

Exactitude de la quantification par la PCR-*Toxoplasma* dans le liquide amniotique: résultats de 25 laboratoires français participant au Contrôle de Qualité National

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 Université de Montpellier, UMR "MiVEGEC" CNRS 5290 / IRD 224 / UM ; ² Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes, Laboratoire de Microbiologie ; ³ Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Département de Parasitologie-Mycologie; ⁴ Pôle "Biologie Moléculaire" du Centre National de Référence de la Toxoplasmose

Introduction

La PCR a grandement amélioré la sensibilité et la faisabilité du diagnostic précoce des toxoplasmoses congénitales. L'utilisation de la PCR en temps réel donne la possibilité de quantifier les charges parasitaires, ce qui, selon des études précédentes (1,2), devrait permettre de prédire le pronostic. Les données dans la littérature concernant la corrélation entre charge parasitaire dans le liquide amniotique et gravité de la toxoplasmose congénitale sont rares, anciennes et discordantes (1,2). Les travaux de Costa et al. ont observé une tendance à l'association entre fortes charges parasitaires et anomalies fœtales à l'échographies, mais ces anomalies étaient principalement liées à la précocité de la contamination maternelle (1). Romand et al. ont démontré que lors de séroconversions maternelle avant 20 semaines d'aménorrhées, des charges parasitaires plus élevées étaient associées à une atteinte fœtale sévère (2). Une corrélation entre charge parasitaire et pronostic de la "toxoplasmose-maladie" chez l'immunodéprimé est également une question d'importance croissante et non résolue. Ainsi, en plus de la sensibilité et de la spécificité, l'exactitude de la quantification doit être évaluée. Nous avons donc étudié ici l'exactitude de la quantification des laboratoires participants au Contrôle de Qualité National.

