

Diversité des pratiques et des méthodes de la PCR-*Toxoplasma* en France entre 2008 et 2015 Bilan des enquêtes du Contrôle Qualité national PCR *Toxoplasma*

Guillaume Roux,^{1,2} Emmanuelle Varlet-Marie,^{3,4} Patrick Bastien^{1,3,4} et Yvon Sterkers,^{1,3,4}
pour le Pôle "Biologie Moléculaire" du Centre National de Référence de la Toxoplasmose[#]

1 MIVEGEC UMR CNRS5290 IRD224 UM, Montpellier, France ; 2 Centre Hospitalier Universitaire Nîmes, Laboratoire de Microbiologie ; 3 Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Département de Parasitologie-Mycologie; 4 Pôle "Biologie Moléculaire" du Centre National de Référence de la Toxoplasmose

Introduction

La biologie moléculaire a une place capitale dans le diagnostic de la toxoplasmose, en particulier dans ses formes sévères (toxoplasmose congénitale, toxoplasmose de l'immunodéprimé). Les performances analytiques requises pour le diagnostic moléculaire sont élevées et nécessitent par conséquent une grande connaissance et maîtrise des techniques de PCR. Des enquêtes annuelles ont donc été réalisées afin de suivre les évolutions des pratiques notamment pour le diagnostic anténatal.

Méthode

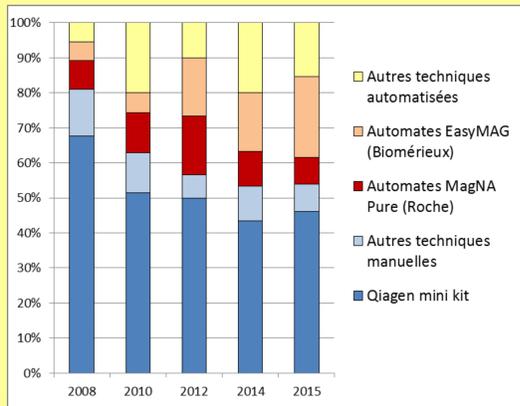
Etude rétrospective des pratiques et méthodes utilisées pour la PCR-*Toxoplasma* par les laboratoires participants au Contrôle de Qualité National en PCR toxoplasmose : analyse des réponses aux questionnaires de 2008 à 2015.

Résultats & discussion

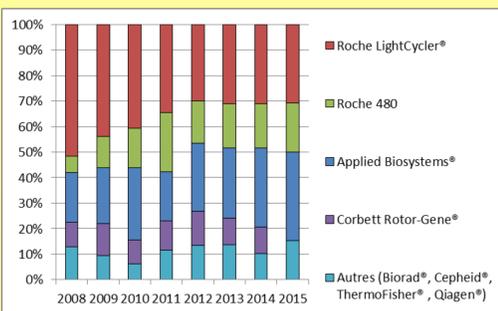
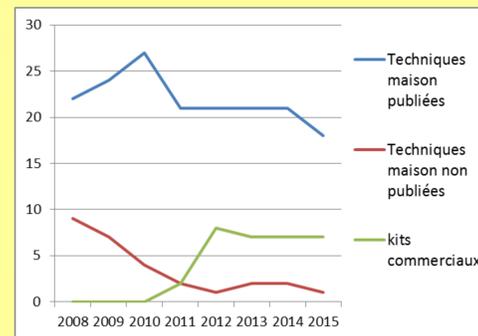
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
laboratoires répondants	29	28	28	24	29	29	30	26
techniques présentées	37	36	35	27	30	29	30	26
laboratoires ayant plusieurs techniques de PCR	8	8	7	3	1	0	0	0
laboratoires effectuant le diagnostic anténatal	21	19	19	17	21	21	21	20
accréditation de la PCR toxoplasmose	-	-	-	-	-	-	-	1

L'effectif des laboratoires participants à l'étude des pratiques de la PCR *Toxoplasma* est resté stable au cours du temps, malgré des fluctuations de participation en 2011 et 2015. La PCR *Toxoplasma* semble donc pour le moment réservée à des laboratoires spécialisés, en particulier en cas de diagnostic prénatal. Il est à noter une baisse du nombre de laboratoires ayant plusieurs techniques, ceci s'expliquant par l'abandon entre 2008 et 2013 des techniques les moins robustes.

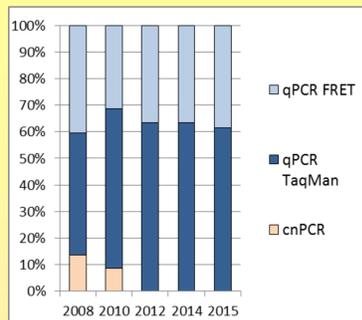
La répartition des méthodes d'extraction a évolué depuis 2008, avec l'essor des méthodes automatisées, passant d'une proportion de 19% à 53% au sein des laboratoires. Cette automatisation pourrait s'expliquer par la volonté de réduire les coûts de main d'œuvre et/ou de mutualiser les outils de biologie moléculaire dans les établissements publics.



