

DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE CONGÉNITALE AU COURS DE LA GROSSESSE : RÉSULTATS DE L'ANALYSE PAR PCR DE 97 LIQUIDES AMNIOTIQUES

DIAGNOSIS OF CONGENITAL TOXOPLASMOSIS DURING PREGNANCY: RESULTS OF PCR ANALYSIS OF 97 AMNIOTIC FLUIDS

R. Ben Abdallah, E. Siala, O. Souissi,
N. Fakhfakh, R. Maatoug, K. Aoun,
A. Bouratbine

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Laboratoire de Recherche 05SP03.
Institut Pasteur de Tunis. Tunisie

Correspondance :

R. Ben Abdallah
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
Institut Pasteur de Tunis, 13 Place
Pasteur BP 74. 1002 Tunis. Tunisie
rym.benabdallah@pasteur.rns.tn

Résumé :

Le diagnostic précoce de la toxoplasmose congénitale (TC) est primordial afin d'éviter certaines complications graves. Nous rapportons et discutons dans ce travail l'apport de la PCR en temps réel sur le liquide amniotique dans la confirmation de la TC pendant la grossesse. Les données étudiées concernent 97 primo-infections toxoplasmiques péri ou pergravidiques colligées entre Septembre 2004 et Décembre 2009. L'infection en cours de grossesse a été retenue sur les critères sérologiques classiques actuellement utilisés. L'amplification génique a été faite par la technologie PCR TaqMan et a utilisé 2 jeux d'amorces ciblant le gène B1 et le gène cryptique «Rep 529 pb». Onze PCR positives ont été répertoriées parmi les 97 parturientes explorées (11,3%). Six de ces femmes ont subi une interruption thérapeutique de la grossesse malgré l'absence d'anomalies échographiques, 3 ont été perdues de vue et 2 ont mené leurs grossesses à terme. A la naissance, les explorations sérologiques chez les 67 nouveau-nés suivis (ELISA, ISAGA et western blot) étaient positives chez 6 bébés dont un correspondait à une PCR positive. Le 2ème bébé issu d'une grossesse avec PCR positive était négatif par tous les tests sérologiques pratiqués en raison probablement d'un traitement spécifique reçu in utero.

Mots clés : Toxoplasmose congénitale, diagnostic anténatal, PCR en temps réel

Abstract:

Early diagnosis of congenital toxoplasmosis (CT) is necessary to prevent serious complications. We report and discuss in this study the contribution of the real-time PCR in amniotic fluid in the confirmation of CT during pregnancy. Ninety seven primary toxoplasmic infections, perigravidic or pergravidic, were recruited between September 2004 and December 2009. The toxoplasmic infection in the course of pregnancy was retained on the basis of serological criteria. Genic amplification was performed by PCR TaqMan technology. It proved used 2 sets of primers targeting the B1 gene and the cryptic gene "Rep 529pb". Eleven PCR were positive among the 97 parturients (11.3%). Six of these women had a medical interruption of pregnancy in spite of the absence of echographic abnormalities. At birth, serological investigations of the 67 followed new-born (ELISA, ISAGA and western blot) were positive in 6 babies among whom one corresponded to a positive PCR. The 2nd baby resulting from a pregnancy with positive PCR was negative by all the tests practiced, probably because of a specific treatment received in utero.

Key words: Congenital toxoplasmosis, antenatal diagnosis, real-time PCR

INTRODUCTION

La toxoplasmose est une zoonose parasitaire cosmopolite due à un protozoaire Apicomplexa, *Toxoplasma (T.) gondii* [1]. Bien que généralement bénigne chez l'immunocompétent, sa survenue chez la femme enceinte peut se révéler grave à cause du risque de transmission au fœtus en développement [2]. L'infection du fœtus par le toxoplasme pouvant entraîner un avortement, une mort fœtale ou des complications postnatales [2]. Les manifestations de la toxoplasmose congénitale (TC) sont variables allant des atteintes neurologiques graves parfois mortelles, à des formes infra cliniques révélées à l'adolescence ou à l'âge adulte le plus souvent par une chorioretinite [1]. Par conséquent, une prise en charge rigoureuse est nécessaire devant toute suspicion de primo-infection pergravidique afin d'établir un diagnostic anténatal et/ou néonatal précoce [1, 2]. Le diagnostic anténatal repose actuellement sur la recherche de *T. gondii* au niveau du liquide amniotique (LA) par amplification génique au moyen de la technique PCR (Polymerase chain Reaction).

