

Détection optimale des inhibiteurs de PCR Comparaison de témoins d'inhibition de la PCR diagnostique au CHRU de Montpellier

Emmanuelle Varlet-Marie,^{1,2} Christophe Ravel,¹ Frédéric Dalle,^{2,3} Fériel Touafek,^{2,4} Patrick Bastien^{1,2} et Yvon Sterkers,^{1,2}

¹ Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier et Université de Montpellier, Département de Parasitologie-Mycologie, Montpellier, France;

² Pôle de Biologie Moléculaire du Centre National de Référence Toxoplasmose;

³ Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Service de Parasitologie-Mycologie, Dijon;

⁴ Hôpital Pitié Salpêtrière, Service de Parasitologie-Mycologie, Paris

Introduction

La présence d'inhibiteurs associés à l'ADN extrait est un obstacle majeur à l'efficacité de la réaction d'amplification par PCR. De plus il existe une large gamme d'inhibiteurs (héparine, hémoglobine et ses dérivés,...). La détection de la présence d'inhibiteur pendant la réaction de PCR est un élément capital pour s'assurer de la fiabilité des résultats. Cette détection systématique permet d'éviter les résultats faussement négatifs et les sous-estimations de quantification. De nombreuses méthodes sont utilisées pour vérifier l'absence d'inhibition, basées généralement sur la mise en évidence d'un changement du seuil de détection (ΔC_p) par rapport à une réaction non inhibée, de l'ADN cible dans un puit supplémentaire, d'ADN exogène ou d'un gène humain.

Patients & méthodes

Etude rétrospective sur le premier quadrimestre 2015. Extraction des données par le SIL (Dxlab) et le logiciel Roche LightCycler 480 software.

Dans le cadre du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose:

(i) réalisation d'un témoin d'inhibition (TI ou T inh) constitué d'une faible quantité d'ADN du toxoplasme (équivalent à 1 génome de toxoplasme/PE) en duplicat, dans deux puits supplémentaires (contrôle interne)

(ii) Réalisation d'une PCR-albumine au titre de témoin d'extraction (T alb)

Nous affirmons la présence d'inhibiteurs lorsque les deux puits du T inh ont C_p est >38 . Pour le T alb, en absence de seuil, l'analyse réalisée est qualitative (positif/négatif).

