



Evaluation multicentrique du kit *Toxoplasma gondii* Real-TM (Sacace®) pour le diagnostic moléculaire de la toxoplasmose

Juliette Guitard^{1,11}, Marie-Pierre Brenier-Pinchart^{2,11}, Emmanuelle Varlet-Marie^{3,11}, Hélène Yera^{4,5,11}, Frédéric Dalle^{6,11}, Célia Rouges⁴, Nicolas Argy⁷, Julie Bonhomme⁸, Agathe Capitaine⁸, Hélène Guégan^{9,11}, Rose Anne Lavergne¹⁰, Hervé Pelloux^{2,11}, Florence Robert-Gangneux^{9,11}, Yvon Sterkers^{3,11}

¹AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Parasitologie-Mycologie, ²CHU Grenoble Alpes, Parasitologie-Mycologie, ³CHU Montpellier, Parasitologie-Mycologie, ⁴Hôpital Cochin, Parasitologie-Mycologie, ⁵CHU Limoges, Parasitologie-Mycologie, ⁶CHU Dijon, Parasitologie-Mycologie, ⁷Hôpital Bichat, Parasitologie-Mycologie, ⁸CHU Caen, Parasitologie-Mycologie, ⁹CHU Rennes, Parasitologie-Mycologie, ¹⁰CHU Nantes, Parasitologie-Mycologie, ¹¹Pôle Biologie Moléculaire du Centre National de Référence de la Toxoplasmose

Introduction

Toxoplasma gondii peut être responsable de pathologies sévères

Les parasitémies peuvent être très faibles et le diagnostic moléculaire a révolutionné le diagnostic de la toxoplasmose

Toxoplasma gondii Real-TM (Sacace®)

- Kit de détection de l'ADN de *T. gondii* CEIVD
- Cible: Rep529
- Prélèvements cliniques: liquide amniotique, sang, cellules mononuclées périphériques, biopsies, liquide cébrospinal (LCS)
- Contrôle interne (CI) à introduire avant l'extraction dans les échantillons.
- Mesure de la fluorescence APRES 5 premiers cycles de PCR

Objectifs

Cette étude multicentrique vise à évaluer les performances analytiques et cliniques du kit *T. gondii* Real-TM (Sacace®) pour diagnostiquer la toxoplasmose congénitale et disséminée

Matériel et Méthodes

Performances analytiques: 4 centres ont évalué
 (i) sensibilité analytique et efficacité: gamme de *T. gondii* (0,01 à 10 000 *T. gondii*/mL)
 (ii) exactitude: 5 contrôles de qualité externe

Performances cliniques: 9 centres
 Etude rétrospective
 ADN issus de prélèvements cliniques (PCR de référence et diagnostic clinique) (Tableau 1)
 Duplicat
 Si discordance, ADN retesté en PCR de référence (Figure 1)

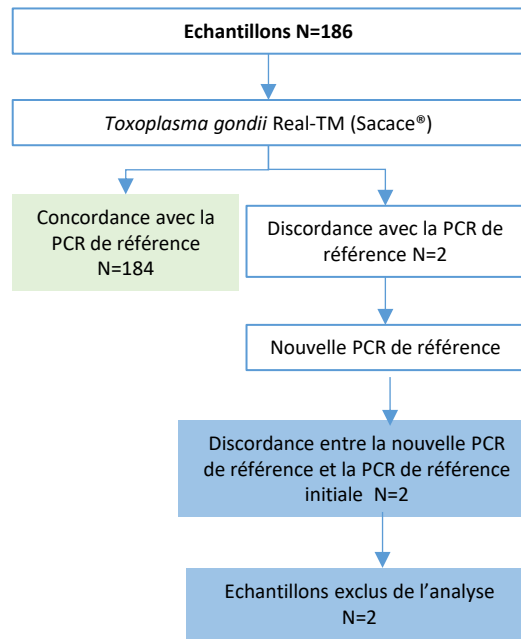


Figure 1: Algorithme des PCR réalisées

Tableau 1: Description des 186 échantillons cliniques testés

| Nombre d'échantillons | Toxoplasmose | Absence de toxoplasmose |
|---|--------------|-------------------------|
| Toxoplasmose congénitale (n=55) | 42 | 13 |
| Toxoplasmose cérébrale (n=33) | 22 | 11 |
| Toxoplasmose oculaire (n=19) | 15 | 4 |
| Toxoplasmose disséminée/pulmonaire (n=78) | 35 | 43 |
| Toxoplasmose aiguë (n=1) | 1 | 0 |
| Echantillons totaux | 115 | 71 |

Matrices: LA, placenta, cordon, biopsie foetale; LCS, biopsie SNC; HA; sang total, couche blanche, LBA, crachat, moëlle osseuse, adénopathie, biopsie.