Nous rapportons et discutons dans ce travail l'apport de la PCR en temps réel dans la confirmation de la TC à partir des données d'une série de 97 primo-infections toxoplasmiques péri ou pergravidiques colligées au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Tunis.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Population étudiée

Il s'agit de 97 femmes enceintes suivies au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Tunis, entre Septembre 2004 et Décembre 2009, pour une séroconversion toxoplasmique péri ou pergravidique confirmée ou fortement suspectée. L'âge moyen des patientes était de 28 ans avec des extrêmes de 19 à 41 ans. Il est à préciser que durant la période de l'étude, un total de 2597 femmes enceintes ont été suivies dans notre laboratoire dans le cadre du dépistage de primo-infection toxoplasmique.

2. Critères sérologiques de sélection des cas

L'infection toxoplasmique au cours de la grossesse a été retenue chez nos patientes soit devant une séroconversion documentée sur deux prélèvements successifs (9 cas), ou devant la présence d'immunoglobulines (Ig) M spécifiques associées à une faible avidité des IgG (<0,5) sur une première sérologie (88 cas). Les dates présumées de la contamination par rapport à l'âge de la grossesse sont rapportées dans le tableau I.

Tableau I : Répartition des parturientes selon la date présumée de l'infection toxoplasmique
Table I : Distribution of pregnant women according to the presumed date of infection with toxoplasma

Date présumée de la contamination	Nombre de Séroconversion	
	cas	vraie
Péri-conceptionnelle	29 (29.8%)	
1 ^{er} trimestre	37 (38.1%)	2
2 ^{ème} trimestre	12 (12.3%)	6
1 ^{er} ou 2 ^{ème} trimestre	11 (11.3%)	
3 ^{ème} trimestre	2 (2%)	1
Anté-conceptionnelle	6 (6.1%)	
total	97 (100%)	9 (9.2%)

Elles ont été estimées sur les données sérologiques de la mère pendant la grossesse par les techniques suivantes :

- La recherche des IgG antitoxoplasmiques par le kit Enzyme-linked-immuno-sorbent assay (ELISA), « Platelia Toxo IgG, Biorad, France »
- La recherche des IgM antitoxoplasmiques par le kit ELISA « Platelia Toxo IgM, Biorad, France ».
- la mesure de l'avidité des IgG par le kit «Platelia Toxo IgG avidity, Biorad, France».

3. Amniocentèses

Les 97 amniocentèses de la série ont été pratiquées par les gynécologues qui ont pris en charge les parturientes. L'âge moyen de la grossesse au moment de l'amniocentèse était de 21 semaines d'aménorrhée (SA) avec des extrêmes allant de 13 à 35 SA. Dix à 20 ml de LA, prélevés sous contrôle échographique, ont été recueillis dans un tube stérile et adressés à notre laboratoire, dans un emballage isotherme, dans les heures qui ont suivi l'amniocentèse.

L'échographie prénatale, pratiquée dans tous les cas, s'est toujours révélée sans particularités. Soixante cinq des 97 femmes ont été mises sous Spiramycine, 5 n'ont eu aucune prescription et pour les 27 femmes restantes la notion de prise de traitement n'a pas été précisée.

4. PCR

C'est une PCR en temps réel au moyen de la technologie TaqMan qui a été pratiquée dans cette étude. Elle a recherché l'ADN de *T. gondii* dans l'extrait d'un culot cellulaire obtenu après centrifugation de 5 ml de LA. L'extraction s'est faite selon les recommandations du Kit commercial « QIAamp® DNA BLOOD MINI KIT QIAGEN, France ». L'amplification a utilisé deux jeux d'amorces ciblant le gène B1 répété 35 fois amplifiant une séquence de 71 pb et le gène cryptique « Rep 529pb » répété 350 fois (séquence de 404 pb) [3, 4], et deux sondes TaqMan (TGRRep, TGB1) doubles marquées FAM-TAMRA [3, 4]. Une gamme d'étalonnage externe à partir d'extrait de culture de souche toxo RH avec 3 points de dilutions dont le nombre de parasite est connu, un contrôle négatif d'extraction (Qiagen), un contrôle négatif du mélange réactionnel (eau + mélange réactionnel) et un témoin d'inhibition (patient + ADN positif) ont été également traités lors des réactions. L'amplification génique a été faite avec un appareil ABI Prism® 7700 (Applied BioSystems, USA).

