

Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale

Parasitologie

14PAR1

octobre 2014

Frottis sanguin

Mycologie

Sérologie de la toxoplasmose

**Enquête : recensement des cas de paludisme en France métropolitaine au
cours de l'année 2013**

décembre 2015

Muriel FROMAGE (Ansm)
Guy GALEAZZI (Nanterre)

Expédition : 24 septembre 2014

Clôture : 20 octobre 2014

Edition des compte-rendus individuels : 30 janvier 2015

Paramètres contrôlés :

Frottis sanguin : *Plasmodium falciparum*, *Babesia sp.*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*

Mycologie : *Aspergillus tamarii*, *Candida metapsilosis*

Sérologie de la toxoplasmose

Enquête de recensement des cas de paludisme en France métropolitaine au cours de l'année 2013

Nombre de laboratoires concernés* : 1242

Nombre de laboratoires participants** : 1197

* Laboratoires ayant déclaré à l'Ansm pratiquer au moins une des analyses concernées par l'envoi

** Laboratoires ayant saisi leurs résultats sur le site de l'ANSM avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

A l'occasion de cette opération de contrôle, trois frottis de paludisme ont été proposés. L'un à *Plasmodium falciparum* comportait des trophozoïtes et de rares gamétocytes. Les trophozoïtes ont été confondus avec ceux d'une autre espèce plasmodiale (en majorité *P. ovale*) par un participant sur dix, soit une légère augmentation par rapport aux envois précédents d'un frottis similaire. En revanche, le frottis parasité par *P. ovale* qui, lui aussi, ne contenait que des trophozoïtes et de rares gamétocytes, a conduit au meilleur pourcentage de diagnostic exact (91,9%) obtenu à ce jour, avec une nette diminution de la confusion avec *P. vivax*, très fréquente pour ce type de frottis sans schizontes. Le troisième frottis comportait des trophozoïtes et quelques gamétocytes de *P. malariae* correctement identifié par 86,5% des participants, ce qui constitue le meilleur score obtenu pour cette espèce. Enfin, un frottis sanguin parasité par *Babesia sp.* contenant des trophozoïtes typiques allongés en forme de poire (parfois associés en paire ou en tétrade) a été proposé pour la première fois. La très grande majorité des participants (93%) a donné la réponse attendue. Néanmoins, seize laboratoires ont répondu « *Plasmodium falciparum* » malgré les renseignements cliniques très orientés « babésiose » qui accompagnaient la lame (homme, 55 ans, splénectomisé, éleveur de chien, passionné par la chasse et n'ayant jamais quitté la métropole).

En ce qui concerne la mycologie, l'envoi d'un filamenteux « *Aspergillus tamarii* » et d'une levure « *Candida metapsilosis* » a permis de sensibiliser les biologistes aux changements que la taxonomie moléculaire a apporté dans la nomenclature des espèces en mycologie. En particulier, le genre *Aspergillus* au sein duquel toutes les « anciennes » espèces sont désormais des complexes de plusieurs espèces (l'espèce *A. tamarii* fait partie du complexe *flavus*), mais aussi à l'intérieur du genre *Candida* (l'espèce *C. metapsilosis* fait partie du complexe *parapsilosis*). On note par ailleurs que les laboratoires qui ont utilisé la spectrométrie de masse MALDI TOF, technique récente, lors de cette opération de contrôle, ne sont pas encore suffisamment performants pour l'identification précise des espèces au sein des complexes.

En ce qui concerne la sérologie de la toxoplasmose, chacun des 1045 laboratoires ayant déclaré réaliser le titrage des IgG et/ou la recherche des IgM anti-toxoplasme a reçu deux échantillons à tester parmi les trois proposés. L'absence d'IgM dans tous les échantillons ainsi que l'absence d'IgG dans un des échantillons a bien été relevée par respectivement 99,9% et 99,8% des participants. Pour les deux échantillons IgG positifs, on n'observe aucun faux négatif.

Comme à chaque opération de contrôle, on note une dispersion importante des titres obtenus en IgG anti-toxoplasme selon le réactif immunoenzymatique utilisé. Ainsi, pour un même échantillon, le rapport entre le titre le plus élevé et le titre le plus faible varie de 28 à 34 selon l'échantillon considéré, ceci en dépit de l'existence d'un étalon international qui permet de quantifier en UI les IgG anti-toxoplasme. Cette donnée doit être prise en compte lorsque l'on souhaite comparer les titres en IgG de sérums successifs. L'interprétation de la cinétique des anticorps ne sera possible que si les titrages sont réalisés avec le même réactif.

Enfin, une enquête rétrospective portant sur le recensement des cas de paludisme survenus en France au cours de l'année 2013 a été réalisée en collaboration avec le CNR du paludisme auprès de l'ensemble des LBM inscrits à l'opération de CNQ en parasitologie 14PAR1. C'est la 4^{ème} enquête de ce type menée par le CNR associé au CNQ. Les trois précédentes portaient sur les cas diagnostiqués en 2004, 1999 et 1997. En effet, le paludisme ne faisant pas partie des maladies à déclaration obligatoire, le CNR s'appuie sur un réseau national de 83 LBM hospitaliers correspondants volontaires pour suivre l'évolution quantitative et qualitative des cas de paludisme importé et il est nécessaire de valider la représentativité de ce réseau.

Cette enquête a permis de confirmer que le nombre de cas de paludisme importés se situe autour de 4000 cas par an. De plus, en 2013, environ 52% des cas diagnostiqués en France ont été notifiés au CNR par le réseau. Nous remercions l'ensemble des LBM pour leur coopération à ce travail épidémiologique.

Frottis sanguin

1 - Echantillon YWASSA ou TOGBE

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'un frottis sanguin coloré au MGG.

Le diagnostic des experts Dr G. GALEAZZI (Nanterre), Dr F. ARDOIN (Gonesse) est le suivant :

Nom du parasite : *Plasmodium falciparum*

Stade : Trophozoïtes + quelques gamétocytes

Richesse du frottis : 0,5% hématies parasitées en moyenne.

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de parasites sanguins chez un infirmier originaire du Sénégal, membre d'une organisation humanitaire internationale, venant d'être rapatrié d'une mission sanitaire en Sierra Léone, pour un syndrome fébrile associé à des troubles digestifs.

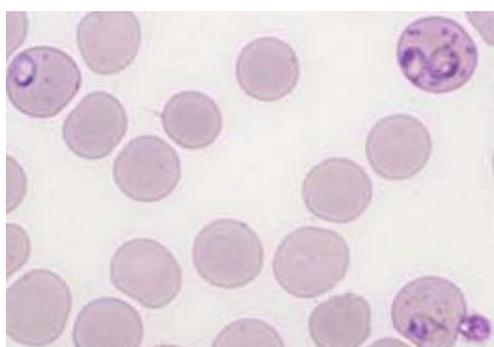


Photo 1 - *P. falciparum* (coloration MGG) : trophozoïtes âgés avec taches de Maurer

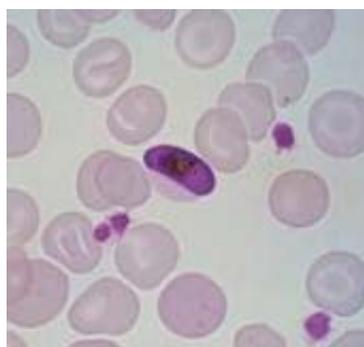


Photo 2 - *P. falciparum* (coloration MGG): gamétocyte

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 289 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont rassemblés dans le tableau I.

Pour rappel, les pourcentages des différentes réponses obtenus lors des trois envois précédents d'un frottis sanguin parasité par *P. falciparum* aux stades trophozoïte et gamétocyte sont rapportés dans le tableau II.

tableau I - Ensemble des réponses des 289 laboratoires participants

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
Trophozoïtes	<i>P. falciparum</i>	96,1	87,9 (soit 91,7% des 277 laboratoires ayant rendu un diagnostic)
Schizontes jeunes		7,1	
Schizontes âgés		5,1	
Gamétocytes		43,3	
divers/non précisés	<i>P. ovale</i>		7,2
divers/non précisés	<i>P. malariae</i>		1,7
divers/non précisés	<i>P. vivax</i>		1,0
Trophozoïtes	<i>Plasmodium sp.</i>		0,7
ABSENCE DE PARASITE			0,3
EXAMEN TRANSMIS			4,1

tableau II - Bilan des quatre opérations de contrôle « *P. falciparum* » : trophozoïte + gamétocyte (parasitémie : 0,5-1%)

Année	Nombre de participants	% d'hématies parasitées	% de réponses « <i>P. falciparum</i> »	% autres espèces de Plasmodium	% de réponses « absence de parasite »	% « transmis » ou absence de réponse
2014	289	0,5	87,9	9,9	0,3	4,1
2006	1218	0,5 - 1	94,7	3,8	< 0,1	2,1
2003	1313	0,6	95,1	4,8	0	2,1
1999	1323	0,5 - 1,5	94,0	4,4	< 0,1	2,6

Commentaires

A l'exception d'un seul laboratoire qui a rendu « absence de parasite », ce qui est considéré comme une anomalie grave sur un frottis sanguin parasité par *P. falciparum*, l'ensemble des participants ont diagnostiqué un paludisme. Toutefois, 10% d'entre eux ont donné un diagnostic erroné d'espèce (en majorité *P. ovale*).

