

# Place des méthodes biologiques dans le diagnostic néonatal de la toxoplasmose congénitale en Tunisie

## Contribution of biological methods in the neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in Tunisia

Rym Ben-Abdallah<sup>1,2</sup>, Ines Bouhaoula<sup>1,2</sup>, Olfa Souissi<sup>1</sup>, Rania Maatoug<sup>1</sup>, Karim Aoun<sup>1,2</sup>, Aida Bouratbine<sup>1,2</sup>

1. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut Pasteur de Tunis, Place Pasteur, BP75, 1002 Tunis, Tunisie

2. Laboratoire de recherche de Parasitologie Médicale, Biotechnologie et Biomolécules (LR 16-IPT-06), Institut Pasteur de Tunis, Université Tunis El Manar, Place Pasteur, BP75, 1002 Tunis, Tunisie

### RÉSUMÉ

**Introduction:** A la naissance, le diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale (TC) est essentiellement sérologique.

**Objectif:** Rapporter les résultats des techniques biologiques utilisées dans le diagnostic néonatal de la TC.

**Méthodes:** Il s'agissait d'une étude descriptive incluant les nouveau-nés (NN) suspects de TC adressés au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Tunis durant 17 ans. Les NN dont les mères ont présenté une infection toxoplasmique au cours de la grossesse et pour lesquelles, un diagnostic anténatal était soit négatif soit non réalisé, ont été colligés. La recherche des anticorps IgG et IgM a été faite par les techniques ELISA et western blot.

**Résultats:** Parmi les 224 NN inclus, le premier prélèvement a été effectué entre J1 et J3 de vie dans 58% des cas. Pour 181 NN de notre série, la disparition des IgG a été observée en moyenne à l'âge de 4,8 mois  $\pm$  1,6. Les IgM étaient positives au-delà de J10 de vie dans 11 cas. Un western blot comparatif mère-NN a été réalisé pour 216 NN (96,4%). Le diagnostic de TC a été retenu chez 43 NN (19,2%), soit devant un western blot positif dans 30 cas (69,8%), soit devant la présence d'IgM par ELISA au-delà de J10 de vie dans 11 cas (25,6%), soit devant le non-infléchissement des IgG au bout de 12 mois de suivi dans deux cas (4,6%).

**Conclusion:** Notre travail confirme l'apport indéniable du western blot comparatif dans le diagnostic de la TC à la naissance.

**Mots clés:** *Toxoplasma gondii*, Toxoplasmose congénitale, Nouveau-né, Sérologie, western blot, Tunisie

### ABSTRACT

**Introduction:** At birth, the biological diagnosis of congenital toxoplasmosis (CT) is essentially serological.

**Aim:** To report the results of biological techniques used in the neonatal diagnosis of CT.

**Methods:** This was a descriptive study including newborns (NB) suspected of having CT who were referred to the Parasitology-Mycology laboratory of the Institut Pasteur of Tunis over a 17-year period. Newborns whose mothers had toxoplasmic infection during pregnancy, with either a negative or unperformed antenatal diagnosis, were included. The search for IgG and IgM antibodies was conducted using ELISA and western blot techniques.

**Results:** Among the 224 newborns included, the first sample was taken between days 1 and 3 of life in 58% of cases. In 181 newborns from our series, the disappearance of IgG was observed at an average age of 4.8  $\pm$  1.6 months. IgM was positive after day 10 of life in 11 cases. A comparative mother-newborn western blot was performed for 216 newborns (96.4%). The diagnosis of CT was confirmed in 43 newborns (19.2%): either based on a positive western blot in 30 cases (69.8%), the presence of IgM by ELISA after day 10 of life in 11 cases (25.6%), or the persistence of IgG after 12 months of follow-up in two cases (4.6%).

**Conclusion:** Our study confirms the undeniable contribution of the comparative western blot in the diagnosis of CT at birth.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, Congenital toxoplasmosis, Newborn, Serology, western blot, Tunisia

### Correspondance

Rym Ben-Abdallah

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut Pasteur de Tunis, Place Pasteur, BP75, 1002 Tunis, Tunisie

