

Emmanuelle Varlet-Marie^a, Marie-Pierre Brenier-Pinchart^b, Florence Robert-Gangneux^c, Isabelle Accoceberry^d, Yvon Sterkers^a, Hervé Pelloux^b, Patrick Bastien^{a*} et le Groupe de travail du Pôle Biologie Moléculaire du CNR Toxoplasmose^e

^a Département de Parasitologie-Mycologie (LPM), Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, 39 avenue Charles Flahault, 34295, Montpellier cedex 5, France.
^b Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie et Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, BP 217, 38043 Grenoble cedex, France
^c Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, 2 Avenue du Professeur Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France
^d Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Groupe Hospitalier Pellegrin, Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux cedex, France
^e Groupe de travail du Pôle Biologie Moléculaire du CNR Toxoplasmose

INTRODUCTION

La toxoplasmose, infection généralement bénigne due à un parasite ubiquitaire *Toxoplasma gondii* (Tg) peut causer des complications parfois graves chez les femmes enceintes n'ayant pas eu au contact du parasite avant leur grossesse et chez les patients souffrant d'immunodépression. En France, une trentaine de CHU réalisent ce diagnostic et les 2/3 d'entre eux utilisent des techniques de PCR "maison" (données du CNR Toxoplasmose, CNRT). Néanmoins, la démarche Qualité et l'accréditation Cofrac incitent certains laboratoires à recourir à l'utilisation de coffrets (kits) commerciaux, dont l'utilisation est en augmentation. Une des missions du pôle "Biologie Moléculaire" du CNRT consiste à inventorier les nouveaux kits diagnostiques et à évaluer leurs performances par rapport aux méthodes de références, afin de pouvoir donner un avis expert aux différents laboratoires pratiquant ce diagnostic. Dans ce cadre, nous avons évalué le coffret TibMolBiol LightMix® *Toxoplasma gondii*, au cours d'une étude multicentrique (Montpellier, Grenoble, Rennes, Bordeaux).

MATERIELS ET METHODES

Les quatre centres ont testé en triplicata la gamme standard de toxoplasmes lyophilisés du CNRT (avec et sans contrôle interne), la gamme d'ADN fournie par le kit (avec et sans contrôle interne), des échantillons de Contrôle de Qualité national en PCR-Toxoplasma (CQn) et/ou des ADN de patients préalablement extraits. Les résultats obtenus avec le coffret TibMolBiol ont été comparés à ceux obtenus avec leur technique de référence. Au total, 133 échantillons de patients ont été testés : 76 de liquide amniotique, 16 de placenta, 14 de sang de patients immunodéprimés (10 couches leucocytaires et 4 sang/EDTA), 6 d'humeur aqueuse, 7 LCR, 8 LBA, 1 liquide de ponction ganglionnaire, 5 biopsies, ce qui représente au total 60 échantillons rendus négatifs et 73 rendus positifs lors du rendu aux cliniciens.

Les acides nucléiques de chaque échantillon ont été extraits par les méthodes de chacun des centres : coffret Qiagen® DNA minikit (Grenoble et Rennes), Magnapure Compact Roche® (Bordeaux), Tween-Noninet-NaOH (TNN) pour les liquides amniotiques et plasmas [1] et technique de précipitation des protéines Promega® pour les autres échantillons (Montpellier). Les PCR en temps réel utilisées pour détecter Tg reposent sur le transfert d'énergie par résonance de type FRET (Montpellier, Grenoble, Bordeaux) ou sur les sondes d'hydrolyse de type Taqman (Rennes) selon les méthodes décrites par Reischl et al. [2] (Montpellier, Grenoble), Robert-Gangneux et al. [3] (Rennes) et Costa et al. [4] (Bordeaux) et sont réalisées uniquement sur les appareils Roche® : LightCycler 480 Roche® (Montpellier, Rennes) ou Light Cycler 2.0 Roche® (Grenoble, Bordeaux).

RESULTATS ET DISCUSSION

1-Evaluation sur points de gammes : Deux centres ont testé la gamme standard de toxoplasmes lyophilisés du CNRT (10⁴ toxoplasmes/mL, Montpellier 2014) [5] en parallèle avec le kit TibMolBiol® et la méthode utilisée en routine. Les performances du coffret ont été légèrement inférieures (Centre A: 8 réactions positives sur 12 à 0,01 Tg/prise d'essai avec la méthode de routine versus 1 réaction sur 6 avec le kit), ou équivalentes (Centre B: 1 réaction positive sur 3 à 0,01 Tg/prise d'essai avec les deux méthodes), à celles de la méthode "maison" (Tableau 1).