Ce sang parasité contenait de rares gamétocytes aux extrémités arquées pointues typiques de l'espèce *falciparum* mais qui pouvaient ne pas être retrouvés sur tous les frottis préparés (seuls 43% des participants ont signalé la présence de gamétocytes).

Seuls les trophozoïtes d'aspect variable étaient présents sur les lames : trophozoïtes jeunes et trophozoïtes âgés dont la morphologie s'éloigne de l'anneau fin et régulier classiquement décrit. Les hématies parasitées étaient de taille, forme et couleur normales. Elles contenaient des tâches de Maurer peu nombreuses (de 1 à 10), à ne pas confondre avec les granulations de Schüffner, punctiformes et plus abondantes. Rappelons que ces granulations ne s'observent que si la coloration au MGG est réalisée à pH 7,2-7,4.

Les formes irrégulières des trophozoïtes âgés ainsi qu'une confusion possible entre tâches de Maurer et granulations de Schüffner peuvent expliquer les 7% de réponses *P. ovale*.

Enfin, sachant que les 3 pays touchés par l'épidémie de fièvre Ebola : Guinée Conakry, Libéria, et Sierra Leone ont également une forte prévalence pour le paludisme, et que les premiers symptômes de cette fièvre hémorragique peuvent simuler un accès palustre, il est indispensable d'éliminer une crise de paludisme chez tout patient suspect de fièvre Ebola.

2 - Echantillon MARTEL ou LIGIER

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'un frottis sanguin coloré au MGG.

Le diagnostic des experts Dr G. GALEAZZI (Nanterre), Dr F. ARDOIN (Gonesse) est le suivant :

Nom du parasite : *Babesia* sp.

Stade : Trophozoïtes

Richesse du frottis : 0,7% hématies parasitées en moyenne

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de parasites sanguins chez un homme de 56 ans éleveur de chiens dans les Landes, passionné de chasse ; n'ayant jamais quitté la métropole, splénectomisé depuis 5 ans suite à un traumatisme abdominal, présentant une fièvre inexpliquée.

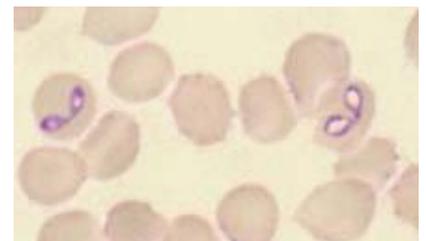
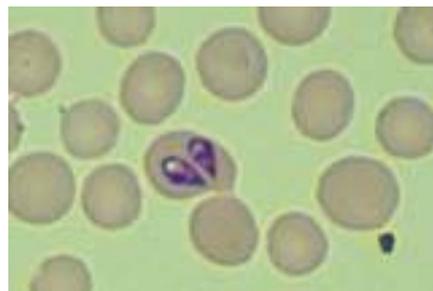
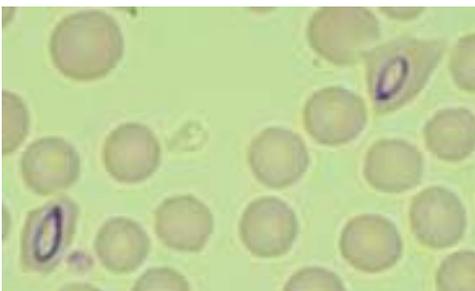


Photo 3 - *Babesia* sp. : trophozoïtes en forme de poire. Absence de pigments et de granulations

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 286 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont rassemblés dans le tableau III.

tableau III - Ensemble des réponses des 286 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics d'espèce
divers/non précisés	<i>Babesia sp.</i>	88,8 (soit 93% des 273 laboratoires ayant rendu un diagnostic)
divers/non précisés	<i>P. falciparum</i>	5,6
divers/non précisés	<i>Borrelia sp.</i>	0,7
divers/non précisés	<i>Leishmania sp.</i>	0,3
ABSENCE DE PARASITE		0
EXAMEN TRANSMIS		4,5

Commentaires

Babesia sp (= *Piroplasma*) est un protozoaire, parasite des hématies de nombreuses espèces animales (mammifères), transmise par morsure de tiques. L'atteinte humaine est très rare, mais souvent grave, pouvant être confondue avec un accès pernicieux à *Plasmodium falciparum* (manifestation clinique semblable, morphologie microscopique voisine). Bien que proposé pour la première fois dans le cadre du CNQ, on note que 93 % des participants ont su faire le diagnostic de babésiose.

Il existe 2 formes épidémiologiques :

- la forme américaine à *Babesia microti*, agent de la babésiose de petits rongeurs sauvages (plus de 300 cas décrits, plutôt bénins, dont des formes asymptomatiques),
- la forme européenne généralement causée par *Babesia divergens*, observée chez les bovidés (30 cas décrits en Europe, dont une douzaine en France). La babésiose européenne atteint essentiellement les splénectomisés vivant en milieu rural (professionnels au contact de bovidés ou des chiens, randonneurs au contact des tiques).

La babésiose européenne se manifeste par une fièvre élevée d'apparition brutale, associée à une anémie hémolytique aigue et une hémoglobinurie. C'est une maladie mortelle dans plus de la moitié des cas quand le diagnostic n'est pas posé précocement par l'observation du frottis sanguin en absence de séjour tropical, d'où l'importance du rôle du biologiste.

Le diagnostic parasitologique repose sur l'observation de trophozoïtes en forme d'anneau allongé, donnant un aspect en poire, goutte d'eau ou point d'exclamation. Le polyparasitisme est fréquent : les trophozoïtes étant accolés par paires ou tétrades, voire par 8. Dans le sang périphérique, il n'y a ni schizontes, ni gamétocytes. Un élément important à prendre en compte pour le diagnostic différentiel avec les *Plasmodium* est l'absence de pigment et de granulations dans les hématies parasitées par *Babesia sp.* Le diagnostic précis d'espèce repose sur la biologie moléculaire. La parasitémie est en règle générale importante et peut atteindre plus de 50%.

Le traitement associe antibiotiques (clindamycine, azithromycine) et antiparasitaires (quinine, atovaquone), avec au besoin une exsanguino-transfusion. La prophylaxie repose sur la lutte contre les piqûres de tiques (extraction, traitement et vaccination des animaux parasités, port de vêtements longs imprégnés de perméthrine). De plus, les splénectomisés et immunodéprimés doivent éviter de pénétrer dans le biotope des acariens notamment au printemps et à l'automne.

3 - Echantillon FANTOU ou DIABY

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'un frottis sanguin coloré au MGG.

Le diagnostic des experts Dr G. GALEAZZI (Nanterre), Dr F. ARDOIN (Gonesse) est le suivant :

Nom du parasite : *Plasmodium malariae*

Stade : Trophozoïtes + quelques gamétocytes

Richesse du frottis : 0,2% hématies parasitées en moyenne.

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de parasites sanguins chez un ivoirien, en France depuis 2002, ayant séjourné dans son pays natal pendant 1 mois, de retour en France depuis 2 mois, présentant une fièvre.

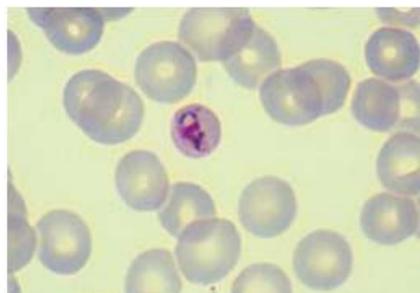
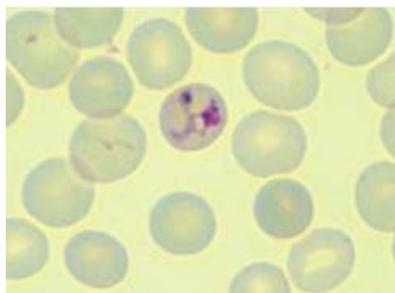


Photo 4 - *P. malariae*
trophozoïtes âgés

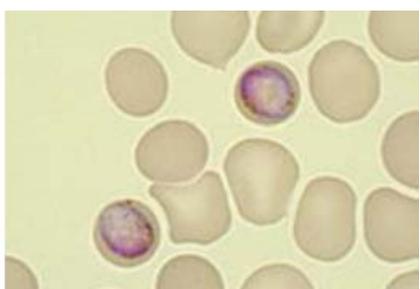
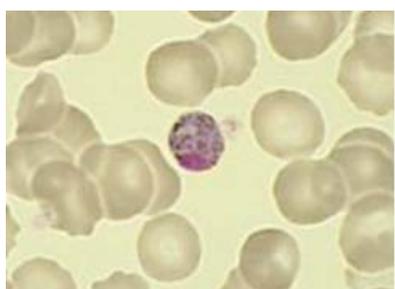


Photo 5 - *P. malariae*
gamétocytes

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 291 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont rassemblés dans le tableau IV.