Email: Rym.benabdallah@fmt.utm.tn

## INTRODUCTION

La toxoplasmose, causée par le protozoaire *Toxoplasma gondii* (1), peut être transmise de la mère à l'enfant durant la grossesse, représentant un risque significatif pour le développement fœtal (2). Le diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale (TC) est donc d'une importance cruciale en néonatalogie et en pédiatrie. En effet, la présentation clinique n'étant pas spécifique (3), c'est le diagnostic biologique qui permet de confirmer précocement l'infection et d'initier rapidement un traitement approprié, afin de minimiser les conséquences potentielles sur la santé du nouveau-né (NN). En Tunisie, la survenue d'une TC n'est pas un événement rare ; en effet, son incidence varie de 0,39 à 4,8 pour 1000 grossesses selon les séries (4, 5). Ces dernières années, le diagnostic de la TC a considérablement évolué, avec une amélioration des performances des techniques immunologiques et le développement de la biologie moléculaire (6). Pendant la période prénatale, le diagnostic peut se faire par la recherche de l'ADN parasitaire par PCR (Polymerase Chain Reaction) au niveau du liquide amniotique recueilli par amniocentèse (7). Cependant, la sensibilité de cet examen n'étant pas absolue, les faux négatifs ne sont pas rares et une TC reste systématiquement recherchée à la naissance chez tout enfant né d'une mère ayant présenté une infection toxoplasmique au cours de sa grossesse et dont le diagnostic prénatal négatif ou non pratiqué (8, 9). A la naissance, le diagnostic de la TC repose principalement sur la sérologie (6, 10). Plusieurs techniques sont utilisées à savoir la technique immuno-enzymatique (ELISA=Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay), la technique de chimiluminescence ; et la technique de western blot (WB) en profil comparatif mère-NN puis en suivi NN-NN. Ces techniques varient en termes de sensibilité, de spécificité, de rapidité et de coût. Dans un contexte tunisien dépourvu d'un programme national de prévention et de prise en charge de la TC, nous nous proposons à travers cette étude de rapporter les résultats des techniques biologiques utilisées dans le diagnostic néonatal de la TC et de discuter leurs avantages respectifs ainsi que leurs limites, afin de proposer une démarche diagnostique pratique et adaptée au contexte de notre pays.

## MÉTHODES

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive réalisée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Institut Pasteur de Tunis durant 17 ans (Janvier 2005 – Décembre 2021).

Tous les NN dont les mères ont présenté une infection toxoplasmique au cours de la grossesse et pour lesquelles, un diagnostic anténatal (PCR sur liquide amniotique) était soit négatif soit non réalisé, ont été colligés. Les NN retenus pour l'analyse ont été ceux ayant complété leur suivi sérologique dans notre laboratoire. N'ont pas été inclus les NN dont le diagnostic de TC a été retenu en anténatal (PCR sur liquide amniotique positive) et ceux n'ayant pas complété leur suivi dans notre laboratoire.

A la naissance, la recherche des Immunoglobulines (Ig) G et IgM anti-toxoplasmiques a été faite systématiquement par les techniques ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) en utilisant les kits « Platelia Toxo IgG, IgM® Biorad, France » et western blot (WB) en utilisant le kit « Toxoplasma Western Blot IgG IgM® LDBIO diagnostics, France ». La technique WB a été utilisée pour comparer le sérum de la mère par rapport à celui du NN à la naissance puis en suivi entre les sérums du NN.

Des prélèvements de placentas de certaines femmes enceintes ont été également reçus en entier à notre laboratoire le jour de l'accouchement jusqu'à 2012. Une recherche de toxoplasme a été réalisée par inoculation à la souris jusqu'à 2009 avec un contrôle sérologique des souris à la recherche d'IgG par Immunofluorescence indirecte à 3 semaines et à 6 semaines. De 2010 à 2012, une PCR en temps réel par la technologie Taqman a remplacé l'inoculation à la souris. L'extraction d'ADN a été réalisée par le kit « QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen) ». Deux jeux d'amorces ciblant le gène B1 et le gène cryptique « Rep 529pb » et deux sondes TaqMan (TGRep, TGB1) doubles marquées FAM/TAMRA ont été utilisés.

Tous les résultats des analyses biologiques collectés ont été saisis et analysés par le logiciel SPSS 23. L'étude a consisté en une analyse descriptive, puis pour certaines variables quantitatives, la description des moyennes et de leurs écarts-types.

## RÉSULTATS

Durant les 17 années de l'étude, sur les 557 NN adressés à notre laboratoire pour le diagnostic biologique de la TC, seuls 224 NN ont poursuivi leur suivi sérologique dans notre laboratoire. A la naissance, le prélèvement était le sang du cordon dans 10 cas (4,5%) et le sang veineux du NN dans 214 cas (95,5%). Dans plus de la moitié des cas (58%), le premier prélèvement des NN a été effectué durant les 3 premiers jours de vie. Pour le reste des NN, le premier prélèvement a été réalisé entre J4 et J10 de vie dans 20,5% et au-delà de J11 de vie dans 21,5% des cas. La recherche des IgG anti-toxoplasmiques par technique ELISA a été réalisée pour les 224 NN. Pour 181 NN de notre série, la disparition des IgG a été observée en moyenne à l'âge de 4,8 mois  $\pm$  1,6 avec des extrêmes allant de trois à dix mois. Pour 2 NN, le titre des IgG spécifiques est resté stable jusqu'à l'âge de 1 an.