Résultats & discussion

Description de la cohorte

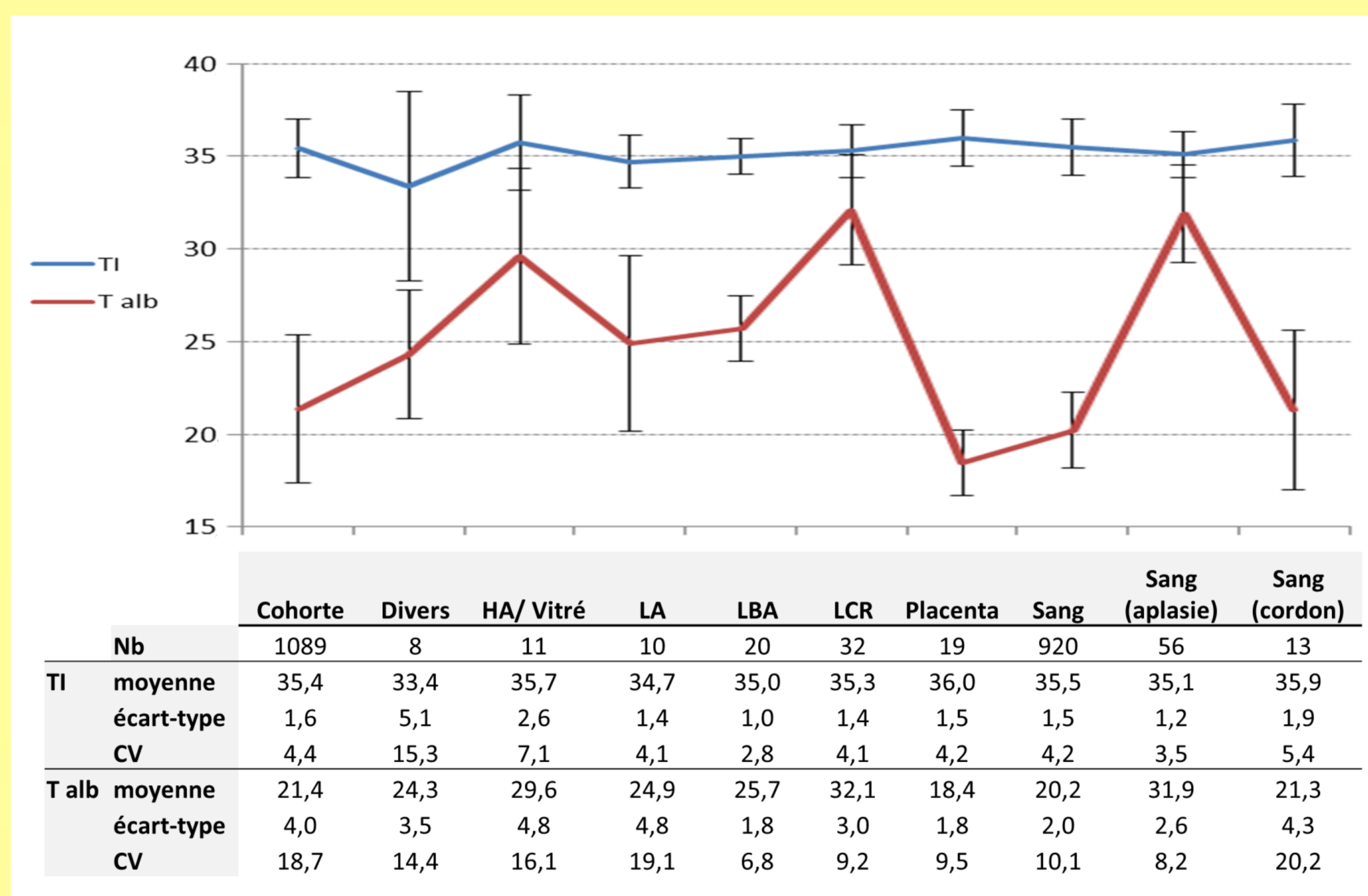


Figure 1: Caractéristique de la cohorte La cohorte est constituée par 1089 échantillons de natures variées correspondant à la diversité du diagnostic moléculaire de la toxoplasmose. Moyenne, écart-type et coefficient de variation ont été calculés pour la cohorte et les différents types d'échantillons, pour le TI et le T alb.

Pour le TI, la moyenne calculée est similaire pour l'intégralité de la cohorte et pour les différents échantillons analysés. Ecart-type et CV sont faibles.

Pour le T alb, il est immédiatement visible que les résultats sont beaucoup plus hétérogènes (en fonction notamment de la cellularité des échantillons).