Tableau 2: Description des échantillons cliniques testés

| Centre | Extraction | PCR |
|----------|---|------------------------------|
| Centre 1 | Manuelles: TNN, Promega | Reischl, BMC infect dis 2003 |
| Centre 2 | Manuelles: Qiagen, Automatisée Biomérieux | Bioevolution |
| Centre 3 | Manuelle Qiagen | Reischl, BMC infect dis 2003 |
| Centre 4 | Manuelle, automatisée: Qiagen | Bioevolution |
| Centre 5 | Manuelle, automatisée: Qiagen | Robert-Gangneux PIDJ 2010 |
| Centre 6 | Automatisées: Roche, Promega | Bioevolution |
| Centre 7 | Manuelle Qiagen | Reischl, BMC infect dis 2003 |
| Centre 8 | Automatisée Qiagen | Bioevolution |
| Centre 9 | Automatisée Biomérieux | Bioevolution |

Tableau 5: Détail des échantillons inconstamment positifs : 6/113= ~5%

| Echantillon | Centre 2 | Centre 2 | Centre 4 | Centre 5 | Centre 6 | Centre 8 |
|---|-----------|-------------------------------|------------|----------------|------------|----------|
| | LCS | LA | Sang | Sang de cordon | Sang | HA |
| Toxoplasmose | cérébrale | congénitale | disséminée | congénitale | disséminée | oculaire |
| PCR de référence initiale | 34,4/36,6 | 31,1/30,7/Neg/30,6 /31,1/31,3 | 30,2/33,8 | >36 | 35,6/Neg | 35,8 |
| PCR <i>T. gondii</i> Sacace® | Neg/30,1 | Indet (IC neg)/24,2 | 28,7/Neg | Neg/ 34,5 | 29,4/Neg | Neg/33,5 |
| 2nde PCR de référence | ND | ND | 30,2/33,8 | Neg/Neg | ND | Neg/34,8 |
| 2nde PCR <i>T. gondii</i> Sacace® | 31,5/31,3 | 26,3/26,5 | ND | 35/35 | ND | ND |

Tableau 3: Performances analytiques de la PCR *T. gondii* Real-TM (Sacace®)

| | Centre 1 | Centre 2 | Centre 3 | Centre 4 |
|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Efficacité % | 109 | 89 | 91 | 103 |
| R² | 0,999 | 0,998 | 1,000 | 0,999 |
| LOD (<i>T. gondii</i>/mL) | 0,01 | 1 | 1 | 1 |
| EEQ (n=5) | Concordant | Concordant | Concordant | Concordant |

LoD: Limite de détection, EEQ; Contrôle externe de la Qualité, R²: régression linéaire

Tableau 4 : Performances cliniques de la PCR *T. gondii* Real-TM (Sacace®)

| PCR de référence | <i>T. gondii</i> Real TM (Sacace) | |
|------------------|-----------------------------------|----------|
| | Positive | Négative |
| Positive | 113 | 0 |
| Négative | 0 | 71 |

Résultats

Performances analytiques (Tableau 2)

- ✓ Bonne efficacité de la PCR ≥ 89%
- ✓ Bonne limite de détection allant de 0,01 à 1 *T. gondii*/mL selon l'extraction
- ✓ Bonne exactitude

Performances cliniques (Figure 1, Tableau 3)

- ✓ Sensibilité 100% (IC95 96,7-100%)
- ✓ Spécificité 100% (IC95 94,9-100%)

Discussion & conclusion

Très bonne performance analytique
 Très bonne performance clinique

Praticabilité moyenne : 2 mix à mélanger + Taq : nombreux pipetages

Contrôle interne avant extraction

~5% d'inconstamment positifs (Tableau 5): importance du multiplicat