La recherche des IgM anti-toxoplasmiques par technique ELISA a été réalisée également pour tous les NN. Les IgM étaient positives au-delà de J10 de vie dans 11 cas.

La technique du WB comparatif mère-NN a été réalisée pour 216 NN (soit 96,4%). Dans la majorité des cas (81%), ce test a été effectué sur des prélèvements entre J1 et J10 de vie. Le suivi par au moins un test WB en profil comparatif NN-NN a été réalisé pour 92 NN (41,1%). Le profil comparatif était positif dans 30 cas (28 à la naissance (lors de la réalisation du premier prélèvement) et 2 en suivi (J30)). La date de positivité du test WB était variable. Il était positif dans 65% des cas entre J1 et J10 de vie, dans 24% des cas entre J10 et J20 de vie et dans

11% des cas au-delà de J20 de vie.

Au total, le diagnostic de TC a été retenu chez 43 NN soit :

- Devant la présence des IgM anti-toxoplasmiques par ELISA au-delà de J10 de vie dans 11 cas soit 25,6 %
- Devant un WB comparatif positif dans 30 cas soit 69,8% (16 en IgM et IgG, 11 en IgM et 3 en IgG)
- Devant la stabilité du titre des IgG anti-toxoplasmiques au bout de 12 mois de suivi sérologique dans deux cas soit 4,6 %

Parmi les 17 placentas examinés, trois étaient positifs dont un par inoculation à la souris et deux par PCR en temps réel. Parmi ces 3 cas, 2 cas étaient classés comme des placentites isolées devant l'infléchissement des IgG jusqu'à leurs disparitions complètes. Le 3ème cas était retenu comme TC et avait également un WB comparatif positif.

## DISCUSSION

Le diagnostic néo et postnatal de la TC vise à détecter le plus précocement possible l'infection chez le NN dès les premiers jours de vie. Il est fondamental pour une prise en charge optimisée de cette grave affection. La confirmation de l'infection permet de mettre en place un traitement approprié, réduisant ainsi le risque de complications telles que les atteintes neurologiques, ou celles oculaires qui peuvent affecter le développement de l'enfant à long terme. Ce diagnostic repose principalement sur des tests sérologiques.

A la naissance, le prélèvement de choix est le sang du cordon ombilical en raison de sa facilité de réalisation et de son volume généralement suffisant (11). Cependant, le sang du cordon peut être contaminé par celui maternel durant l'accouchement, ce qui peut entraver la spécificité des tests sérologiques (12). Pour éviter ce problème, nous avons opté, depuis 2014, pour l'utilisation du sang veineux du NN. Le premier prélèvement doit être recommandé entre le premier et le troisième jour de vie (13) ce qui fut le cas dans 58% des premiers prélèvements de notre étude.

Dans le diagnostic néonatal de la TC, le dosage des IgG spécifiques par les techniques conventionnelles est essentiel pour suivre l'évolution des taux d'IgG. Ce suivi doit être maintenu jusqu'à la disparition totale des IgG. Dans notre étude, pour 181 NN de nos 224, la disparition des IgG est survenue en moyenne à l'âge de 4,8 mois  $\pm$  1,6 avec des extrêmes allant de trois à dix mois. Ces résultats rejoignent ceux d'autres études, qui indiquent que la disparition des IgG se situe généralement entre l'âge de quatre et cinq mois (14). L'absence de baisse des titres des anticorps, qu'il y ait stabilisation ou augmentation, suggère une infection congénitale (11). En effet, la diminution progressive des anticorps maternels dans ces situations est compensée par la production d'anticorps propres à l'enfant, ce qui confirme la présence d'une contamination (11). Dans notre étude, le non-infléchissement des IgG spécifiques à l'âge d'un an a été observé dans deux cas (4,6%) permettant de retenir le diagnostic de TC.