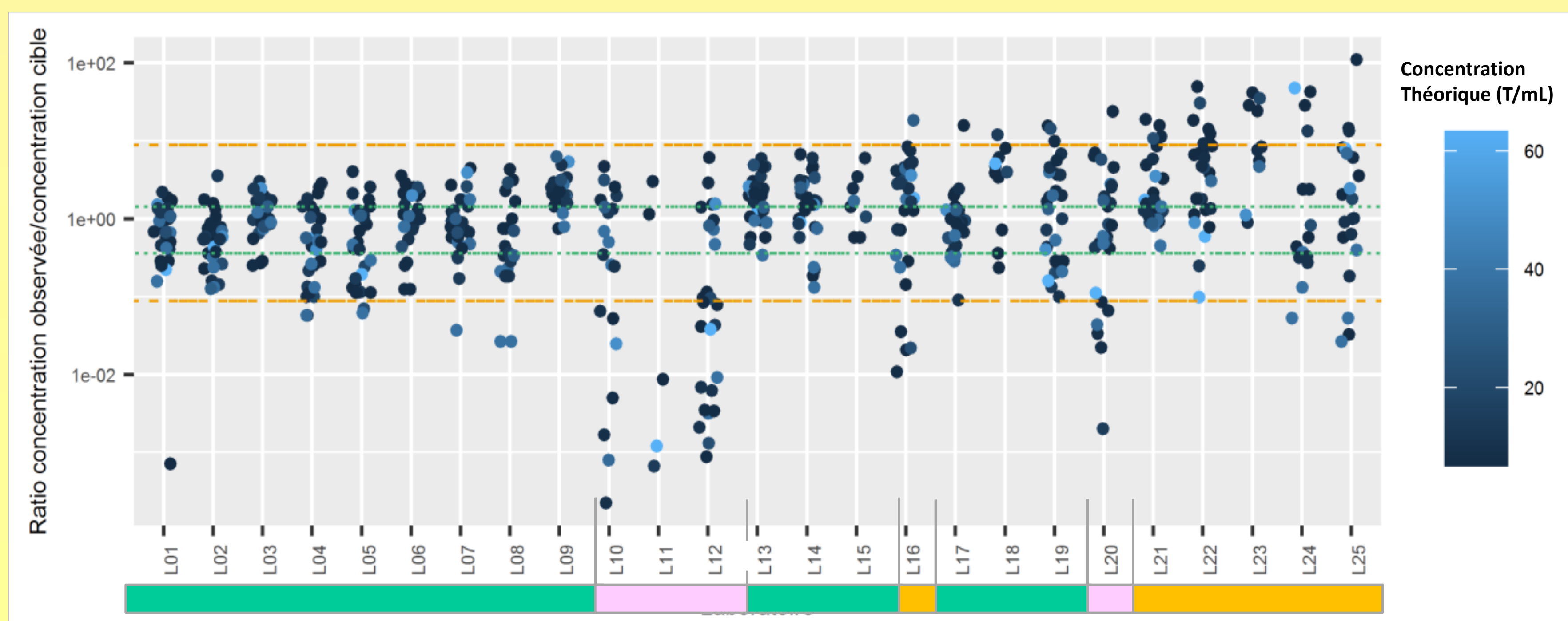
Matériel & Méthodes

En dépit du fait que le Contrôle de Qualité National se veut purement qualitatif et sans que cela soit sanctionnant pour les participants, nous collectons les résultats de quantification en toxoplasmes/mL (T/mL) adressés par les laboratoires participants. Nous avons analysé rétrospectivement 596 quantifications de charges parasitaires sur des liquides amniotiques négatifs artificiellement contaminés par des toxoplasmes lyophilisés pour des valeurs de concentrations allant de 7 à 63 T/mL. Cette étude a porté sur les quantifications rendues par 30 laboratoires hospitaliers français de 2010 à 2016. Les valeurs de référence ont été obtenues en utilisant la gamme standard de Montpellier (3) et les estimations fournies par les laboratoires de Montpellier et de Reims.