5. Suivi des nouveau-nés

Soixante sept des nouveau-nés issus des 97 grossesses de l'étude ont été suivis après la naissance. Les données disponibles concernent les examens suivants : la recherche d'IgG et d'IgM par la technique ELISA, d'IgM par la technique Immuno-sorbent-agglutination-assay (ISAGA) (Biomérieux, France) et une étude des profils comparés des IgG et des IgM par western blot (LDBIO Diagnostics, France) entre le sérum de la mère et celui du nouveau-né (sang du cordon). En l'absence de critères sérologiques d'atteinte fœtale, d'autres contrôles sérologiques ont été également pratiqués à j12, j30, j60 et j90, par ELISA, ISAGA et western blot (profil comparé entre les différents sérums du nouveau-né) et par ELISA jusqu'à la négativation des IgG maternels. Certains nouveau-nés ont également bénéficié d'échographies trans-fontanelle et de fond d'œil (FO).

RESULTATS

1. PCR

La recherche de l'ADN de *T. gondii* par PCR s'est révélée positive sur 11 échantillons de liquides amniotiques (11,3% des cas). Neuf des 11 cas positifs correspondaient à des contaminations précoces, à savoir 5 contaminations péri-conceptionnelles et 4 du 1er trimestre. Les deux dernières contaminations datent du 1er ou du 2ème trimestre et du 2ème trimestre (Tableau I).

2. Devenir des grossesses

Parmi les 97 grossesses de l'étude, 67 (soit 69% des cas) ont été menées à terme. Dix huit femmes ont été perdues de vue après l'amniocentèse, 6 femmes ont eu des interruptions thérapeutiques de leurs grossesses (ITG) suite à la positivité de la PCR et une femme a avorté d'un mort né au 8ème mois de grossesse. Cinq grossesses de la série sont encore en cours (Tableau II).

Tableau II : Evolution de la grossesse des 97 parturientes suivies
Table II : Evolution of the pregnancy of the 97 parturients followed

Perdue de vue	18
ITG*	6
Enfants indemnes	50
TC	16
Grossesses en cours	5
NN** en cours de suivi	4
Autres***	16

* interruption thérapeutique de la grossesse, ** nouveau-né
 ***un mort né in utero, un NN qui est décédé à l'âge de 5 mois (par méningite) avant de terminer ses bilans biologiques, 5 NN qui n'ont pas été suivis

Au total, parmi les 11 femmes ayant eu une PCR positive, 6 ont subi une ITG, 3 ont été perdues de vue et deux ont pu être correctement suivies (Tableau II).

Tableau III : Récapitulatif des 11 observations avec PCR positives
Table III : Summary of 11 cases with positive PCR

	Age mère	IgG	IgM	IA	Date contamination	SPI	AMN	PMT-SFD	SFDsuivi
1	30				péri	NON	18		ITG
2	25				péri	OUI	34		ITG
3	30	67	+	0,14	T2	OUI	33		PDV
4	41	560	+	0,44	T1-T2	OUI	30		WB+
5	37	22	+	0,50	péri	OUI	20		PDV
6	21				T1	NON	23		ITG
7	27	238	+	0,42	peri	OUI	25		ITG
8	38	240	+	0,16	péri	OUI	17	OUI	WB-
9	41	187	+	0,3	T1	OUI	27		ITG
10	27	230	+	0,45	T1	OUI	22		ITG
11	32	890	+	0,26	T1	OUI	21		PDV

SPI : Spiramycine, AMN : date de l'amniocentèse en SA, PMT-SFD : traitement par pyriméthamine-sulfadiazine, WB : Western Blot, Péri : péri-conceptionnelle, PDV : perdue de vue, ITG : interruption thérapeutique de la grossesse, IgG : titre d'IgG en ELISA, IA : indice d'avidité des IgG.