La demi-vie des IgM spécifiques étant très courte, leur

persistance, détectée par des méthodes conventionnelles, au-delà du dixième jour de vie est en faveur d'une infection congénitale (11). Le sang néonatal pouvant aussi être contaminé par du sang maternel dans environ 2 à 20% des cas en raison d'une possible effraction placentaire (13), il est indispensable de confirmer la positivité des IgM au-delà du 10ème jour. Parmi les 224 NN de notre série, les IgM étaient positives au-delà du dixième jour de vie par ELISA dans 11 cas soit 25,6% de l'ensemble de nos cas positifs, confirmant ainsi le diagnostic de TC pour ces nourrissons. Il est à signaler que la technique ISAGA (Immuno-Sorbent-Agglutination-Assay), créditée d'une excellente sensibilité pour la détection des IgM anti-toxoplasmiques (15), n'est plus commercialisée depuis cette année ce qui limite les options diagnostiques disponibles (16).

Face au passage transplacentaire passif des IgG et à un éventuel transfert des IgM au moment de l'accouchement, seule la technique du WB en profil comparatif permet de différencier les anticorps transmis de ceux synthétisés par l'enfant atteint de TC. Cette analyse qualitative est réalisée à la naissance en comparant le sang néonatal prélevé entre le premier et le troisième jour de vie avec le sang maternel, mais également lors du suivi en comparant les échantillons du NN prélevés à des moments ultérieurs. Dans notre étude, la technique du WB comparatif n'a été effectuée que pour 216 des 224 NN, car le premier prélèvement n'a été réalisé chez quelques nourrissons qu'au-delà de trois mois, qui correspond à l'âge limite pour la réalisation de cette technique. L'analyse des profils IgG et IgM a permis de diagnostiquer 69,8% (n=30) de nos cas de TC au cours des trois premiers mois de vie. Comme rapporté par d'autres auteurs, il a été observé une variabilité dans la date de positivité du test WB (10, 17). Cette variabilité peut s'expliquer par un traitement maternel prénatal ou par une immaturité de la réponse immunitaire individuelle chez certains NN (18). Par conséquent, il est recommandé de maintenir le suivi et de répéter le test WB en utilisant un profil comparatif NN-NN. En effet, dans notre étude, deux NN dont le test WB mère-NN était initialement négatif ont montré des anticorps néo-synthétisés de type IgM par le profil comparatif NN-NN au cours du suivi sérologique. Toutefois, en raison du coût très élevé de ce test, il n'a pas été possible de le répéter systématiquement pour tous les NN, comme recommandé. Ainsi, le suivi sérologique par des techniques conventionnelles reste la méthode de première intention dans notre contexte, et le recours au WB est justifié surtout en cas de stabilité du titre des IgG au cours du suivi sérologique durant les trois premiers mois de vie.

Parmi les 17 placentas examinés, trois se sont révélés positifs (17,6%), dont un par inoculation à la souris et deux par PCR en temps réel, ces derniers ayant été retenus comme des placentites isolées. Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature (19, 20). Cette positivité peut être attribuée à la présence d'ADN résiduel de parasites morts ou, dans de rares cas, à une persistance des parasites dans le placenta sans transmission fœtale (21) grâce à une réponse inflammatoire de l'hôte active sur le passage

transplacentaire des parasites (22, 23). En raison de pareils cas de placentites isolées et de la complexité du traitement pré-analytique des placentas, nous avons décidé d'abandonner cet examen au profit du dépistage sérologique qui reste à la base du diagnostic néonatal de la TC.

Les techniques conventionnelles de détection des IgG et IgM spécifiques doivent être systématiques. Le WB est aussi un outil crucial dans la démarche de diagnostic précoce. En raison de son coût élevé et des conditions économiques limitées de la majorité des patients, il faut l'utiliser à bon escient et le combiner aux tests sérologiques conventionnels chaque fois qu'il est nécessaire. L'infléchissement et la disparition des IgG au cours du suivi sérologique reste par ailleurs un indicateur décisif pour écarter le diagnostic de TC.

## CONCLUSION

Les techniques sérologiques de dépistage de la TC chez les NN doivent être généralisées et renforcées afin de diagnostiquer rapidement cette affection grave et démarrer une prise en charge optimale. Il est à souligner l'apport indéniable de la technique WB qu'il faut associer aux autres techniques conventionnelles pour confirmer le plus rapidement possible l'atteinte fœtale. L'instauration d'un programme national de prévention de la TC permettrait de mieux contrôler cette infection. Un tel programme devrait accorder une importance particulière au dépistage sérologique systématique de la toxoplasmose pendant la grossesse et à l'observance des mesures prophylactiques chez les femmes séronégatives. Il devrait aussi couvrir les frais élevés des tests diagnostiques, tel que le WB, ainsi que les frais de traitement des femmes enceintes et des enfants infectés.