Résultats & discussion

Dispersion de la quantification par laboratoire

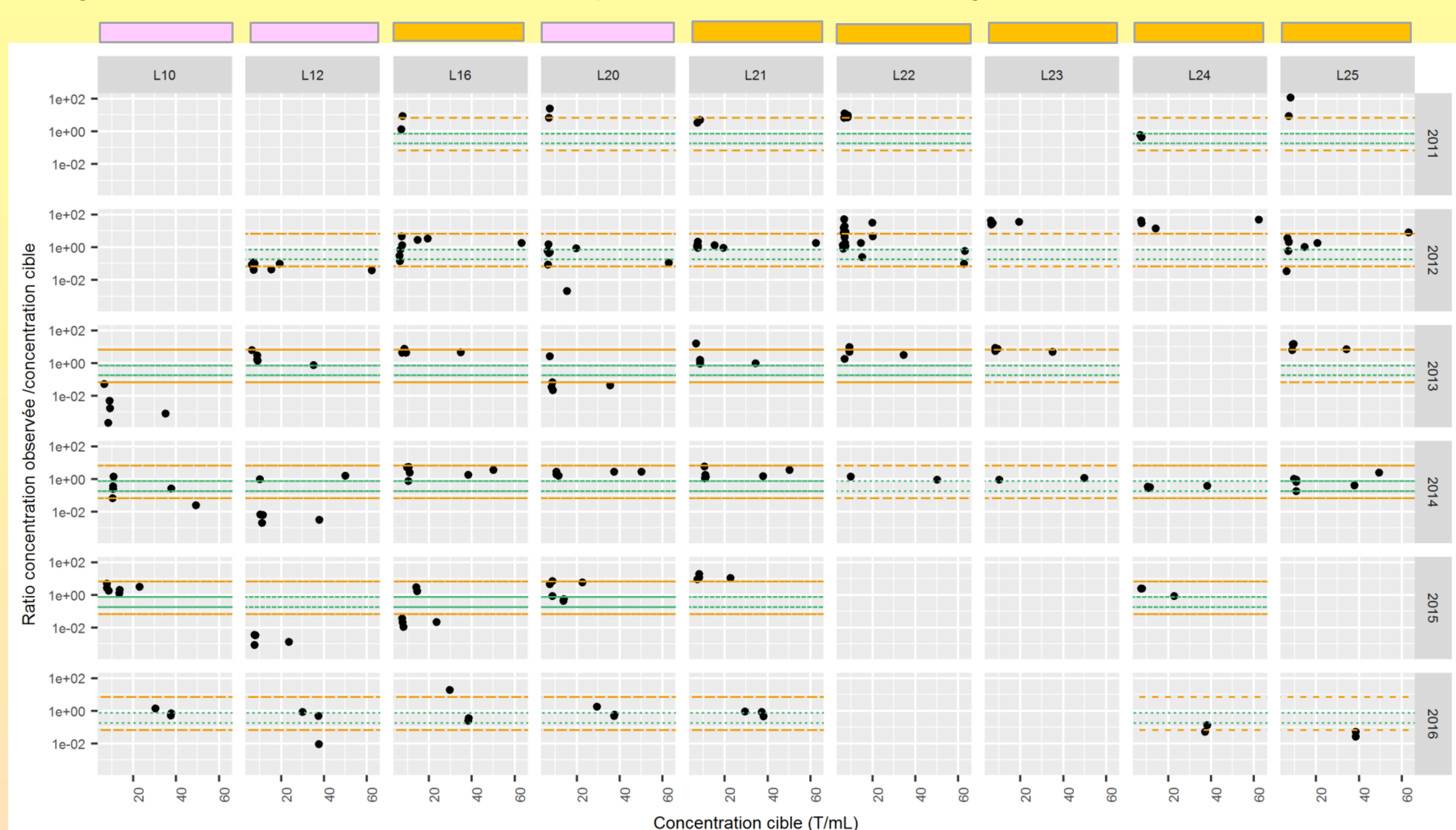
Aucun des 25 laboratoires participants n'a rendu toutes ses quantifications dans un intervalle de facteur 2. Trois profils de quantifications peuvent être distingués selon les laboratoires : quantifications majoritairement dans un intervalle de facteur 10 (barres vertes; N= 15); tendance à la sous-estimation (barre roses; N=4); résultats dispersés et/ou surestimation (barres orange; N=6). Au sein du profil orange, chaque laboratoire présente des caractéristiques particulières. Cette dispersion de la quantification justifie à elle-seule de ne pas rendre de résultat quantitatif dans un liquide amniotique en pratique de routine.



