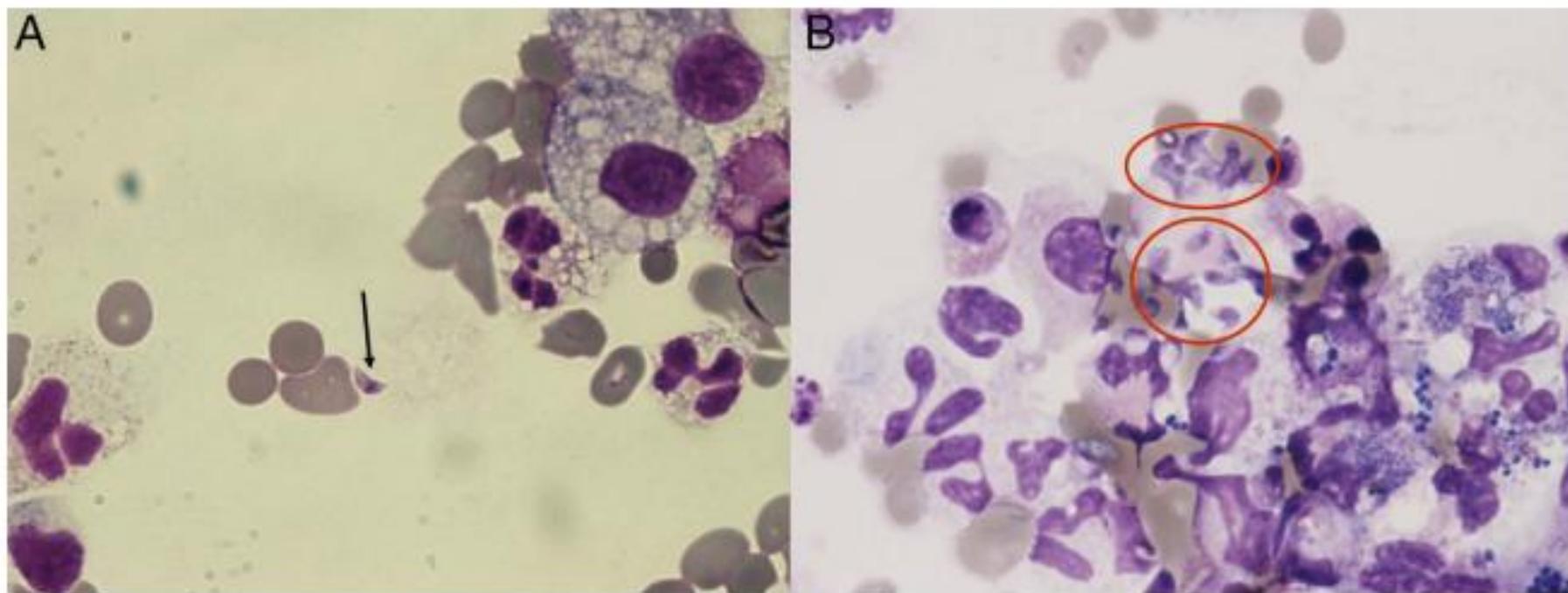


Figure 2 *Toxoplasma gondii* tachyzoites in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) (May-Grünwald Giemsa, MGG, magnification $\times 1000$). (A) One isolated extracellular tachyzoite (dark arrow) in the BALF of patient 1. Note the hook-like shape of the cytoplasm and the purple colour of the nucleus. The entire parasite is about $5\ \mu\text{m}$ long. (B) Numerous intracytoplasmic tachyzoites (encircled) multiplying in a mononuclear cell in the BALF of patient 2. Also note the presence of miscellaneous bacteria probably originating from the commensal oropharyngeal flora.

PCR sur Sang périphérique

- Sensibilité : 95-100 % toxoplasmose disséminée
- Spécificité : 100 %
- La mise en route du traitement spécifique entraîne une disparition des parasites dans les prélèvements en quelques jours

PCR sur prélèvement respiratoire

- La sensibilité de la PCR à partir de LBA se situe autour de 100%, spécificité 100% (*Bastien P, 2002*).
- Aucune donnée disponible concernant les expectorations induites, mais la détection d'ADN de toxoplasmes dans de simples crachats a été signalée (*Abraham B et al, 2000*)
- les deux types de prélèvements méritent une évaluation.

En conclusion

- Diagnostic de la toxoplasmose chez le PVVIH : arguments cliniques, radiologiques, biologiques et thérapeutiques.
- Sérologie : peu de place
- **Outils moléculaires +++**