Les techniques d'amplifications utilisées par les laboratoires ont évolué en 2 étapes : (i) passage de techniques "maison" non publiées à des techniques décrites dans la littérature de 2008 à 2010; (ii) émergence à partir de 2011 de kits commerciaux. Depuis 2012, les PCR ciblant la séquence rep529 ont progressivement remplacé celles ciblant le gène B1. En 2015, un seul laboratoire déclarait utiliser une qPCR B1 associée à une qPCR rep529. A noter que la cible rDNA est utilisée également par un centre depuis 2008.

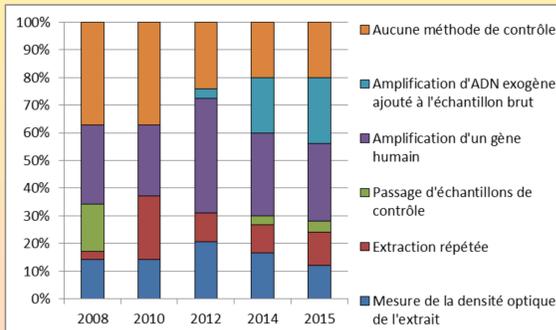


La répartition des modèles de thermocycleurs en temps réel montre une régression de l'usage des LightCycler® 1 et 2. Elle traduit une baisse de l'utilisation de thermocycleurs à air pulsé au profit de ceux disposant de blocs chauffants. Ce changement ne semble pas avoir d'impact sur la qualité des résultats.

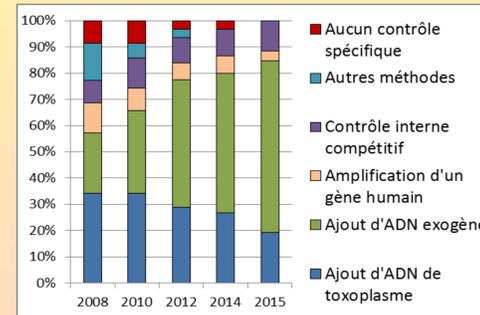


La répartition des principes de révélation de la PCR confirme l'abandon des cnPCR au profit de la qPCR TaqMan®. La proportion de laboratoires utilisant des sondes FRET est restée globalement stable. Ces évolutions s'expliquent (i) par le succès d'un kit commercial à sonde TaqMan® et (ii) par la robustesse des résultats obtenus dans les laboratoires utilisant des sondes FRET.

Le contrôle de l'extraction n'est pas systématiquement réalisé, mais on observe une amélioration des pratiques par rapport à 2008 où 13 laboratoires déclaraient ne pas utiliser de méthode de contrôle d'extraction contre 5 en 2015. On remarque également une grande diversité dans les principes des techniques employées. Enfin, l'usage d'ADN exogène s'est popularisé avec les kits commerciaux de contrôle.



Les méthodes de détection d'inhibiteurs de PCR sont utilisées en 2015 par l'ensemble des laboratoires répondants, ce qui constitue un net progrès par rapport à 2008. L'ajout d'ADN exogène est devenu l'approche la plus fréquemment employée, bien que sa supériorité par rapport aux autres techniques ne soit pas prouvée.



Conclusions

Les pratiques de la PCR *Toxoplasma* ont beaucoup évolué depuis 2008. Ces changements sont marqués par l'automatisation des extractions et l'usage de kits et contrôles commerciaux. Toutefois, la diversité des pratiques demeure très importante et rien ne suggère qu'elle tende à se réduire. L'attention doit donc être portée sur les performances des différentes méthodes, ce qui confirme l'intérêt de l'évaluation régulière des laboratoires au cours du Contrôle Qualité National.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'ensemble des participants aux Contrôles de Qualité Nationaux en PCR-*Toxoplasma* pour le temps consacré à remplir ces questionnaires.

Références

- Costa JM, Ernault P, Gautier E, Bretagne S. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Prenat Diagn.* 2001; 21(2):85-8.
- Sterkers Y, Varlet-Marie E, Marty P, Bastien P, ANOFEL Toxoplasma-PCR Quality Control Group. Diversity and evolution of methods and practices for the molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis in France: a 4-year survey. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(10):1594-602.
- Yera H, Filisetti D, Bastien P, Ancelle T, Thulliez P, Delhaes L. Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid. *J Clin Microbiol.* 2009 Dec;47(12):3881-6.
- Sterkers Y, Varlet-Marie E, Bastien P, pour le pôle Biologie Moléculaire du CNR de la Toxoplasmose. PCR toxoplasmose en diagnostic prénatal – Recommandations techniques. Juin 2014. <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr>
- Filisetti D, Sterkers Y, Brenier-Pinchart M-P, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, et al. Multicentric comparative assessment of the Bio-evolution *Toxoplasma gondii* detection kit with eight laboratory-developed PCR assays for molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(1):29-34.