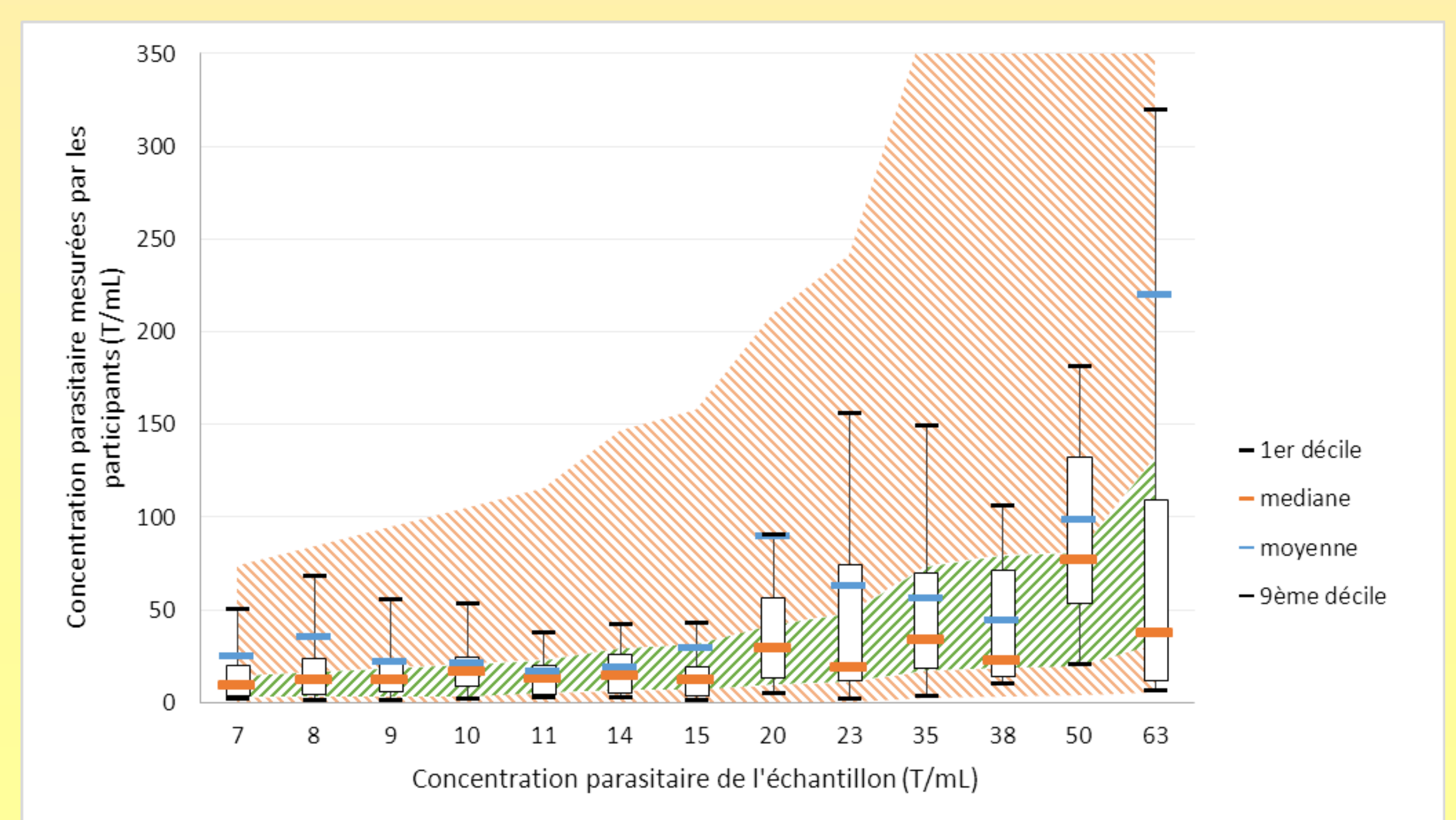
Légende: Chaque point représente une quantification rendue par un laboratoire. Les laboratoires sont ordonnés en fonction de l'écart-type du ratio concentration observée sur concentration cible. Les pointillés verts et oranges correspondent à l'intervalle de la concentration cible multipliée ou divisée respectivement par 2 et 10.