Tableau 1 : Résultats de la "gamme standard" du CNR Toxoplasmose

	Concentrations (Tg/PCR tube)	1000	100	10	1	0,1	0,01
Centre A routine	n	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	8/12
	Cp moyen +/- SD	19,66+/-0,30	23,45+/-0,55	26,66+/-0,49	29,57+/-0,82	32,81+/-1,18	35,55+/-1,93
Centre A TibMolBiol	n	6/6	6/6	6/6	6/6	4/6	1/6
	Cp moyen +/- SD	19,83+/-0,14	23,94+/-0,09	27,75+/-0,22	31,45+/-0,33	33,85+/-0,43	35,26
Centre B routine	n	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
	Cp moyen +/- SD	21,00+/-0,18	24,13+/-0,16	27,06+/-0,13	30,41+/-0,45	33,77+/-1,14	35
Centre B TibMolBiol	n	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
	Cp moyen +/- SD	20,68+/-0,20	23,71+/-0,4	26,56+/-0,8	30,05+/-0,66	33,36+/-1,58	33,49

2- Evaluation de la "gamme standard" du CNR Toxoplasmose et de la gamme fournie par le kit avec et sans contrôle interne : Les deux gammes ont été testées en triplicatas avec et sans contrôle interne afin de rechercher une éventuelle compétition du contrôle interne avec la cible sur l'amplification de faibles charges parasitaires. Le contrôle interne a été ajouté après l'extraction selon les recommandations du fournisseur. Aucune différence de sensibilité n'a été observée (Tableaux 2 et 3). A noter que la gamme fournie par le kit indique des charges environ trois fois inférieures à la gamme "standard" du CNR toxoplasmose; des Cp équivalents ont été obtenus pour des concentrations trois fois moindres avec la gamme TibMolBiol qu'avec la gamme standard.

Tableau 2 : Résultats de la gamme "standard" du CNR Toxoplasmose avec et sans contrôle interne

	Concentrations (Tg/PCR tube)	1000	100	10	1	0,1	0,01
Centre A sans CI	n	6/6	6/6	6/6	6/6	4/6	1/6
	Cp moyen +/- SD	19,83+/-0,14	23,94+/-0,09	27,75+/-0,22	31,45+/-0,33	33,85+/-0,43	35,26
Centre A avec CI	n	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	1/6
	Cp moyen +/- SD	20,00+/-0,06	24,00+/-0,06	27,39+/-0,13	30,58+/-0,33	33,06+/-2,10	35,94

Tableau 3 : Résultats de la gamme fournie par le kit avec et sans contrôle interne

	Concentrations (Tg/PCR tube)	3333	333	33	3	0,3	0,03
Centre A sans CI	n	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Cp moyen +/- SD	17,11+/-0,02	20,35+/-0,15	23,65+/-0,16	26,74+/-0,07	31,02+/-0,05	32,99+/-1,06
Centre A avec CI	n	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
	Cp moyen +/- SD	17,31+/-0,66	21,01+/-0,49	24,19+/-0,41	27,57+/-0,90	30,37+/-0,43	33,36+/-0,51

3-Evaluation sur des échantillons de Contrôle de Qualité national en PCR-Toxoplasma (CQn) : Sur les échantillons de CQn extraits par les différents centres, les résultats du coffret sont globalement concordants avec ceux des méthodes "maison" en termes qualitatifs; un centre a trouvé 1 faux négatif (FN) avec le kit et un FN avec sa méthode "maison" (Tableau 4). Ces résultats discordants correspondent à de très faibles charges parasitaires.

Tableau 4 : Résultats échantillons CQn

CQn	TibMolBiol		
	Positive	Négative	Total
Extraction "maison" + PCR de référence	Positive	10	11
	Négative	1	8
Total	11	8	19

4- Evaluation sur ADN de patients : 133 échantillons issus de DNAtèques ou passés en prospectif ont été testés : 59 négatifs et 70 positifs (cf. Matériels et Méthodes ci-dessus). Toutes les toxoplasmoses congénitales ont été confirmées par le suivi biologique des patients.