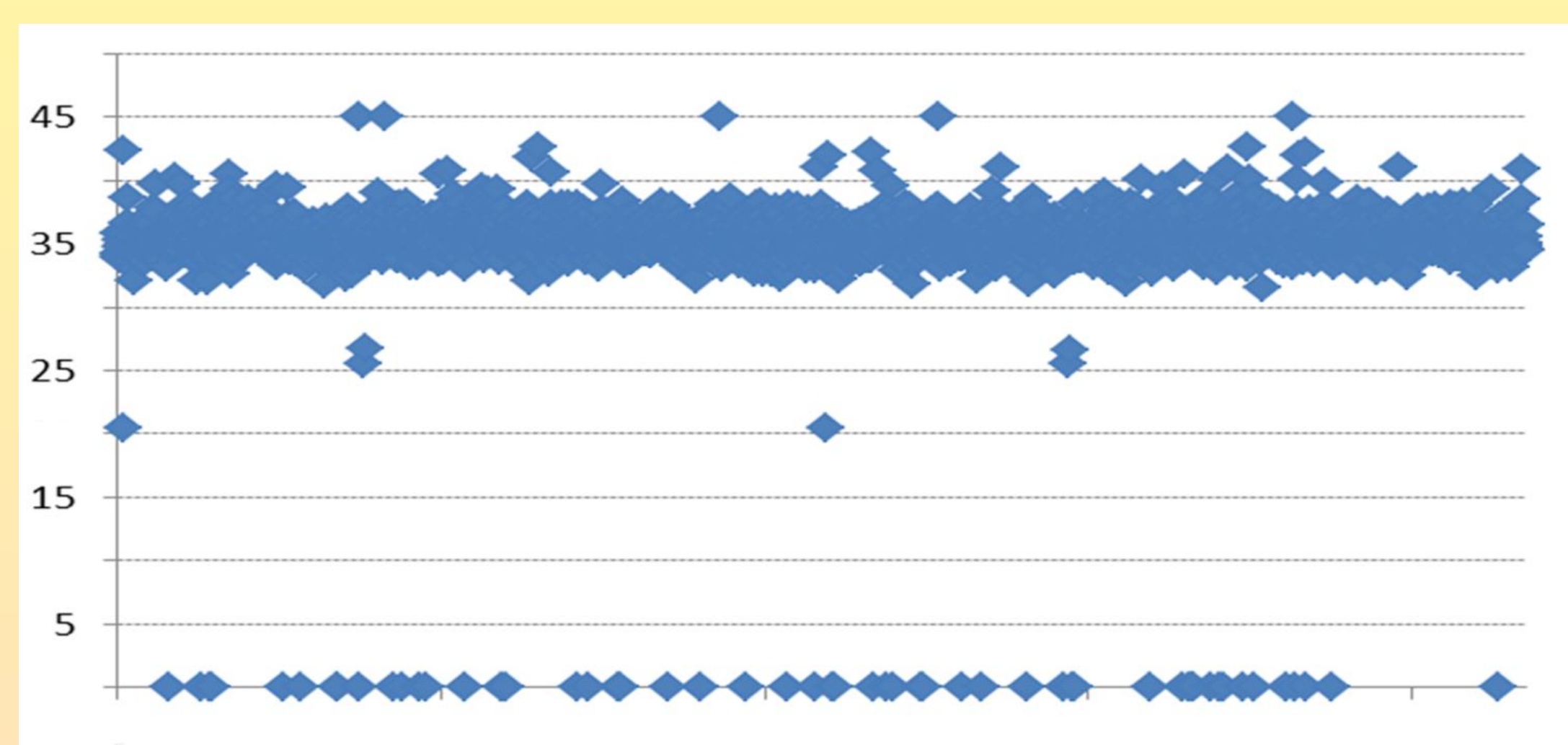


Figure 2: Représentation des Cp de TI

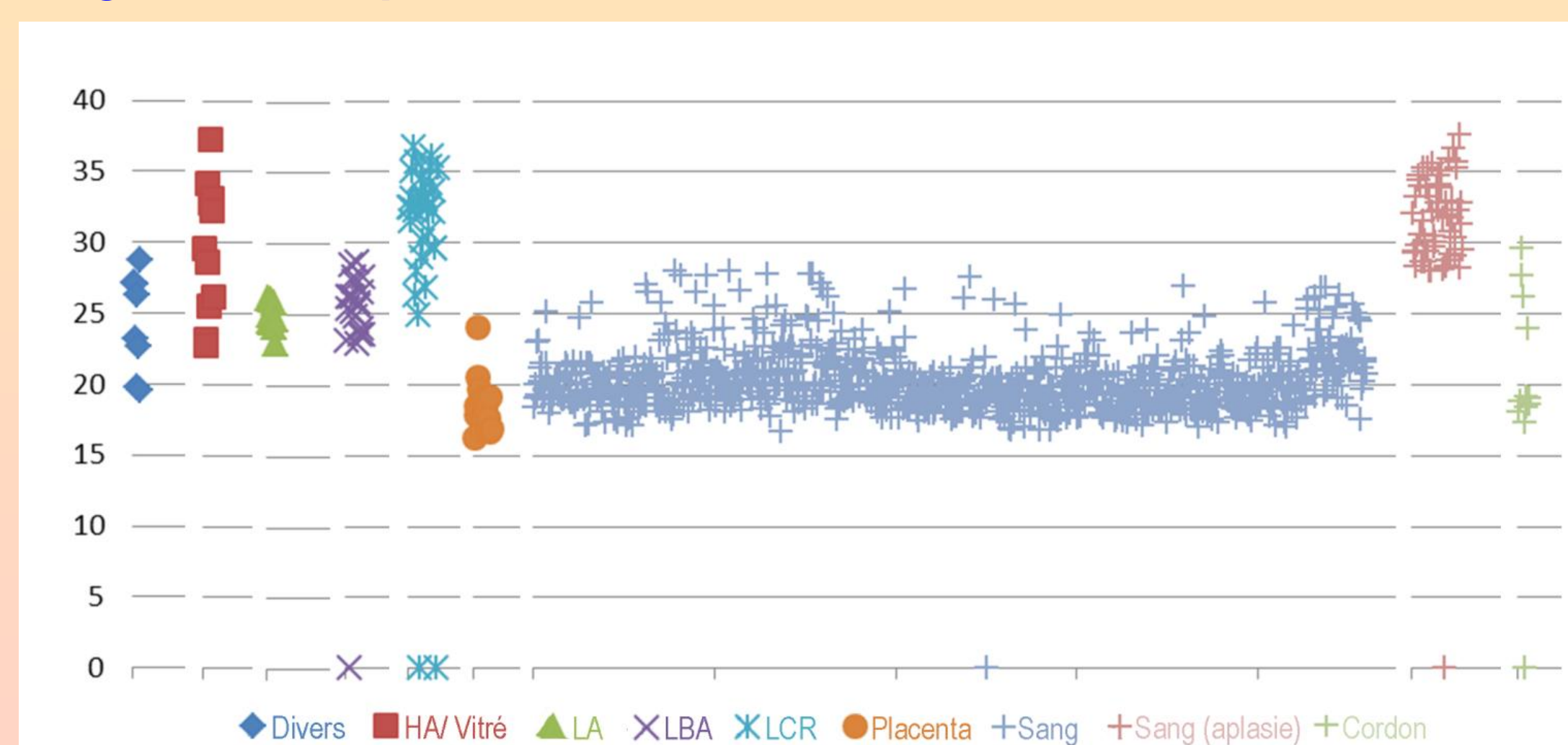


Figure 3: Représentation des Cp de T alb. Du fait de l'hétérogénéité des valeurs, les échantillons ont été ordonnés en fonction de leur nature.

Identification et caractéristiques des prélèvements inhibés

N° de travail	Nature	T inh		T alb
		CP1	CP2	CP
99150292170	Humeur aqueuse	42,4	42,0	23,2
99151220842	LCR	négatif	négatif	négatif
99150191353	Sang de cordon	41,0	40,9	17,3
99150020610	Sang veineux	40,4	40,0	17,7
99150263308	Sang veineux	négatif	38,1	19,7
99150270811	Sang veineux	38,2	négatif	20,2
99150292873	Sang veineux	négatif	négatif	négatif
99150512007	Sang veineux	38,0	38,5	16,7
99150541989	Sang veineux	négatif	39,3	28,7
99150542985	Sang veineux	40,7	38,7	17,5
99150570663	Sang veineux	38,0	39,5	19,3
99150760574	Sang veineux	39,7	42,2	18,1
99150832089	Sang veineux	38,5	45,0	17,4
99150902642	Sang veineux	négatif	39,8	23,8
99151041783	Sang veineux	négatif	38,2	20,4
99151052929	Sang veineux	38,2	38,1	18,6
99150470698	LBA	35,9	36,1	négatif
99150143160	LCR	35,8	36,0	négatif
99150711833	Sang de cordon	34,7	34,7	négatif
99151183216	Sang veineux	34,9	33,6	négatif

Tableau 1: Caractéristique des prélèvements inhibés L'analyse des T inh ($C_p > 38$) a permis d'identifier 16 échantillons inhibés. Dans 14/16 cas, le T alb est retrouvé avec un CP relativement bas, n'évoquant pas d'inhibition de cette PCR. En effet la valeur des CP de T alb est dans la moyenne des CP obtenus pour les échantillons de cette nature (Figure 1).