## RÉFÉRENCES

- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 1998 Jul;28(7):1019-24.
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child trans-mission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999 May; 353(9167):1829-33.
- Hayde M, Pollak A. Clinical picture. Neonatal signs and symptoms. Dans: Ambroise-Thomas P, Petersen PE (eds). *Congenital toxoplasmosis*. Springer, Paris. 2000;153-64.
- Sellami H, Amri H, Cheikhrouhou F, Sellami A, Makni F, Trabelsi H, et al. État actuel de la toxoplasmose dans la région de Sfax, Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot*. Fév 2010;103(1):37-40.
- Ben Abdallah R, Siala E, Bouafsoun A, Maatoug R, Souissi O, Aoun K, et al. Dépistage de la toxoplasmose materno-foetale: étude des cas suivis à l'institut pasteur de Tunis (2007-2010). *Bull Soc Pathol Exot*. Mai 2013;106(2):108-12.
- Peyron F, L'ollivier C, Mandelbrot L, Wallon M, Piarroux R, Kieffer F, et al. Maternal and congenital toxoplasmosis: diagnosis and treatment recommendations of a french multidisciplinary working group. *Pathogens*. 2019 Feb;8(1):24.
- Garcia Méric P, Franck J, Dumon H, Piarroux R. Prise en charge de la toxoplasmose congénitale en France : données actuelles. *Presse Med*. Mai 2010;39(5):530-8.
- Boudaouara Y, Aoun K, Maatoug R, Souissi O, Bouratbine A, Ben Abdallah R. Congenital toxoplasmosis in Tunisia: prenatal and neonatal diagnosis and postnatal follow-up of 35 cases. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Jun;98(6):1722-6.
- Ben Abdallah R, Aoun K, Siala E, Souissi O, Maatoug R, Hloui S, et al. La toxoplasmose congénitale en Tunisie: analyse clinique et biologique de 11 cas. *Arch Pediatr*. Fév 2009;16: 118-21.
- Saghrouni F, Khammari I, Ben Abdeljelil J, Yaacoub A, Gaïed Meksi S, Ach H, et al. La toxoplasmose congénitale: à propos de 21 cas. *J Pediatr Pueric*. Avr 2013;26(2):83-9.
- Yera H, Paris L, Bastien P, Candolfi E. Diagnostic biologique de la toxoplasmose congénitale. *Rev Francoph Lab*. Mar 2015;2015(470):65-72.
- Rabilloud M, Wallon M, Peyron F. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: use of likelihood ratios for clinical management. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 May;29(5):421.
- Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, et al. Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A anti-bodies. *J Clin Microbiol*. 2001 Jun;39(6):2267-71.
- Robert Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxo-plasmosis. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Apr;25(2):264-96.
- Paris L, Houzé S. Difficultés d'interprétation de la sérologie toxoplasmose. *Rev Francoph Lab*. Sept 2022;2022(545):33-9.
- Deleplancque AS, Fricker-Hidalgo H, Pomares C, L'Ollivier C, Lemoine JP, Cimon B, et al. Comparative performance of ISAGA IgM and ELISA assays for the diagnosis of maternal and congenital *Toxoplasma* infections: which technique could replace ISAGA IgM?. *Parasite*. 2024 Feb;31:7.
- Bachi F, Gourbdji E, Yebbous Bensaid SA, Taourirt L, Ouchait A, Lazizi L, et al. Toxoplasmose congénitale: bilan du CNR toxoplasmose, de l'institut pasteur d'Algérie. *J Pediatr Pueric*. Fév 2019;32(1):20-31.
- Bessières MH, Cassaing S, Fillaux J, Berrebi A. Toxoplasmose et grossesse. *Rev Francoph Lab*. Mai 2008;2008(402):39-50.
- Ben Abdallah R, Ben Mahfoudh C, Ben Hamida E, Ben Hamouda S, Souissi O, Maatoug R, et al. La placentite à *Toxoplasma gondii* n'est pas toujours associée à une toxoplasmose congénitale. *Journal Biologie Médicale*. Juil 2019;8:180-5.
- Filiseti D, Cocquerelle V, Pfaff A, Villard O, Candolfi E. Placental testing for *Toxoplasma gondii* is not useful to diagnose congenital toxoplasmosis. *Pediatr Infect Dis*. 2010 Jul;29(7):665.
- Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filiseti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis*. 2002 Sep;186(5):684-9.
- Robbins JR, Zeldovich VB, Poukchanski A, Boothroyd JC, Bakardjiev AI. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2012 Jan;80(1):418-28.
- Abrahams VM, Bole Aldo P, Kim YM, Straszewski Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol*. 2004 Oct;173(7):4286-96.