



05/12/2023

Recommandations concernant les matrices biologiques pour PCR *Toxoplasma gondii*

Couche leucocytaire / sang total / sérum / plasma

Céline Nourrisson, Marie-Pierre Brenier-Pinchart validé par le GT Pôle Biologie Moléculaire CNR Toxoplasme

Le diagnostic de toxoplasmose disséminée est réalisé par PCR en temps réel sur un prélèvement sanguin. La charge parasitaire est souvent faible et les Cq observés sont tardifs. Il est donc critique d'utiliser une matrice et un protocole d'extraction qui permettent d'obtenir un nombre de cibles par puits supérieur au seuil de détection théorique de la PCR de 5 à 10 cibles ([MIQE ; Bustin SA et al. Clin Chem. 2009](#)).

Le Pôle Biologie moléculaire du CNR de la toxoplasmose recommande de réaliser une extraction d'ADN sur la couche leucocytaire obtenue à partir de sang prélevé sur un tube EDTA de 5-7 mL. Celle-ci pourra être isolée après une étape de centrifugation. La charge parasitaire détectée dans 200 µL de la couche leucocytaire ainsi obtenue est plus élevée que dans 200 µL de sang total ([Menotti et al. 2010 ; Brenier-Pinchart et al. 2015](#)). La sensibilité sera d'autant plus élevée que le volume de sang utilisé, pour la préparation de la couche leucocytaire, sera important ([Brenier-Pinchart et al. 2015](#)).

Le CNR déconseille l'utilisation de sérum ou de plasma du fait de la faible charge parasitaire dans ces matrices ([Menotti et al. 2010 ; Brenier-Pinchart et al. 2015](#)).

Compte tenu de l'émergence de techniques permettant l'extraction de larges volumes de sang total associée à de faibles volumes d'éluat, et donc une plus grande concentration de l'ADN extrait, cette recommandation pourra être revue en fonction des résultats d'études comparant différents protocoles d'extraction.

	Conc (T/mL)	Volume de sang prélevé	Volume extrait (µL)	Volume éluat (µL)	Prise essai PCR	Nb Toxo/puits	Nb cible/puits ^a
Couche blanche ^b	1	3,5-7 mL	3500	200	5	0,0875	22
Couche blanche ^b	1	3,5-7 mL	7000	200	5	0,175	44
Sang total lysé ^c	1	3,5-7 mL	1000	100	5	0,05	13
Sang total	1	3,5-7 mL	200	200	5	0,005	1
Sang total ^d	1	3,5-7 mL	500	50	10	0,1	25
Sang total (large volume)	1	3,5-7 mL	5000	200	5	0,125	31

Table : Aide à l'estimation des valeurs théoriques du nombre de cibles par puits en fonction de la concentration en Toxoplasme/mL, volume extrait, volume d'éluat d'extraction et de la prise d'essai de la PCR. Légende : La cible considérée est rep 529 dont le nombre de copies est estimé à 200-300 (^a250 utilisé ici pour le calcul) ([Homan et al. Int J Parasitol. 2000](#)). Le nombre minimal de cibles détectables dans un puits est de 5 à 10 ([MIQE ; Bustin SA et al. Clin Chem. 2009](#)). Code couleur : rouge <10 cibles ; orange 10≤<20 ; vert ≥20. ^bADN de la couche blanche prélevée de 3,5 ou 7 mL de sang total est extrait après lyse. ^cCentrifugation de 1 mL de sang total après lyse des globules rouges, prélèvement du culot. ^d500 µL de sang total extrait et 50 µL d'éluat, permet de concentrer 10 fois. A noter que ces

valeurs sont des valeurs théoriques qui ne tiennent compte ni du rendement de l'extraction, ni de la présence éventuelle d'inhibiteur.

Références bibliographiques:

Menotti J, Garin YJ, Thulliez P, Sérugue MC, Stanislawiak J, Ribaud P, de Castro N, Houzé S, Derouin F. Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. [Clin Microbiol Infect. 2010 Apr;16\(4\):363-8.](#)

Brenier-Pinchart MP, Capderou E, Bertini RL, Bailly S, Fricker-Hidalgo H, Varlet-Marie E, Murat JB, Sterkers Y, Touafek F, Bastien P, Pelloux H. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: value of the buffy coat for the detection of circulating *Toxoplasma gondii*. [Diag Microbiol Infect Dis. 2015. 289-291.](#)

Stephen A Bustin, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W Pfaffl, Gregory L Shipley, Jo Vandesompele, Carl T Wittwer. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. [Clin Chem . 2009;55\(4\):611-22.](#)

W L Homan, M Vercammen, J De Braekeleer, H Verschueren. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. [Int J Parasitol. 2000;30\(1\):69-75.](#)