Pour rappel, les pourcentages des différentes réponses obtenus lors des sept envois précédents d'un frottis sanguin parasité par *P. malariae* sont rapportés dans le tableau V.

tableau IV - Ensemble des réponses des 291 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
Trophozoïtes	<i>P. malariae</i>	92,8	81,8 (soit 86,5% des 291 laboratoires ayant rendu un diagnostic)
Schizontes jeunes		36,6	
Schizontes âgés		35,3	
Gamétocytes		55,4	
divers/non précisés	<i>P. ovale</i>		8,2
divers/non précisés	<i>P. falciparum</i>		3,1
divers/non précisés	<i>P. vivax</i>		2,4
divers/non précisés	<i>Leishmania</i>		0,3
Trophozoïtes	<i>Plasmodium sp.</i>		0,3
ABSENCE DE PARASITE			0,3
EXAMEN TRANSMIS			5,5

tableau V - Bilan des huit opérations de contrôle « *Plasmodium malariae* ».

Année	Nombre de participants	% d'hématies parasitées	% de bonnes réponses « <i>P. malariae</i> »	Plasmodium autres espèces (%)	Deuxième réponse (%)	% « transmis » ou absence de réponse
2014	329	0,2	81,8	13,7	<i>P. ovale</i> (8,2)	5,5
2012	551	0,5	75,5	19,4	<i>P. falciparum</i> (13,2)	6,0
2007	3738	≤ 0,1	78,7	18,0	<i>P. ovale</i> (8,2)	3,2
2004	1246	0,1	80,1	11,9	<i>P. falciparum</i> (5,6)	2,4
2000	1305	0,1	55,4	42,5	<i>P. vivax</i> (27,2)	1,8
1994	1189	0,1	76,4	19,4	<i>P. vivax</i> (12,0)	1,0
1992	1239	0,1	65,6	20,9	<i>P. vivax</i> (13,1)	3,5
1984	952	0,2 - 1	81,9	15,0	<i>P. vivax</i> (8,6)	1,9

Commentaires

Plasmodium malariae est présent dans de nombreux pays d'Afrique subsaharienne, dont la Côte d'Ivoire. Les hématies parasitées étaient peu nombreuses (0,2%) sur ce frottis, ce qui est classique pour cette espèce. Un seul LBM n'a pas vu de *Plasmodium*, alors qu'il fallait parcourir une dizaine de champs à l'immersion pour trouver une hématie parasitée.

Pour reconnaître *P. malariae* et le différencier des autres espèces plasmodiales, on observe la taille, la forme et la couleur des hématies parasitées, l'hétérogénéité ou non des différentes formes parasitaires présentes sur la lame et la morphologie de chaque stade.

L'observation des hématies parasitées montre quelques particularités : une taille plus petite que les hématies non parasitées, une coloration plus sombre, l'abondance de pigment malarique (grains noirs), l'absence de granulations de Schüffner comme dans *P. ovale* ou *P. vivax* ou de tâches de Maurer comme dans *P. falciparum*.

En ce qui concerne l'aspect morphologique des différents stades d'évolution de *P. malariae* dans le sang circulant :

- le trophozoïte jeune a une forme classique annulaire, mais avec un cytoplasme plus épais que *P. falciparum*. Il peut être déjà accompagné d'un pigment noirâtre.
- le trophozoïte plus âgé prend un aspect difforme puis s'allonge en bande équatoriale occupant tout le diamètre de l'hématie. Le pigment est présent en grains assez gros.
- les schizontes se transforment progressivement pour évoluer en corps en rosace donnant une image typique en marguerite (rosace avec 6 à 8 mérozoïtes, 12 au maximum répartis autour du pigment central).
- les gamétocytes sphériques ou ovoïdes occupent toute l'hématie avec le pigment noir épais qui pousse le noyau (rouge) sur le côté.

Les experts avaient signalé la présence de gamétocytes jeunes et mûrs et de quelques trophozoïtes étirés mais sans présence de bandes équatoriales. Si plus de 86% des participants ont su reconnaître l'espèce, ils ont confondu les différents stades : la moitié seulement a indiqué la présence de gamétocytes et un peu plus d'un tiers la présence de schizontes. Il est vrai qu'il n'est pas toujours aisé de différencier un trophozoïte âgé avec un noyau en cours de division, d'un schizonte jeune à 2 noyaux et d'un gamétocyte jeune avec un noyau unique de petite taille.

Il ne s'agissait pas de *P. ovale* (espèce diagnostiquée par 8% des participants) car dans ce cas, les hématies parasitées sont de taille égale ou un peu plus grande que les hématies saines, leur forme est souvent allongée et elles contiennent des granulations de Schüffner.

4 - Echantillon GHABI ou KHORE

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'un frottis sanguin coloré au MGG.

Le diagnostic des experts Dr G. GALEAZZI (Nanterre), Dr F. ARDOIN (Gonesse) est le suivant :

Nom du parasite : *Plasmodium ovale*

Stade : Trophozoïtes + rares gamétocytes

Richesse du frottis : 0,3% hématies parasitées en moyenne

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de parasites sanguins chez un ivoirien, en France depuis 2002, ayant séjourné dans son pays natal pendant 1 mois, de retour en France depuis 2 mois, présentant une fièvre.

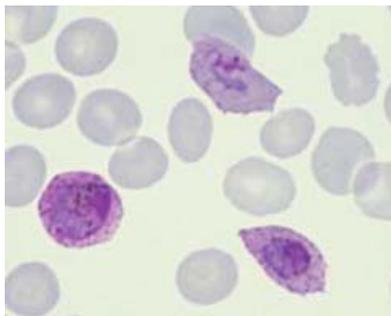


Photo 6 - *P. ovale* :
Deux gamétocytes et un trophozoïte avec granulations de Schüffner.

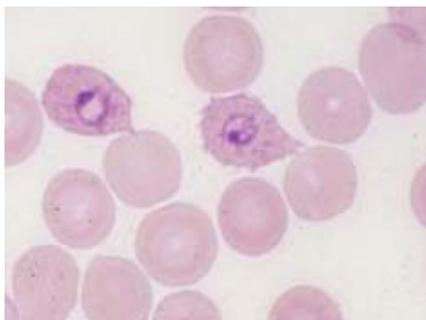


Photo 7 - *P. ovale* :
Trophozoïtes jeunes. Début de schüffnérisation.

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 301 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont rassemblés dans le tableau VI.

Pour rappel, les pourcentages des différentes réponses obtenus lors des cinq envois précédents d'un frottis sanguin parasité par *P. ovale* aux stades trophozoïte et gamétocyte sont rapportés dans le tableau VII.

tableau VI - Ensemble des réponses des 301 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
Trophozoïtes	<i>P. ovale</i>	93,1	87,0% (soit 91,9% des 285 laboratoires ayant rendu un diagnostic)
Schizontes jeunes		23,7	
Schizontes âgés		13,4	
Gamétocytes		23,7	
divers/non précisés	<i>P. vivax</i>		4,3
divers/non précisés	<i>P. falciparum</i>		3,0
divers/non précisés	<i>P. malariae</i>		0,7
Trophozoïtes	<i>Plasmodium sp.</i>		0,7
ABSENCE DE PARASITE			0
EXAMEN TRANSMIS			5,3

tableau VII - Bilan des six opérations de contrôle « *Plasmodium ovale* » : trophozoïtes + gamétocytes.

Année	Nombre de participants	% d'hématies parasitées	% de réponses « <i>P. ovale</i> »	% de réponses « <i>P. vivax</i> »	% de réponses « <i>P. falciparum</i> »	% « transmis » ou absence de réponse
2014	301	0,3	87,0	4,3	3,0	5,3
2012	531	0,7	72,5	17,3	5,3	5,5
2010	1126	0,14	74,2	7,2	5,8	10,4
2005	1260	0,5	77,0	19,4	1,2	2,5
2002	1328	0,4	81,8	12,3	3,7	1,9
1996	1272	0,3	72,6	21,6	2,0	1,7

Commentaires

Sur les frottis GHABI et KHORE, le diagnostic de *Plasmodium ovale* était relativement facile à établir sur l'aspect des hématies parasitées et des éléments parasitaires présents : trophozoïtes jeunes et âgés. Les gamétocytes n'étant pas présents sur toutes les lames. En effet, les hématies parasitées sont ovalisées pour la moitié d'entre elles et certaines peuvent présenter un bord frangé. Elles sont de taille normale ou légèrement plus grande que les hématies non parasitées. De plus, toutes les hématies parasitées contiennent des granulations de Schüffner, même celles hébergeant les trophozoïtes les plus jeunes qui en sont dépourvues chez *P. vivax* qui par ailleurs est exceptionnel en Afrique subsaharienne.

Le *Plasmodium* est compact avec un cytoplasme peu vacuolisé. La rareté des vacuoles à l'intérieur du parasite ainsi que l'absence du caractère amiboïde patent confirment l'appartenance à l'espèce *ovale*.

La comparaison des diagnostics obtenus lors de cette opération de contrôle avec les envois précédents de frottis parasités par *P. ovale* aux stades trophozoïtes et gamétocytes montre une nette amélioration des performances des participants avec 91,9% de diagnostics d'espèce exact. La confusion habituelle avec *P. vivax* persiste, mais elle atteint son niveau le plus faible et concerne moins de 5% des laboratoires.

Mycologie

1 - Echantillon YONI ou TERREL ou MOUCHI ou LOISON

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'une souche lyophilisée identifiée « *Aspergillus tamarii* ». Cette souche a été fournie par le Pr S. BRETAGNE / Dr A. ALANIO (Hôpital Saint Louis, Paris).

