

# Evaluation préliminaire du kit TNAI (Roche Diagnostics) pour l'extraction de l'ADN du cytomégalo virus humain à partir du sang total.



Alain S<sup>1</sup>, Lachaise V<sup>1</sup>, Lionet M.C. <sup>1</sup>, Denis F. <sup>1</sup>

1 : Laboratoire de Virologie, EA 3175 et CNR Cytomégalo virus, CHU Dupuytren (e-mail sophie.alain@unilim.fr), 2 avenue M L KING, 87042 Limoges cedex ;

332

## RESUME

## INTRODUCTION

L'intérêt de la quantification du génome du cytomégalo virus (CMV) par PCR en temps réel pour la surveillance de l'infection chez les immunodéprimés justifie le développement de trousse standardisées. Le sang total est un prélèvement de choix du fait de la simplicité du traitement préanalytique et du stockage. Le kit TNAI (Roche Diagnostics) est dédié à l'extraction des acides nucléiques totaux, automatisée sur l'automate Ampliprep (Roche Diagnostic), à partir de volumes de 150 à 1000µL de prélèvement.

**Méthode** A partir d'un stock de virions de souche de CMV AD 169 titré par PCR en temps réel, nous avons réalisé une gamme de dilutions de 5 en 5 de 72 à 2,25 10<sup>5</sup> copies de génome par mL de sang total, répartie après homogénéisation en aliquotes de 550µL conservés à -80°C. L'extraction TNAI a été comparée à l'extraction Qiagen DNAblood (Qiagen) manuelle utilisée en routine au laboratoire avec la même prise d'essai (200µL). Après extraction les ADN ont été conservés à +4°C. La reproductibilité de l'extraction d'ADN cellulaire a été mesurée deux fois sur la totalité de la gamme par amplification du gène de l'albumine (Wagner et al., J Virol. Methods, In Press). L'efficacité et la reproductibilité de l'extraction d'ADN du CMV ont été testées avec une PCR quantitative par la méthode Taqman (Mengelle et al., J Med. Virol., 2003) utilisée en routine au laboratoire sur un Light Cycler 1.0 (Roche Diagnostic), au cours de trois essais.

**Résultats** **Quantification d'ADN cellulaire** : la reproductibilité inter-échantillon des deux méthodes est bonne (variation inter-échantillon inférieure à 0,25 log copies/mL) et la différence de quantification de l'ADN cellulaire est de 0,25 log, en faveur de Qiagen. A noter la stabilité des ADN cellulaires extraits par la méthode TNAI qui restent parfaitement quantifiables après 14 jours à +4°C.

**Quantification de l'ADN viral** : la comparaison des deux extractions met en évidence une différence de 0,71 à 2 log entre les deux méthodes, en faveur de la méthode Qiagen. Les différences les plus élevées étant retrouvées pour les charges virales supérieures ou égales à 10<sup>4</sup>. La reproductibilité de la méthode TNAI (testée sur deux essais menés sur des ADN conservés à +4°C) montre une différence moyenne de 2,29 logs.

**Conclusion** Ces résultats préliminaires soulignent la différence entre extraction d'ADN cellulaire et d'ADN viral. La sous quantification liée à l'extraction TNAI n'est pas un obstacle à son utilisation mais illustre la différence entre méthodes manuelles et méthodes automatisées. Ces premières observations nous

Le développement des méthodes moléculaires de quantification du génome du cytomégalo virus par PCR en temps réel justifie le développement de techniques automatisées, pour l'extraction et pour la quantification des ADN viraux. La mesure de la charge virale peut être effectuée dans le plasma, le sérum, les leucocytes ou le sang total. Le sang total est un prélèvement de choix du fait de la simplicité du traitement préanalytique et du stockage. Cependant, l'extraction des ADN viraux à partir du sang total est encore mal standardisée. L'utilisation d'automates d'extraction devrait permettre d'obtenir une meilleure reproductibilité à partir de ce compartiment.

Les résultats concernant la différence de quantification de l'ADN viral entre les deux techniques ont été contrôlés sur un nouveau stock viral et sont présentés ci-dessous La reproductibilité inter et intra essai a également été testée

## MATERIEL et METHODES

**Souche virale** : Souche de références Towne et AD169 (ATCC) Cultivée sur fibroblastes embryonnaires humains MRC-5 (Biomérieux)

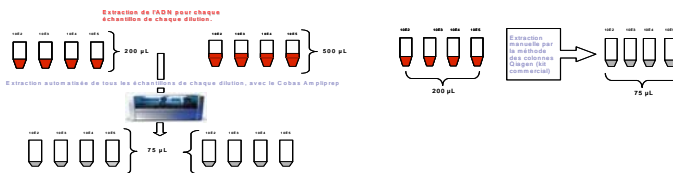
**Stock de virus** : Obtenus à partir du surnageant et des cellules infectées.