3. Suivi post natal

A la naissance, la TC a été confirmée par la sérologie chez 6 nouveau-nés des 67 ayant bénéficié des examens nécessaires. Parmi les 2 nouveau-nés issus de grossesses avec une PCR positive, la TC a été confirmée pour l'un alors que le 2ème avait une sérologie négative probablement décuplée par un traitement curatif à base de pyriméthamine-sulfadiazine associé à l'acide folinique reçu au cours de la grossesse. L'échographie transfontanellaire et le FO étaient normaux pour les 2 bébés.

Par ailleurs, 5 nouveau-nés dont le diagnostic anténatal était négatif, se sont révélés positifs en western blot. La date de la positivité du western blot était variable : 2 cas à la naissance et 3 cas à j12. Deux d'entre eux ont présenté une chorioretinite lors de leur suivi, un correspondait à une contamination péri-conceptionnelle et l'autre à une contamination du 2ème trimestre.

DISCUSSION

Parmi 2597 grossesses suivies de 2004 à 2009 au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IPT, 97 (3,7%) cas confirmés de primo-infections toxoplasmiques en cours de grossesse ont été recensés et ont fait l'objet de cette étude. Les données nationales concernant l'incidence de la TC sont rares [5]. En effet, le dépistage systématique n'est pas encore de pratique courante dans notre pays ; les examens sérologiques n'étant pas obligatoires et leur réalisation est souvent tardive. Le dépistage de la maladie à la naissance n'est pas non plus systématique.

Le diagnostic anténatal de la TC a reposé pendant longtemps sur l'étude du sang fœtal (parasitologie, sérologie) ; cette pratique est aujourd'hui abandonnée du fait de son manque de sensibilité et du risque non négligeable de fausses couches suite à la cordocentèse [6]. La détection de l'ADN de *T. gondii* par PCR a constitué depuis la fin des années 90 la technique de référence pour le diagnostic anténatal de la TC et a largement amélioré la prise en charge de patientes concernées [7, 8, 9]. Elle réalise un diagnostic performant de la TC permettant la mise précoce sous traitement curatif des cas positifs réduisant sensiblement la sévérité de l'infection toxoplasmique [7]. L'amniocentèse doit être pratiquée à partir de 18 SA et au moins 4 semaines après la date présumée de l'infection maternelle [10]. Ces conditions ont été respectées dans la presque totalité de nos cas (96 cas).

Onze PCR positives ont été répertoriées parmi les 97 parturientes explorées confirmant le diagnostic de la TC (11,3%). La spécificité de la PCR en temps réel est en effet très bonne, elle avoisine le plus souvent les 100% [9, 11]. Cette excellente spécificité est liée d'une part au fait que cette variante de PCR se fait à tubes fermés ce qui réduit nettement le risque de contaminations et d'autre part à l'utilisation d'une sonde hautement spécifique [11]. Parmi les 11 femmes avec PCR positives, 6 ont subi une interruption thérapeutique de la grossesse malgré l'absence d'anomalies échographiques, 3 ont été perdues de vue et 2 ont mené leurs grossesses à terme. Il est à préciser que l'ITG ne doit être proposée qu'en cas de lésions organiques détectées lors de la surveillance échographique [12].

A la naissance, les explorations sérologiques étaient positives chez 6 des bébés suivis, dont un correspondait à une PCR positive. Le 2ème bébé issu d'une grossesse avec PCR positive était négatif par tous les tests sérologiques pratiqués (Tableau III). En effet, sa mère a reçu un traitement curatif à base de pyriméthamine-sulfadiazine ce qui a fort probablement

décapité sa réponse en anticorps spécifiques [13]. Cinq nouveau-nés dont le diagnostic anténatal était négatif, se sont révélés positifs en western blot. Ceci confirme qu'une PCR négative n'élimine pas le diagnostic de TC et qu'il faut impérativement contrôler et suivre les bébés concernés à la naissance [13, 14]. Cette négativité pourrait s'expliquer par un passage transplacentaire du parasite retardé, postérieur à l'amniocentèse ou par une faible charge parasitaire transmise [2, 10]. En effet, les différentes séries rapportent une sensibilité de la PCR en temps réel qui n'excède pas les 70 à 80% [9, 10, 11].