Les renseignements cliniques qui accompagnaient l'échantillon sont les suivants : souche isolée, après culture à 30°C, d'une biopsie d'escarre nasale chez une patiente en aplasie médullaire idiopathique.

En plus de l'identification, il était également demandé aux LBM participants de préciser la(les) technique(s) utilisée(s) pour ce diagnostic parmi la liste suivante : caractères culturels, morphologie microscopique, milieu chromogène, mini-galerie de tests biochimiques (carte YST Vitek2 Biomérieux, Phoenix Becton Dickinson, galeries API 32C, 20Caux, Auxacolor, etc....), spectrométrie de masse (MALDI-TOF), biologie moléculaire (PCR).



Photo 1 - aspect microscopique
(source CNRMA)

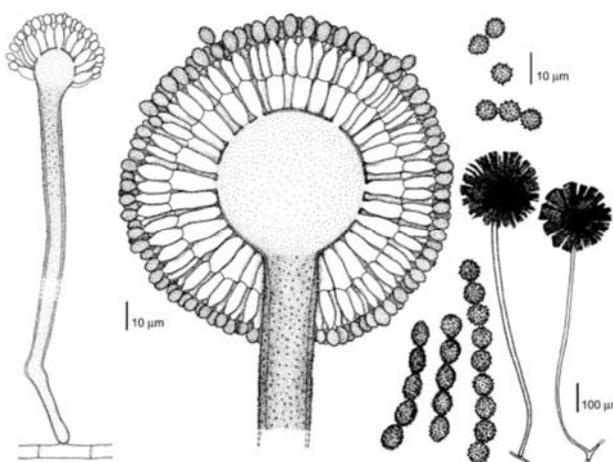


Schéma 1 - aspect microscopique
(Atlas of Clinical fungi v4.1)

Résultats des participants

L'ensemble des identifications transmises par les 527 laboratoires ayant rendu un diagnostic ainsi que leur pourcentage respectif sont détaillés dans le tableau VIII.

Les progrès de la taxonomie moléculaire ont amené à l'éclatement de l'espèce anciennement dénommée « *Aspergillus flavus* » en plusieurs espèces : *Aspergillus flavus* sensu stricto, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus parasiticus*, etc ...). Ces différentes espèces sont regroupées dans la section *Flavi* (aussi appelée complexe *Flavus*). Cette évolution de la nomenclature concerne toutes les « anciennes » espèces du genre *Aspergillus* : *A. fumigatus* (*Aspergillus* section *Fumigati*), *A. niger* (*Aspergillus* section *Nigri*), *A. terreus* (*Aspergillus* section *Terrei*), *A. nidulans* (*Aspergillus* section *Nidulantes*), *A. versicolor* (*Aspergillus* section *versicolores*). Afin de sensibiliser les biologistes à ces changements, la table de codage des champignons proposée lors de cette opération de contrôle 14PAR1 tenait compte, pour la première fois, de la nouvelle nomenclature pour ces espèces.

Pour rappel, les pourcentages de bonnes réponses obtenus lors des cinq envois précédents, réalisés entre 1981 et 2004, d'une souche identifiée « *Aspergillus flavus* » sont rapportés dans le tableau IX.

Le détail des techniques utilisées par les laboratoires pour l'identification d'un *Aspergillus* est rapporté dans le tableau X.

tableau VIII - Bilan des réponses des 527 laboratoires.

Diagnostic	Effectif (%)
Aspergillus flavus	305 (57,9)
Aspergillus fumigatus	52 (9,9)
Emericella nidulans	26 (4,9)
Aspergillus niger	25 (4,7)
Aspergillus section nidulantes	19 (3,6)
Aspergillus terreus	17 (3,2)
Aspergillus versicolor	17 (3,2)
Aspergillus section flavi	10 (1,9)
Aspergillus tamarii	10 (1,9)
Aspergillus sp.	7 (1,3)
Aspergillus glaucus	4 (0,8)
Aspergillus section nigri	3 (0,6)
Aspergillus section fumigati	2 (0,4)
Aspergillus ochraceus	1 (0,2)
Aspergillus repens	1 (0,2)
Aspergillus section versicolores	1 (0,2)
Candida albicans	1 (0,2)
Candida parapsilosis	1 (0,2)
Trichosporon sp	2 (0,4)
Scopulariopsis sp	16 (3,0)
Scopulariopsis brevicaulis	3 (0,6)
Rhizomucor pusillus	1 (0,2)
Rhizomucor sp.	1 (0,2)
Cladosporium sp.	1 (0,2)
Trichophyton rubrum	1 (0,2)

	réponse attendue
	réponse acceptable

tableau IX - Bilan des cinq opérations de contrôle précédentes « *Aspergillus flavus* ».

Année	Nombre de participants	% de bonnes réponses « <i>Aspergillus flavus</i> »	% deuxième réponse « <i>Aspergillus fumigatus</i> »	% « transmis » ou absence de réponse
2004	1261	52,2	24,1	4,3
1999	1316	54,8	22,7	2,7
1994	1157	39,3	33,7	4,8
1989	1159	38,2	39,7	5,8
1981	779	34,2	44,7	8,7

tableau X - Techniques utilisées par les 527 laboratoires pour l'identification d'un *Aspergillus*

Effectif	caractères cultureux	morphologie microscopique	milieu chromogène	galerie	MALDI-TOF	PCR
6	X					
25		X				
458	X	X				
16	X	X	X			
1			X			
1		X		X		
2				X		
1					X	
4		X			X	
6	X	X			X	
1	X	X			X	X
1	X	X				X
1						X
4						
total	488	513	17	3	12	3

Commentaires

Aspergillus tamarii fait partie de la section (complexe d'espèces) *Flavi*. L'aspect macroscopique de la colonie et l'aspect microscopique montrent des différences entre cette espèce et l'espèce *Aspergillus flavus* stricto sensu. *Aspergillus tamarii* donnera des colonies de couleur brun clair à brun foncé et, à l'analyse microscopique, des conidies de taille importante (5 à 8 µm de diamètre) tandis que les colonies d'*A. flavus* seront plutôt vert-jaune et les conidies plus petites (3,5 à 4,5 µm).

Seuls dix laboratoires ont identifié l'espèce exacte (*Aspergillus tamarii*) et dix autres ont rendu « *Aspergillus* section *Flavi* » qui est également une bonne réponse. L'identification de cette espèce en « *Aspergillus flavus* », rendue par la majorité des participants (58%) a été considérée comme acceptable vu le contexte (tableau VIII). L'impact clinique d'une infection à *A. tamarii* par rapport à *A. flavus* n'est pas connu. Néanmoins, l'identification la plus juste de l'espèce est toujours importante à réaliser avec précision pour un épisode infectieux. D'une manière générale, lorsque le laboratoire ne dispose pas des outils nécessaires pour identifier les *Aspergillus* au niveau de l'espèce au sein d'un complexe (base de donnée MALDI-TOF extensive validée ou séquençage du gène de la bêta-tubuline ou calmoduline), il est de bonne pratique de rendre un résultat de type : « *Aspergillus flavus* complexe » ou « *Aspergillus* Section *Flavi* ».

Les trois laboratoires qui ont utilisé une technique de biologie moléculaire (associée à la spectrométrie de masse pour l'un d'eux) pour identifier la souche ont répondu « *A. tamarii* ». En revanche, les bases de données MALDI-TOF ne permettent pas toutes d'identifier *A. tamarii*. En effet, sur les 12 laboratoires ayant utilisé cette technique d'identification, quatre ont répondu « *A. tamarii* », sept « *A. flavus* » et un « *Aspergillus* section *Nidulantes* ».

Enfin, on note une nette amélioration des résultats par rapport aux cinq envois précédents. En particulier, une confusion moindre avec « *Aspergillus fumigatus* » qui concernait un laboratoire sur quatre en 2004 et seulement un laboratoire sur dix en 2014 (tableau IX).

2 - Echantillon FIORI ou DUZEC ou GUIRAL ou KALEF

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'une souche lyophilisée identifiée « *Candida metapsilosis* ». Cette souche a été fournie par le Pr S. BRETAGNE / Dr A. ALANIO (Hôpital Saint Louis, Paris).

Les renseignements cliniques qui accompagnaient l'échantillon sont les suivants : souche isolée d'une hémoculture, chez un patient brûlé à plus de 40%, un mois après le début de son hospitalisation.

En plus de l'identification, il était également demandé aux LBM participants de préciser la(les) technique(s) utilisée(s) pour ce diagnostic parmi la liste suivante : caractères cultureux, morphologie microscopique, milieu

chromogène, mini-galerie de tests biochimiques (carte YST Vitek2 Biomérieux, Phoenix Becton Dickinson, galeries API 32C, 20Caux, Auxacolor, etc....), spectrométrie de masse (MALDI-TOF), biologie moléculaire (PCR).

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 519 laboratoires ayant rendu un diagnostic ainsi que leur pourcentage respectif sont détaillés dans le tableau XI.

Les progrès de la taxonomie moléculaire ont amené à l'éclatement de l'espèce anciennement dénommée « *Candida parapsilosis* » en plusieurs espèces : *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, ...). Ces différentes espèces sont regroupées dans le complexe d'espèce *parapsilosis*. La table de codage des champignons proposée lors de cette opération de contrôle 14PAR1 tenait compte, pour la première fois, de l'évolution de la nomenclature pour ces espèces.