Sur ces 133 ADN, 59 étaient négatifs et 70 positifs avec les deux méthodes. Un échantillon d'humeur aqueuse a été trouvé négatif avec le kit mais positif avec la méthode "maison" avec des Cp très tardifs (Cp_{Méthode maison}=36). Trois échantillons sont considérés à part car ils ont été trouvés 'inconstamment positifs' (avec des Cp tardifs) : (i) un LBA trouvé négatif par la méthode "maison" mais positif dans seulement 1 réaction/3 avec le kit (Cp_{TibMolBiolLightMix}=35); (ii) un placenta et un liquide amniotique de toxoplasmoses congénitales confirmées, plus 'inconstamment positifs' avec le kit qu'avec la méthode maison (au total 3 réactions/10 versus 9/10). Les Tableaux 5 à 9 ci-dessous ne comptabilisent pas les "inconstamment positifs".

Tableau 5 : Résultats échantillons LA

LA	TibMolBiol		
	Positive	Négative	Total
Extraction "maison" + PCR de référence	Positive	31	31
	Négative	0	44
Total	31	44	75

Tableau 6 : Résultats échantillons sang

Sang	TibMolBiol		
	Positive	Négative	Total
Extraction "maison" + PCR de référence	Positive	9	9
	Négative	0	5
Total	9	5	14

Tableau 7 : Résultats échantillons placenta

Placenta	TibMolBiol		
	Positive	Négative	Total
Extraction "maison" + PCR de référence	Positive	11	11
	Négative	0	4
Total	11	4	15

Tableau 8 : Résultats autres échantillons de liquides biologiques

LCR, HA, LBA, autre	TibMolBiol		
	Positive	Négative	Total
Extraction "maison" + PCR de référence	Positive	14	15
	Négative	0	6
Total	14	7	21

Tableau 9 : Résultats biopsies

Biopsies	TibMolBiol		
	Positive	Négative	Total
Extraction "maison" + PCR de référence	Positive	5	5
	Négative	0	0
Total	5	0	5

CONCLUSION

En conclusion, l'utilisation du coffret TibMolBiol LightMix® s'est révélée satisfaisante pour le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose; les performances du kit TibMolBiol LightMix® *Toxoplasma gondii* (Roche®) sont comparables avec les méthodes PCR de référence pour ce diagnostic moléculaire dans des échantillons biologiques variés (LA, LCR, LBA, humeur aqueuse ou liquide d'adénopathie, placenta, sang). Néanmoins il peut conduire à des faux négatifs sur des échantillons comportant une faible ou très faible charge parasitaire lorsqu'une seule réaction par échantillon est réalisée. La présence d'un contrôle interne ne provoquant pas d'inhibition sur la détection des faibles concentrations est intéressante. La gamme fournie par le kit permet de quantifier des charges variées mais elle indique des charges trois fois inférieures à la gamme "standard" du CNR toxoplasmose. A noter également que le développement de ce kit a été fait uniquement pour un appareil de PCR LightCycler Roche®. Enfin, autre petit point négatif, il nécessite la reconstitution de nombreux réactifs ainsi que la création d'un fichier de compensation de couleurs.

References

- 1-Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. Hohlfeld P, et al. 1994. N. Engl. J. Med. 331:695-699.
- 2-Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. 2003. BMC Infect. Dis. 3:7.
- 3-Clinical relevance of placenta examination for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Robert-Gangneux F, et al. Pediatr Infect Dis J. 2010 Jan;29(1):33-8.
- 4-Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by duplex real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. Costa JM, et al. Prenat Diagn. 2001 Feb;21(2):85-8.
- 5- Characterization and multicentric validation of a common standard for *Toxoplasma gondii* detection using nucleic acid amplification assays. Varlet-Marie E, Sterkers Y, Brenier-Pinchart MP, Cassaing S, Dalle F, Delhaes L, Filisetti D, Pelloux H, Touafek F, Yera H, Bastien P. J Clin Microbiol. 2014 Nov;52(11):3952-9.

Remerciements

Nous tenons à remercier : Sylvie Douzou, Ghyslaine Serres et Bounleth Sanichanh pour leur support technique.