**Stock A (Towne)** : Dilutions de 5 en 5 de 72 à 2,25 10<sup>5</sup> copies par mL de sang total, répartie après homogénéisation en aliquotes de 550µL conservés à -80°C.

**Stock B (AD169)** : Constitué afin de contrôler les résultats obtenus sur le stock A. Dilutions de 10 en 10 de 10<sup>6</sup> à 10<sup>2</sup> copies/ml.

**Extraction** : **Extraction manuelle** à l'aide du Kit Qiagen DNAblood (Qiagen) utilisée en routine au laboratoire-prise d'essai de 200µL.

**Extraction automatisée** sur billes de silice sur l'automate Cobas™ Ampliprep (Roche Diagnostic) avec prise d'essai de 200, 500 ou 1000 µL. (Kit TNAI Total Nucleic Acid isolation kit, dédié à l'Ampliprep)



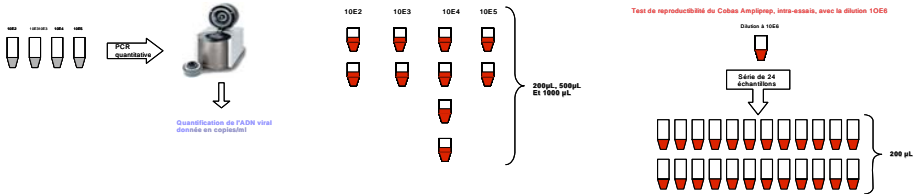
**Quantification de l'ADN viral à partir des stocks et des extraits** :

PCR en temps réel par amplification d'un fragment du gène *UL83* codant pour la protéine du tégument pp65, utilisant la technologie Taqman, avec gamme externe plasmidique, sur Light Cycler 1.0 d'après Mengelle et al., J Med. Virol., 2003.

Le stock A a été quantifié après lyse par ébullition et le stock B a été quantifié après extraction Qiagen

**Quantification de l'ADN cellulaire à partir des extraits** : Sur le stock A

Amplification du gène de l'albumine (Wagner et al., J Virol. Methods, 2006).



## RESULTATS

**Quantification de l'ADN cellulaire** : La reproductibilité inter-échantillon des deux méthodes est bonne (variation inter-échantillon inférieure à 0,25 log copies/mL) et la différence de quantification de l'ADN cellulaire est de 0,25 log, en faveur de Qiagen. A noter la stabilité des ADN cellulaires extraits par la méthode TNAI qui restent parfaitement quantifiables après 14 jours à +4°C.

**Quantification de l'ADN du CMV** :

**Reproductibilité inter essai** :

TNAI (log)

Dilution	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
Moyenne	3,88	3,66	4,82	5,85	
Ecart type	NA	0,49	0,35	NA	
CV	NA	13,25%	7,23%	NA	
Nombre d'essais	4	4	8	1	

QIAGEN (log)

Dilution	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
Moyenne			4,39	5,28	6,12
Ecart type			0,63	0,26	0,30
CV			14,30%	4,93%	4,89%
Nombre d'essais			4	4	4

NA : non calculable : Dilution 10<sup>2</sup> non détectée pour ¾ et 4/4 aliquotes en TNAI et Qiagen, respectivement

Dilution 10<sup>5</sup> non détectée pour ½ cas en TNAI (présence d'un caillot, refus de prise en compte de l'échantillon par l'automate)

**Reproductibilité intra-essai** (Kit TNAI uniquement), sur un échantillon à 10<sup>6</sup> copies/ml : CV = 2%

moyenne	6,20
ecart type	0,15
CV	2%

**Quantification de l'ADN viral par les deux méthodes** : Des résultats différents sont observés avec le stock A et le stock B :

**Stock A** : Surestimation initiale par Qiagen versus TNAI : +0,71 à +2logs

**Stock B** :

=> Requantification du stock par la méthode Qiagen et reprise des essais :

Dilutions	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
Qiagen	3,88	4,74	7,11	5,97
TNAI200	3,88	4,75	5,74	6,76
TNAI500	3,8	4,67	5,90	4,23
Différence Qiagen/TNAI200	0,195	-0,01	1,37	-0,79
Différence Qiagen TNAI500	0,08	0,07	1,12	1,74

Dilution

Dilution	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>
Différence Qiagen-TNAI	-3,88	0,72	0,46	0,27

## CONCLUSION

Ces résultats préliminaires montrent d'une part l'excellente reproductibilité du kit TNAI pour l'extraction de l'ADN du CMV à partir de virus dilué dans du sang total. La corrélation entre les résultats obtenus par les deux extractions montre une sous estimation du stock A par TNAI cette sous estimation est moins importante avec le stock B. Ces résultats devront donc être confirmés. Ce travail illustre la difficulté de standardisation des méthodes d'extraction et la nécessité d'étalons de référence.