Pour rappel, les pourcentages de bonnes réponses obtenus lors des quatre envois précédents, réalisés entre 1982 et 2000, d'une souche identifiée « *Candida parapsilosis* » sont rapportés dans le tableau XII.

Le détail des techniques utilisées par les laboratoires pour l'identification d'un *Candida* est rapporté dans le tableau XIII.

tableau XI - Bilan des réponses des 519 laboratoires

Diagnostic	Effectif (%)
Candida parapsilosis	441 (85,0)
Candida parapsilosis complexe	24 (4,6)
Candida metapsilosis	23 (4,4)
Candida famata	5 (1,0)
Candida non albicans	5 (1,0)
Candida sp.	4 (0,8)
Candida albicans	3 (0,6)
Candida dubliniensis	2 (0,4)
Candida tropicalis	2 (0,4)
Candida glabrata	1 (0,2)
Candida guilliermondii	1 (0,2)
Candida krusei	1 (0,2)
Candida sake	1 (0,2)
Cryptococcus laurentii	2 (0,4)
Cryptococcus neoformans	2 (0,4)
Cryptococcus sp.	1 (0,2)
Microsporum canis	1 (0,2)

94 %

	réponse attendue
	réponse acceptable

tableau XII - Bilan des quatre opérations de contrôle précédentes « *Candida parapsilosis* ».

Année	Nombre de participants	% de bonnes réponses « <i>Candida parapsilosis</i> »	% <i>Candida</i> autres espèces	% levures autres que <i>Candida</i>	% «transmis» ou absence de réponse
2000	1301	84,2	8,0	2,5	5,3
1995	1276	81,9	11,3	3,9	2,9
1989	1137	66,4	19,8	5,1	6,3
1982	1019	64,6	19,2	5,6	9,7

tableau XIII - Techniques utilisées par les 519 laboratoires pour l'identification d'un *Candida*

Effectif	caractères cultureux	morphologie microscopique	milieu chromogène	galerie	MALDI-TOF	PCR
6	X					
1		X				
6	X	X				
1	X		X			
1		X	X			
3	X	X	X			
12			X			
36	X			X		
13		X		X		
39	X	X		X		
227				X		
19	X		X	X		
4		X	X	X		
31	X	X	X	X		
72			X	X		
1	X				X	
1		X			X	
2	X	X			X	
24					X	
9				X	X	
1	X			X	X	
2	X	X		X	X	
1	X		X	X	X	
5			X		X	
1		X	X		X	X
1						X
total	147	104	150	454	47	2

Commentaires

Candida metapsilosis fait partie du complexe d'espèce *parapsilosis*. Les caractères cultureux, l'aspect microscopique et phénotypique (couleur sur milieu chromogène, galeries d'identification biochimique) ne permettent pas de différencier *Candida metapsilosis* de *Candida parapsilosis* sensu stricto.

Seuls 23 laboratoires ont identifié l'espèce exacte (*C. metapsilosis*) et 24 autres ont rendu « *Candida parapsilosis complexe* » qui est également une bonne réponse. L'identification « *Candida parapsilosis* », rendue par la majorité des participants (85%) a été considérée comme acceptable dans la mesure où l'espèce *C. metapsilosis* est rare et que son profil de sensibilité aux antifongiques est comparable à celui de *Candida parapsilosis*. De plus, l'impact clinique d'une infection à *C. metapsilosis* par rapport à *C. parapsilosis* n'est pas connu. Néanmoins, d'une manière générale, lorsque le laboratoire ne dispose pas des outils nécessaires pour identifier les espèces incluses dans les complexes d'espèces (base de donnée MALDI-TOF extensive validée ou séquençage des ITS), il est de bonne pratique de rendre un résultat de type « *Candida parapsilosis complexe* ».

Les deux laboratoires qui ont utilisé une technique de biologie moléculaire (associée à la spectrométrie de masse pour l'un d'eux) pour identifier la souche ont répondu « *C. metapsilosis* ». En revanche, les bases de données MALDI-TOF ne permettent pas toutes d'identifier *Candida metapsilosis* (ou bien *Candida orthopsilosis*, autre membre de ce complexe d'espèce). En effet, sur les 47 laboratoires ayant utilisé cette technique d'identification, on note 45,6% « *C. parapsilosis* », 43,5% « *C. metapsilosis* » et 10,9% « *Candida parapsilosis complexe* ». Enfin, on observe une amélioration continue des résultats avec 94 % de réponses correctes, soit +9,8 % par rapport à l'envoi précédent.

Sérologie de la toxoplasmose

Définition des échantillons

Deux échantillons différents ont été adressés à chacun des 1045 laboratoires ayant déclaré pratiquer le titrage des IgG et/ou la recherche des IgM anti-toxoplasme.

Les échantillons lyophilisés préparés à partir de trois pools de plasmas défibrinés sont définis de la façon suivante :

N° échantillon	IgG anti-toxoplasme	IgM anti-toxoplasme
1401 - 1402	absence	absence
1403 - 1404 - 1407 - 1408	présence	absence
1405 - 1406	présence	absence

Méthode statistique et expression des résultats

Les paramètres statistiques (effectif, moyenne et écart-type) sont calculés à partir des données fournies par les laboratoires. Ils sont ensuite recalculés après une troncature à 2 écart-types (opération consistant à éliminer les valeurs situées au-delà de 2 écart-types de part et d'autre de la moyenne).

Dans les tableaux de résultats concernant le titrage des IgG par les réactifs immunoenzymatiques figurent, pour chaque groupe supérieur ou égal à 10 participants : les effectifs non tronqués (n), les effectifs tronqués (nTr), la moyenne tronquée (mTr), l'écart-type tronqué (sTr) et le coefficient de variation tronqué (CVTr) calculé par la formule $100 \times sTr / mTr$.

Résultats des participants

1 - Titrage des IgG anti-toxoplasme

En ce qui concerne le titrage des IgG anti-toxoplasme, 985 laboratoires ont rendu un résultat, soit avec un réactif (79,3%), soit avec deux réactifs (20,7%).

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

Les conclusions (« négatif », « limite » ou « positif ») rendues par les laboratoires ayant testé l'échantillon 1401-1402 négatif en IgG anti-toxoplasme sont détaillées dans le tableau XV.

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 XVI et XVII.

Enfin, la dispersion des titres obtenus avec les réactifs immunoenzymatiques pour les deux échantillons positifs de cette opération de contrôle est soulignée dans le tableau XVIII.

tableau XIV - Réactifs utilisés

Techniques / réactifs	Nombre d'utilisateurs (%)
IMMUNOENZYMOLOGIE (IE) :	1100 (92,5%)
ABBOTT "Architect Toxo IgG"	226
BIOMERIEUX "Vidas Toxo IgG"	198
ROCHE "Elecsys/modular Toxo G "	192
SIEMENS "ToxoG/ADVIA Centaur"	115
ROCHE "Cobas Core Toxo IgG EIA"	99
BECKMAN "DXI Toxo IgG"	97
BECKMAN COULTER "ACCESS Toxo IgG"	47
SIEMENS "Immulite 2000 toxoplasmose G"	30
DIASORIN "Liaison Toxo IgG "	30
ORTHO CLIN. DIAG. "Vitros Toxo IgG"	21
BIORAD "Platelia Toxo IgG"	16
ABBOTT "AXSYM Toxo IgG"	13

BIOMERIEUX "Vidas Toxo Compétition"	9
SIEMENS "Enzygnost Toxoplasmosse IgG"	5
SIEMENS "Immulite toxoplasmosse G"	2
LATEX :	62 (5,2%)
FUMOUCHE "Toxolates"	40
BIORAD "Pastorex Toxo"	20
SERVIBIO "Servitex Toxo"	1
BIOKIT "Toxocell latex"	1
HEMAGGLUTINATION (Hémaggl.) :	6 (0,5%)
FUMOUCHE "Toxo-HAI"	
IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI) :	8 (0,7%)
BIOMERIEUX "Toxo-spot IF"	
AGGLUTINATION SENSIBILISEE (Aggl. sens.) :	10 (0,8%)
BIOMERIEUX "Toxo screen DA"	
REACTIFS AUTRES :	3 (0,3%)
Total	1189 (100%)

tableau XV - Echantillon 1401 - 1402

Conclusions en fonction de la technique utilisée

Technique / conclusion	IE	Latex	Hémaggl.	IFI	Aggl. sens.	Total
Négatif	515	28	6	3	3	555
Positif	7	1	-	-	-	8
Total	522	29	6	3	3	563

tableau XVI - Echantillons 1403 - 1404 et 1407 - 1408

Conclusions en fonction de la technique utilisée :

Technique / conclusion	IE	latex	IFI	Hémaggl.	Aggl.sens.	Autres	Total
Positif	1083	62	8	6	10	3	1172
Négatif	2	-	-	-	-	-	2
Total	1085	62	8	6	10	3	1174