La recherche des échantillons où T alb est négatif permet d'identifier 4 échantillons supplémentaires, pour lesquels les valeurs des CP de T inh ne sont pas en faveur de la présence d'inhibiteurs.

	Cohorte	HA	LCR	Sang	Cordon
Inhibé	16	1	1	13	1
total	1089	10	32	920	13
%	1,5	10,0	3,1	1,4	7,7

Tableau 2: Fréquence des prélèvements inhibés en fonction de la nature des échantillons. L'étude a permis de d'identifier 16 échantillons dans lesquels la présence d'inhibiteurs était détecté par T inh.

La fréquence des inhibiteurs peut donc être estimés à 1,5%, ce qui est relativement faible. Toutefois l'étude suggère que cette fréquence est variable en fonction de la nature des échantillons. Ainsi, même si les effectifs sont faibles, les données suggèrent une fréquence plus importante pour le sang du cordon, l'humeur aqueuse et dans une moindre mesure le LCR.

Conclusions

En conclusion, ce travail confirme qu'un inhibiteur peut inhiber spécifiquement une PCR et n'avoir que peu ou pas d'effet sur une autre PCR. Nous avons également réalisé cette observation dans le cadre du diagnostic moléculaire de la pneumocystose.

Ainsi, avec la PCR-albumine dans le cadre du diagnostic moléculaire de routine, nous montrons que la réalisation d'une PCR ciblant un gène humain n'est pas un bon témoin d'inhibition pour la recherche moléculaire d'un microorganisme.

Remerciements

Nous remercions, les techniciens:
Sylvie Douzou,
Ghyslaine Serres
et Bounleth Sanichanh.