CONCLUSION

La PCR, particulièrement sa variante en temps réel, a considérablement amélioré les performances du diagnostic anténatal de la TC par sa grande sensibilité et spécificité. En cas de négativité ou de non réalisation, le suivi (sérologie et radiologie) néo et post natal permet de compléter l'investigation et d'affirmer ou d'infirmer une TC. Dans tous les cas, la meilleure prévention reste le dépistage sérologique précoce qui permet de détecter les parturientes à risque (femmes séronégatives) et de les informer quant aux mesures prophylactiques à prendre tout en leur assurant un suivi sérologique mensuel.

Remerciements et financement :

Les auteurs remercient pour leur précieuse collaboration les gynécologues en charge des parturientes de la série et les pédiatres en charge des nouveau-nés suivis.

Ce travail a bénéficié du support du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et Technique par le biais du financement du laboratoire de recherche LR 05-SP03 « Parasitoses médicales à transmission orale ».

Références

1. Fortier B, Ajana F. Toxoplasme et toxoplasmoses. Editions Techniques. Encycl Med Chir (Paris-France), Maladies infectieuses, 8-509-A-10, Pédiatrie, 1993; 10 : 4-330.

2. Jacquemard F. Syndrome infectieux fœtal. In : Encycl Med Chir (Paris-France), Pédiatrie 2004 ; 296-323.

3. Burg JL., Grover CM., Pouletty P., Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by PCR. J Clin Microbiol 1989 ; 27 : 1787-92.

4. Reischl U., Bretagne S., Krüger D. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infect Dis 2003 ; 3 : 7.

5. Trabelsi L. La toxoplasmose acquise et congénitale : aspects épidémiologiques, cliniques et sérologiques. Thèse de Médecine. Faculté de Médecine, Sfax (Tunisie), 1999, N°1840.

6. Ambroise-Thomas. Toxoplasmose congénitale : les différentes stratégies préventives. Arch Pédiatr 2003 ; 10 : 12-4.

7. Kieffer F., Thulliez P., Kassis M., Rigourd V., Magny JF. Traitement anténatal de la toxoplasmose congénitale. Arch Pédiatr 2009 ; 16 : 885-7.

8. Siala E., Ben Abdallah R., Delabesse E., Aoun K., Paris L et Bouratbine A. Apport de la PCR en temps réel dans le diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale. Tunisie Méd 2007 ; 85 : 385-8.

9. Maubon D., Brenier-Pinchart MP., Fricker-Hidalgo H., Pelloux H. Apport de la PCR quantitative dans le diagnostic de la toxoplasmose : la voie de la standardisation? Pathol Biol 2007 ; 55 : 304-11.

10. Thulliez PH. Toxoplasmose et grossesse. Med Mal Infect 19993 ; 23 : 170-5.

11. Kasper DC., Sadeghi K., Prusa AR., Reischer GH., Kratochwill K., Förster-Waldl E., Gerstl N., Hayde M., Pollak A., Herkner KR. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. Diag Microbiol Infect Dis 2009 ; 63 : 10-15.

12. Khairi H., Fekih M. Prise en charge d'une séroconversion toxoplasmique au cours de la grossesse. Rev Tun Infectiol, 2008 ; 2 : 1-4.

13. Bessières MH., Berrebi A., Cassaing S., et al.. Diagnosis of congenital toxoplasmosis : prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009 ; 104 (2) : 389-392.

14. Bessières MH., Berrebi A., Rolland M., Bloom MC., Roques C., Cassaing S., Courjault C., Séguéla JP. Neonatal screening for CT in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the result of neonatal tests. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001 ; 94 : 37-45.



**Journées Franco-Tunisiennes
de Parasitologies**

**Protistes d'intérêt médical et vétérinaire :
de la dispersion environnementale à la prise en charge
clinique**

Les 11 et 12 novembre 2010
à l'Institut Pasteur de Tunis