Technique immunoenzymatique : titres obtenus en fonction du réactif utilisé :

	n	nTr	mTr	s Tr	CV Tr (%)
ABBOTT "Architect Toxo IgG"	219	208	68,4	4,1	6,0
BIOMERIEUX "Vidas Toxo IgG"	195	184	199,0	32,0	16,1
ROCHE "Elecys/modular Toxo G "	156	145	2300,5	148,7	6,5
SIEMENS "ToxoG/ADVIA Centaur"	111	108	491,5	20,8	4,2
ROCHE "Cobas Core Toxo IgG EIA"	82	75	2322,1	125,3	5,4
BECKMAN "DXI Toxo IgG"	85	80	260,1	30,9	11,9
BECKMAN COULTER "ACCESS Toxo IgG"	55	54	258,8	34,2	13,2
SIEMENS "Immulite 2000 toxoplasmosse G"	19	18	261,8	39,3	15,0
DIASORIN "Liaison Toxo IgG "	30	26	193,3	26,8	13,9
ORTHO CLIN. DIAG. "Vitros Toxo IgG"	21	21	288,1	37,0	12,8
BIORAD "Platelia Toxo IgG"	14	13	188,2	45,5	24,2
ABBOTT "AXSYM Toxo IgG"	17	17	67,8	8,0	11,8
Tous réactifs confondus	En raison de la dispersion des moyennes par réactif, la moyenne tous réactifs confondus ne peut être utilisée comme valeur cible de consensus.				

tableau XVII - Echantillons 1405 - 1406

Conclusions en fonction de la technique utilisée :

Technique / conclusion	IE	latex	IFI	Hémaggl.	Aggl.sens.	Autres	Total
Positif	573	29	5	1	6	3	617
Négatif	-	-	-	-	-	-	-
Total	573	29	5	1	6	3	617

Technique immunoenzymatique : titres obtenus en fonction du réactif utilisé :

	n	nTr	mTr	s Tr	CV Tr (%)
ABBOTT "Architect Toxo IgG"	113	111	11,5	0,8	6,9
BIOMERIEUX "Vidas Toxo IgG"	105	103	35,5	3,7	10,4
ROCHE "Elecys/modular Toxo G "	98	96	313,7	15,2	4,8
SIEMENS "ToxoG/ADVIA Centaur"	64	59	89,9	3,0	3,3
ROCHE "Cobas Core Toxo IgG EIA"	49	47	324,2	12,5	3,9
BECKMAN "DXI Toxo IgG"	49	47	48,7	5,7	11,7
BECKMAN COULTER "ACCESS Toxo IgG"	29	29	48,3	5,9	12,2
SIEMENS "Immulite 2000 toxoplasmosse G"	17	16	32,6	2,1	6,4
DIASORIN "Liaison Toxo IgG "	13	13	34,9	5,8	16,5
ORTHO CLIN. DIAG. "Vitros Toxo IgG"	11	11	57,1	7,5	13,1
BIORAD "Platelia Toxo IgG"	9	9	46,1	8,9	19,2
ABBOTT "AXSYM Toxo IgG"	8	7	12,4	2,4	19,4
Tous réactifs confondus	En raison de la dispersion des moyennes par réactif, la moyenne tous réactifs confondus ne peut être utilisée comme valeur cible de consensus.				

tableau XVIII - Technique immunoenzymatique : dispersion des titres en IgG des deux échantillons positifs

Echantillons	Titre (UI/mL)			le plus élevé/ le plus faible
	tous réactifs *	le plus faible	le plus élevé	
1405 - 1406	113,2	11,5 ^(a)	324,2 ^(b)	28
1403 -1404 -1407 - 1408	702,1	67,8 ^(c)	2322,1 ^(b)	34

* : moyenne tous réactifs confondus,

(a) : titre moyen ABBOTT Architect, (b) : titre moyen ROCHE Cobas Core, (c) : titre moyen ABBOTT AxSYM

2 - Détection des IgM anti-toxoplasme

En ce qui concerne la détection des IgM anti-toxoplasme, 985 laboratoires ont rendu un résultat, soit avec un réactif (89,7%), soit avec deux réactifs (10,3%).

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

Pour chacun des échantillons, les conclusions rendues par les laboratoires participants en fonction de la technique utilisée sont rassemblées dans le tableau XX.

tableau XIX - Réactifs utilisés

Techniques / réactifs	Nombre d'utilisateurs (%)
<u>IMMUNOENZYMOLOGIE (IE):</u>	1073 (98,8%)
ABBOTT "Architect Toxo IgM"	216
ROCHE "Elecsys/modular Toxo M"	191
BIOMERIEUX "Vidas Toxo IgM"	188
SIEMENS "ToxoM/ADVIA Centaur"	110
ROCHE "Cobas Core Toxo IgM EIA"	102
BECKMAN "DXI Toxo IgM"	92
BECKMAN COULTER "ACCESS Toxo IgM"	49
SIEMENS "Immulite 2000 toxoplasmose M"	30
DIASORIN "Liaison Toxo IgM "	27
ABBOTT "AXSYM Toxo IgM"	21
ORTHO CLIN. DIAG. "Vitros Toxo IgM"	20
BIORAD "Platelia Toxo IgM"	19
SIEMENS "Enzygnost Toxoplasmose IgM"	5
SIEMENS "Immulite toxoplasmose M"	2
BIOMERIEUX "Vidas Toxo Compétition"	1
<u>HEMAGGLUTINATION (Hémaggl.):</u>	2 (0,2%)
FUMOUCHE "Toxo-HAI"	2
<u>IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (IFI):</u>	2 (0,2%)
BIOMERIEUX "Toxo-spot IF"	2
<u>ISAGA :</u>	6 (0,6%)
BIOMERIEUX "Toxo ISAGA"	6
<u>AGGLUTINATION SENSIBILISEE (Aggl. sens.) :</u>	1 (0,1%)
BIOMERIEUX "Toxo screen DA"	1
<u>REACTIFS AUTRES :</u>	2 (0,2%)
Total	1086 (100%)

tableau XX - Détection des IgM anti-toxoplasme : conclusions en fonction de la technique utilisée

Echantillons 1401-1402

Technique / Conclusion	IE	ISAGA	Hémaggl.	Total
Négatif	518	3	1	522
Limite	1	-	-	1
Positif	-	-	-	-
Total	519	3	1	523

Echantillons 1403-1404 et 1407-1408

Technique / Conclusion	IE	ISAGA	Hémaggl.	IFI	Aggl. Sens.	autres	Total
Négatif	1069	6	2	2	1	2	1077
Limite	-	-	-	-	-	-	-
Positif	1	-	-	-	-	-	1
Total	1070	6	2	2	1	2	1083

Echantillons 1405-1406

Technique / Conclusion	IE	ISAGA	Hémaggl.	IFI	Aggl. Sens.	autres	Total
Négatif	554	2	1	2	1	2	562
Limite	1	-	-	-	-	-	1
Positif	-	-	-	-	-	-	-
Total	555	2	1	2	1	2	563

3 - Cas clinique

Le cas clinique était le suivant : « prélèvements de 2 patientes à deux mois de grossesse pour la détermination de leur statut sérologique en l'absence d'antériorité (toxoplasmose dépistage - sérodiagnostic initial). Chaque flacon correspond à une patiente différente. Il vous est demandé de réaliser le titrage des IgG (résultat exprimé en UI/ml) et/ou la recherche des IgM, puis à partir des deux résultats (IgG et IgM) obtenus, d'interpréter le profil sérologique et, le cas échéant, d'indiquer les modalités du suivi sérologique et/ou les examens complémentaires à effectuer sur ce premier prélèvement. »

En effet, comme le précise la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale, le titrage des IgG et la recherche des IgM anti-toxoplasme doivent être accompagnés d'une interprétation du profil sérologique ainsi que des modalités du suivi sérologique, le cas échéant.

Les conclusions proposées au choix du biologiste qui pouvait en sélectionner de une à quatre sont rapportées dans le tableau XXI.

Les conclusions choisies par les biologistes pour l'échantillon « IgG négatif et IgM négatif » sont détaillées dans le tableau XXII, tandis que les conclusions choisies pour les deux échantillons « IgG positif et IgM négatif » sont détaillées dans le tableau XXIII.

tableau XXI - Conclusions au choix

Interprétation des résultats du titrage des IgG et de la recherche des IgM	
TOX A	Absence d'anticorps. Absence d'immunité.
TOX B	Taux limite. A considérer comme non immunisée.
TOX C	Immunité ancienne probable.
TOX D	Profil sérologique en faveur d'une toxoplasmose assez récente.
TOX E	Discordance entre deux techniques.

Examens complémentaires et/ou modalités de suivi sérologique	
TOX F	Sérologie à renouveler tous les mois jusqu'à l'accouchement et 1 mois après.
TOX G	Sérologie à contrôler dans 1 à 2 semaines.
TOX H	Sérologie à contrôler dans 3 semaines.
TOX I	A confirmer par une nouvelle sérologie.
TOX K	Suivre les mesures hygiéno-diététiques de prophylaxie.
TOX M	Réaliser une mesure de l'avidité des IgG sur ce prélèvement.
TOX P	Réaliser une seconde technique de détection des IgM de principe différent sur ce prélèvement.
TOX S	Réaliser une seconde technique de détection des IgG de principe différent sur ce prélèvement.
TOX T	Réaliser un Western blot.

tableau XXII - Echantillon « IgG négatif et IgM négatif » : conclusions des biologistes

Opération	14PAR1
Echantillon	1401 - 1402
Conclusion :	
TOX A + TOX F + TOX K	56,6%
TOX A + TOX F	33,0%
TOX A + TOX H	1,1%
TOX A + TOX H + TOX K	0,6%
TOX A	8,7%

tableau XXIII - Echantillons « IgG positif et IgM négatif » : conclusions des biologistes

Opération	14PAR1	
	1405 - 1406	1403 - 1404 1407 - 1408
Echantillon	1405 - 1406	1403 - 1404 1407 - 1408
Titre moyen IgG (UI/ml)	113	702
Conclusion :		
« TOX C + TOX H » ou « TOX C + TOX I »	82,5 %	81,4 %
TOX C « immunité ancienne probable »	12,4%	11,4 %
TOX C + TOX M +/- TOX H ou TOX I	1,8 %	2,5 %
Autres conclusions	3,3 %	4,7 %

Commentaires

Les recommandations concernant l'interprétation des différents profils sérologiques, citées dans les commentaires ci-dessous sont extraites de la publication du CNR de la toxoplasmose parue dans les Feuilles de Biologie, janvier 2011 (1).