Evolution de la justesse de quantification au cours des années

La justesse de quantification peut grandement varier dans le temps pour un même laboratoire. Ainsi, certains des neuf laboratoires ayant des problèmes de justesse de quantification (barres orange et roses) sont parvenus à s'améliorer au cours des ans (ex: L10, L20). On peut observer également des baisses de performances (ex: L12). Ces différences de justesse d'une année sur l'autre pourraient s'expliquer par des changements dans la maîtrise de nombreux paramètres influençant la quantification, tels que des changements de méthode, de matériel, de personnel, ou des étalonnages.

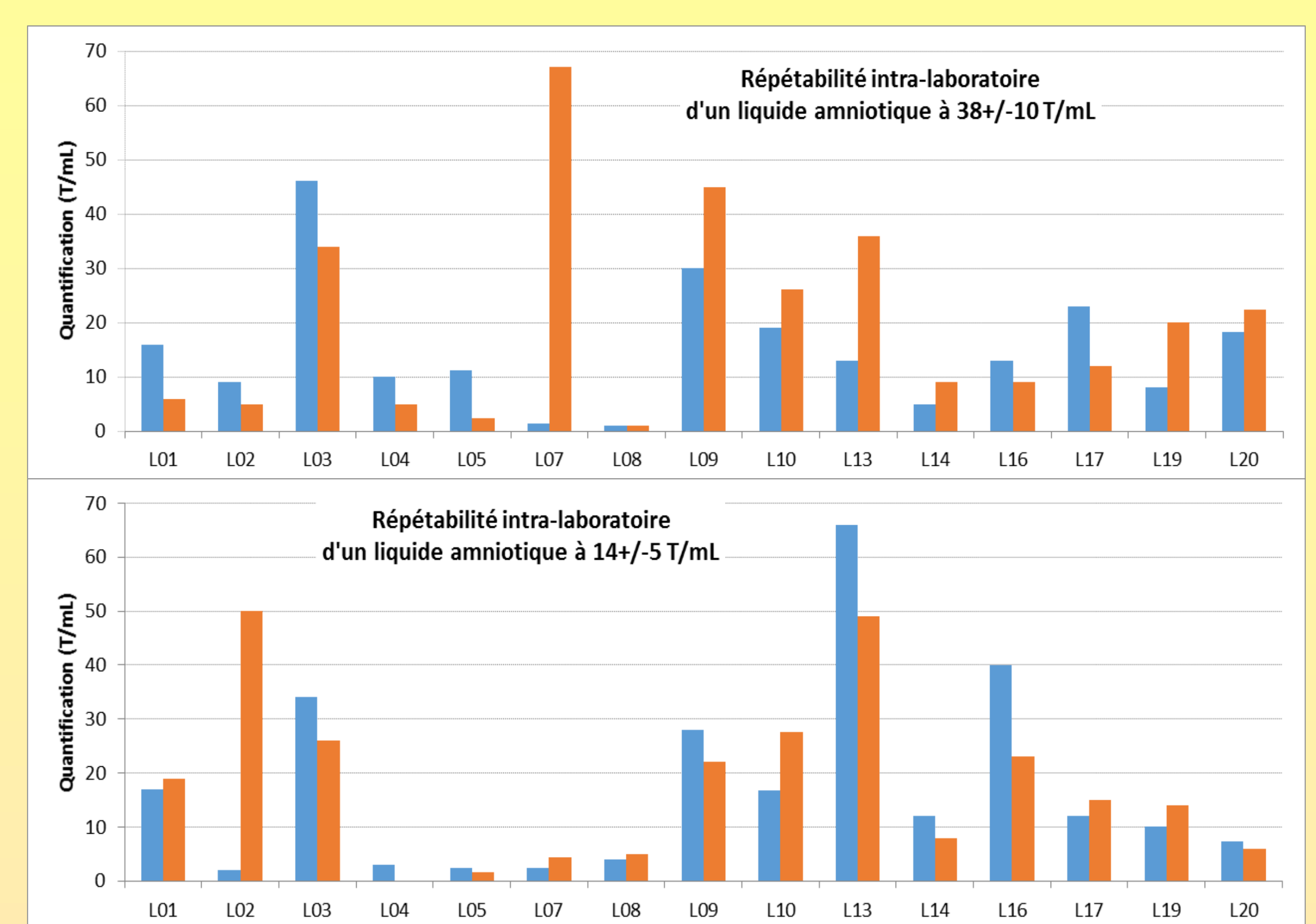


Evolution au cours des ans par concentration des quantifications des neuf laboratoires classés « orange » ou « rose » dans le graphique de dispersion de la quantification par laboratoire. Même légende que supra.



Dispersion de la quantification en fonction de la concentration

La quantification médiane est très proche de la valeur cible (zone hachurée verte) pour chaque concentration, mais la dispersion est importante. La moyenne est toujours supérieure à la médiane, ce qui est due à des quantifications très élevées rendues par certains laboratoires. Pour la plupart des concentrations étudiées, au moins 80 % des quantifications sont dans l'intervalle de la concentration cible multipliée ou divisée par 10 (zones hachurées orange). Enfin, la dispersion de quantification augmente avec la concentration parasitaire du liquide amniotique. On n'observe donc pas de seuil à partir duquel les quantifications gagnent en justesse pour les concentrations parasitaires étudiées.



Répétabilité intra-laboratoire de quantification

La répétabilité est majoritairement satisfaisante. Cinq laboratoires sur les 15 analysables rendent au moins un des duplicats hors de l'intervalle de facteur 2. L'incapacité à maintenir une bonne répétabilité contribue à expliquer la dispersion de quantification et pose question sur la fidélité intermédiaire de chaque laboratoire.

Par ailleurs, on remarque que certains laboratoires rendent des quantifications très proches pour les deux concentrations cibles (14 +/- 5 T/mL et 38 +/- 10 T/mL).

Conclusion

On observe une grande dispersion des quantifications dans cette étude, et aucun laboratoire n'a quantifié tous les échantillons dans un intervalle de facteur 2. On remarque également d'importantes variations de la justesse au cours des ans, pas toujours vers l'amélioration. Enfin, la répétabilité majoritairement satisfaisante cache de grandes disparités inter et intra-laboratoire.

Ainsi l'exactitude de la quantification par la PCR-*Toxoplasma* dans le liquide amniotique ne permet pas de rendre un résultat quantitatif avec une approximation inférieure à un facteur 10. Le pôle « Biologie Moléculaire » du CNR Toxoplasmose maintient donc sa recommandation de ne pas rendre de résultat quantitatif en pratique de routine.

Remerciements

Nous tenons à remercier l'ensemble des participants aux Contrôles de Qualité Nationaux en PCR *Toxoplasma* pour leur implication. Nous remercions également les soutiens financiers de la RSI Assurance Maladie Professions Libérales - Provinces, C.A.M.P.L.P. pour l'achat du thermocycleur LightCycler 480 à Montpellier.

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.
- Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, Dumon H, Peyron F, Thulliez P, Picot S. Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Mar;190(3):797-802.
- Varlet-Marie E, Sterkers Y, Brenier-Pinchart MP, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, Filisetti D, Pelloux H, Touafek F, Yera H, Bastien P. Characterization and multicentric validation of a common standard for *Toxoplasma gondii* detection using nucleic acid amplification assays. *J Clin Microbiol.* 2014 Nov;52(11):3952-9.