1 - IgG anti-toxoplasme

En ce qui concerne la recherche et le titrage des IgG anti-toxoplasme, on note huit conclusions faussement positives avec l'échantillon négatif 1401-1402 (tableau XV). Pour six d'entre elles, il s'agit d'une erreur de sélection du n° de flacon sur le menu déroulant lors de la saisie des résultats du CNQ sur le formulaire de saisie internet (n° sélectionné : 1402 au lieu de 1403) et pour un LBM, il s'agit d'une inversion probable des résultats obtenus sur les deux échantillons testés (n°1401 : « faux négatif » et n°1403 : « faux positif ») lors de leur retranscription sur le formulaire de saisie. Par conséquent, le bilan final est de un « vrai » faux positif, soit 0,18%.

Pour les deux échantillons positifs en IgG, on n'observe aucun faux négatif avec l'échantillon 1505-1506 (tableau XVII) et seulement deux faux négatifs avec l'échantillon 1403-1404-1407-1408 (tableau XVI). L'un d'eux est dû à une inversion des résultats des deux échantillons testés par le LBM (cf paragraphe précédent) et l'autre est dû à une erreur de sélection de n° de flacon lors de la saisie des résultats. C'est pourquoi, on peut conclure à une absence de faux négatif pour cette opération de contrôle.

Par ailleurs, l'étude des titres obtenus pour les deux échantillons « IgG positifs » montre une dispersion importante des résultats avec les réactifs immunoenzymatiques (tableaux XVI, XVII et XVIII). Comme pour les opérations de contrôle précédentes, on note que les titres les plus faibles sont rendus par les automates Architect ou AxSYM de la société ABBOTT, tandis que les titres les plus élevés sont rendus par les automates Cobas Core ou Elecsys/Modular de chez ROCHE. Les titres en IgG sont exprimés en UI/mL, ce qui suggère une standardisation des valeurs observées alors que ce n'est pas le cas. Cette donnée doit être prise en compte lorsque l'on veut comparer les titres en IgG de sérums successifs. L'interprétation de la cinétique des anticorps ne sera possible que si les titrages sont réalisés avec le même réactif.

2 - IgM anti-toxoplasme

En ce qui concerne la détection des IgM anti-toxoplasme, aucun des trois pools de plasmas utilisés pour la préparation des échantillons de cette opération de contrôle ne contenait d'IgM anti-*Toxoplasma gondii*. Si l'on considère de façon globale les résultats des 2169 tests réalisés par l'ensemble des 985 laboratoires qui ont effectué la recherche des IgM anti-toxoplasme, on note une (0,05%) conclusion incorrecte « positif » et deux conclusions « limite » (tableau XX).

3 - Interprétation du profil sérologique et suivi sérologique et/ou examen complémentaire à réaliser sur l'échantillon en fonction du cas clinique

Le pourcentage de laboratoires ayant apporté une conclusion globale à partir des résultats obtenus en IgG et en IgM anti-toxoplasme et du cas clinique « prélèvement d'une patiente à deux mois de grossesse pour la détermination de son statut sérologique en l'absence d'antériorité (toxoplasmose dépistage - sérodiagnostic initial) » est de 99,4%.

Sur les 469 laboratoires ayant trouvé l'échantillon 1401-1402 « IgG et IgM négatifs », on note que tous ont mentionné l'absence d'immunité. Les conclusions des participants se répartissent de la façon suivante (tableau XXII) :

- 56,6% ont rendu la conclusion attendue : TOX A + TOX F + TOX K, c'est-à-dire « Absence d'anticorps. Absence d'immunité » + « Sérologie à renouveler tous les mois jusqu'à l'accouchement et un mois après » + « suivre les mesures hygiéno-diététiques de prophylaxie ».
- 33% ont rendu une conclusion très proche, également considérée comme exacte : « Absence d'anticorps. Absence d'immunité » + « Sérologie à renouveler tous les mois jusqu'à l'accouchement et un mois après » (TOX A + TOX F).
- 1,1% ont rendu une conclusion acceptable : « Absence d'anticorps. Absence d'immunité » + « Sérologie à contrôler dans 3 semaines » (TOX A + TOX H).
- 8,7% ont rendu une interprétation correcte mais incomplète (TOX A), soit cinq fois plus qu'en 2012.

Pour les deux échantillons « IgG positif et IgM négatif », la conclusion attendue était : « Immunité ancienne probable » + « sérologie à contrôler dans 3 semaines » (TOX C + TOX H) ou bien « Immunité ancienne probable » + « à confirmer par une nouvelle sérologie » (TOX C + TOX I). En effet, en l'absence d'antériorité lors de la grossesse, il convient de contrôler la sérologie sur un second sérum prélevé à 3 semaines d'intervalle (1). On ne conclura à une infection ancienne que si le titre des IgG est stable entre les deux sérums.

La conclusion attendue a été rendue par 82,5% et 81,4% des LBM ayant respectivement testé l'échantillon 1405-1406 et l'échantillon 1403-1404-1407-1408. De plus, le statut d'immunité ancienne (TOX C), hautement probable dans le cas d'un échantillon « IgG positif et IgM négatif », est signalé par 12,4% à 11,4% des laboratoires selon l'échantillon considéré (tableau XXIII). Enfin, la conclusion TOX C + TOX M « Immunité ancienne probable » + « réaliser une mesure de l'avidité sur ce prélèvement » a été choisie par une trentaine de participants (en majorité, ceux ayant testé l'échantillon 1403-1404-1407-1408, fortement positif en IgG). L'avidité des IgG étant un bon moyen d'éliminer une toxoplasmose récente, cette conclusion n'est pas fautive mais en l'absence d'IgM, elle ne correspond pas à la conclusion attendue.

Bibliographie

(1) O. VILLARD et coll., Sérodiagnostic de la toxoplasmose en 2010 : conduite à tenir et interprétation en fonction des profils sérologiques obtenus par les méthodes de dépistage. Feuillet de Biologie, 2011, 298 : 43-49.

Enquête : recensement des cas de paludisme en France métropolitaine au cours de l'année 2013.

Une enquête rétrospective portant sur le recensement des cas de paludisme survenus en France au cours de l'année 2013 a été réalisée en collaboration avec le CNR du paludisme auprès de l'ensemble des LBM inscrits à l'opération de CNQ en parasitologie 14PAR1.

En France métropolitaine, le paludisme ne fait pas partie des maladies à déclaration obligatoire. Par conséquent, le CNR se base sur les données fournies par un réseau de 82 LBM hospitaliers « correspondants » pour estimer, entre autres informations, le nombre de cas annuels de paludisme.

L'objectif de cette enquête était d'obtenir des données exhaustives qui permettent au CNR de suivre l'évolution du paludisme d'importation et de mesurer le niveau d'exhaustivité et la représentativité de son réseau de LBM correspondants, afin de valider ses estimations annuelles.

Le questionnaire de l'enquête comportait cinq items :

- nombre total de demandes de recherche de paludisme traitées pendant la période du 01/01/2013 au 31/12/2013,
- nombre de patients concernés par ces demandes,
- nombre de cas de paludisme diagnostiqués par diagnostic direct (doublons exclus) pendant la même période (un cas correspond à un patient ayant présenté une parasitémie vérifiée au microscope ou par détection d'antigène),
- répartition des cas positifs par espèce (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae*, *Plasmodium sp.*, infections mixtes),
- techniques utilisées au laboratoire (frottis sanguin, goutte épaisse, détection d'antigène, biologie moléculaire, autre).

Ce questionnaire était accessible uniquement par voie électronique sur le site de l'ANSM pendant toute la durée de l'opération de contrôle 14PAR1, c'est-à-dire du 24/09/2014 au 20/10/2014.

Les données ont été transmises, sous la forme d'un fichier Excel, au CNR qui a vérifié la cohérence des réponses de chaque LBM. En cas de discordance, les laboratoires concernés ont été contactés pour vérification et correction des erreurs.

Résultats

L'ensemble des 1242 LBM inscrits au CNQ 14PAR1 a été sollicité. Mais au final, seuls 1131 ont été inclus dans l'analyse (exclusion des LBM qui ne réalisent pas le diagnostic du paludisme et des LBM localisés hors métropole). Parmi eux, 31% sont des LBM hospitaliers et 69% sont des LBM de ville.

En ce qui concerne la première question de l'enquête, à savoir le nombre de demandes de recherche de paludisme en 2013, on note un total de 51 102 demandes, également réparties entre LBM hospitaliers (25 416) et LBM privés (25 686).

Le nombre de cas de paludisme diagnostiqués transmis par l'ensemble des LBM répondants est de 4183. Un peu plus des deux tiers (69,7%) des cas sont transmis par les LBM hospitaliers. Toutefois, pour s'approcher au plus près du nombre « N » de cas de paludisme d'importation diagnostiqués pour la France métropolitaine en 2013, il a été décidé de prendre en compte :

- les doublons générés par les transferts des patients de la ville vers l'hôpital,
- les doublons générés par les transferts inter hospitaliers,
- les cas de paludisme non déclarés par les LBM qui réalisent ce diagnostic (c'est-à-dire qui ont répondu à la partie « recherche de parasite sur frottis sanguin » du CNQ 14PAR1 de l'ANSM, mais pas à la partie « enquête du CNR »).

Le mode de calcul de N est détaillé dans le tableau ci-dessous :

$N = (N1-T1) + (N1'-T1')$ <p>avec $T1 = tvh \cdot NV + thh \cdot NH$; $T1' = tvh \cdot NH' + thh \cdot NH$ et $N1 = NV + NH$; $N1' = NV' + NH'$</p>
<p>N1 = 4183 : nombre de cas de paludisme transmis par l'ensemble des LBM de France métropolitaine répondants à l'enquête.</p> <p>N1' = 242 : nombre de cas de paludisme estimé pour l'ensemble des LBM de France métropolitaine non répondants à l'enquête.</p> <p>NH = 2917 : nombre de cas de paludisme transmis par les LBM hospitaliers de France métropolitaine répondants à l'enquête.</p> <p>NV = 1266 : nombre de cas de paludisme transmis par les LBM de ville de France métropolitaine répondants à l'enquête.</p> <p>NH' = 198 : nombre de cas de paludisme estimé pour les LBM hospitaliers de France métropolitaine non répondants à l'enquête. L'estimation pour chaque LBM hospitalier non répondant à l'enquête correspondant à la médiane des cas diagnostiqués pour les LBM hospitaliers répondant à l'enquête.</p> <p>NV' = 44 : nombre de cas de paludisme estimé pour les LBM privés (de ville) de France métropolitaine non répondants à l'enquête du CNR du paludisme. L'estimation pour chaque LBM privé (de ville) non répondant à l'enquête correspond à la médiane des cas diagnostiqués par les LBM privés répondant à l'enquête, par région de localisation.</p> <p>T1 = 281 : nombre estimé de cas transférés pour les laboratoires répondants à l'enquête (doublons ville vers hôpital ou hôpital vers hôpital).</p> <p>T1' = 14 : nombre estimé de cas transférés pour les laboratoires non répondants à l'enquête, (doublons ville vers hôpital ou hôpital vers hôpital).</p> <p>tvh = 0,13 : pourcentage de cas de paludisme avec un diagnostic positif transférés de la ville vers l'hôpital (doublons transferts ville/hôpital). Il est calculé à partir des données du réseau du CNR du paludisme en utilisant la moyenne des transferts de la ville vers l'hôpital des trois dernières années.</p> <p>thh = 0,04 : pourcentage de cas de paludisme avec un diagnostic positif transférés de l'hôpital vers l'hôpital (doublons transferts inter hospitaliers). Il est calculé à partir des données du réseau du CNR du paludisme en utilisant la moyenne des transferts inter hospitaliers des trois dernières années.</p>

Le calcul de N selon la formule donnée ci-dessus conduit à 4130 cas de paludisme d'importation diagnostiqués pour la France métropolitaine en 2013. Pour la même année, le nombre de cas déclarés au CNR par le réseau de LBM correspondants était de 2129. Par conséquent, la représentativité du réseau est de 51,5%.

La répartition régionale des cas diagnostiqués à l'hôpital et en ville est détaillée respectivement dans les tableaux XXIV et XXV.

En ce qui concerne les LBM hospitaliers, on note que la médiane des cas diagnostiqués est de 3. Toutefois, la région Ile de France se distingue avec une médiane à 21. Quant aux LBM de ville, les trois quarts ont diagnostiqué au maximum 2 cas.

tableau XXIV - répartition régionale des cas de paludisme diagnostiqués à l'hôpital en France métropolitaine en 2013

Région	Nb LBM hospitalier	Moy *	ET **	min	max	p50 ***	p25	p75
Aquitaine-Poitou-Charentes-Limousin	27	5,9	8,6	0	29	2	0	11
Auvergne-Rhône-Alpes	30	7,2	18,5	0	100	2	1	5
Bourgogne-Franche-Comté	20	3	3,8	0	13	2	1	4
Bretagne	14	5,1	8,6	0	33	2	1	5
Centre	10	7,2	9,9	0	34	4,5	1	8
Champagne Ardennes-Lorraine-Alsace	25	3,6	6,9	0	25	1	0	3
Corse	2	1	1,4	0	2	1	0	2
Ile de France	48	28,9	30,8	0	137	21	5	42
Midi-Pyrénées-Languedoc-Roussillon	25	10,3	24,4	0	118	3	0	7
Nord-Pas-de-Calais-Picardie	29	4,2	8	0	32	1	0	4
Normandie-Basse-Normandie Haute	14	5,1	9,3	0	35	2	0	6
PACA	21	6,4	10,2	0	45	3	2	5
Pays de Loire	11	12,9	17,7	0	60	6	2	15
Total	276	10,1	19,5	0	137	3	1	8

Moy * : moyenne, ET ** : écart-type, p50 *** : percentile 50 = médiane

tableau XXV - répartition régionale des cas de paludisme diagnostiqués en ville en France métropolitaine en 2013

Région	Nb LBM de ville	Moy *	ET **	min	max	p50 ***	p25	p75
Aquitaine-Poitou-Charentes-Limousin	51	1,2	2	0	11	1	0	2
Auvergne-Rhône-Alpes	77	0,7	1,5	0	7	0	0	1
Bourgogne-Franche-Comté	30	0,8	1,4	0	7	0	0	1
Bretagne	36	0,7	1	0	4	0	0	1
Centre	18	1,6	2,4	0	8	0	0	2
Champagne Ardennes-Lorraine-Alsace	49	1,3	2,4	0	8	0	0	1
Corse	4	1,3	1,3	0	3	1	1	2
Ile de France	148	4,6	11,3	0	88	1	0	4
Midi-Pyrénées-Languedoc-Roussillon	53	1,5	2,6	0	12	0	0	2
Nord-Pas-de-Calais-Picardie	55	0,7	2,2	0	15	0	0	1
Normandie-Basse-Normandie Haute	42	0,5	0,8	0	3	0	0	1
PACA	60	2,3	12,9	0	100	0	0	1
Pays de Loire	30	1,3	2,2	0	9	1	0	2
Total	653	1,9	7	0	100	0	0	2

Moy * : moyenne, ET ** : écart-type, p50 *** : percentile 50 = médiane

En ce qui concerne la répartition des espèces plasmodiales identifiées en 2013, on note que la proportion de *P. falciparum* reste remarquablement constante et élevée par rapport aux enquêtes précédentes (tableau XXVI). Pour les autres espèces, les variations sont fonction des fluctuations géographiques des pays de contamination présumés.

tableau XXVI - répartition des espèces plasmodiales (%) - comparaison avec les années 2004, 1999 et 1997

Espèces	2013	2004	1999	1997
<i>P. falciparum</i>	85,0	82,6	84,1	82,4
<i>P. vivax</i>	5,7	5,5	7,0	8,6
<i>P. ovale</i>	5,0	5,9	5,5	5,9
<i>P. malariae</i>	2,3	2,4	1,4	2,0
Infection mixte	1,0	1,2	0,7	0,3
<i>Plasmodium sp.</i>	1,0	2,4	2,0	1,1

Dans le questionnaire, seuls 758 LBM ont précisé les techniques utilisées pour la recherche des hématozoaires (tableau XXVII). L'association « frottis + goutte épaisse », soit seule (comme indiquée dans la NABM), soit associée à un TDR est pratiquée par un peu plus du tiers des LBM, tandis que près de la moitié utilisent l'association « frottis + TDR », le TDR tendant à remplacer la goutte épaisse. Au total, les TDR font maintenant partie des techniques de diagnostic dans 74% des LBM, alors qu'ils n'étaient que 34% à les utiliser en 2004. Quant au frottis seul, il n'est plus pratiqué que par 15% des répondants, soit une nette diminution par rapport aux enquêtes précédentes (23% en 2004, 32% en 1999 et 37% en 1997). Enfin, quelques LBM réalisent des PCR soit systématiquement, soit occasionnellement.

tableau XXVII - techniques utilisées pour le diagnostic direct du paludisme

technique	effectif	%
F + TDR	375	49,5
F + GE + TDR	176	23,2
F seul	113	14,9
F + GE	82	10,8
Autres combinaisons dont PCR	12	1,6
total	758	100

F : frottis mince, GE : goutte épaisse, TDR : test de diagnostic rapide (antigénémie détectée par immunochromatographie), PCR : Polymérase Chain Reaction.

Bibliographie

Rapport d'activité du CNR paludisme 2014

http://www.cnrpalu-france.org/docs/rapport_activites_cnr_paludisme_2014.pdf