

Comparaison de la trousse Simplexa™ CMV Kit (Focus Diagnostics) avec la trousse CMV R-gene™ (Argène) pour la quantification du CMV dans différentes matrices.

B. Boyer¹, S. Hantz^{1,2}, M. Voisin¹, S. Alain^{1,2}

¹CNR CytomégaloVirus, laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, CHU de Limoges

²UMR 1092, faculté de médecine, université de Limoges, Limoges, France

Introduction

La quantification du génome du cytomégaloVirus (CMV) est un outil essentiel pour la surveillance de l'infection à CMV chez les immunodéprimés. Cependant, les performances des trousse ne sont pas similaires et leur comparaison nécessite une expression des charges virales (CV) en UI/mL. Nous avons comparé les performances en UI/mL de 2 trousse ciblant UL83 : Simplexa™ CMV (Focus Diagnostics) et CMV R-gene™ (Argène) sur différentes matrices.

Matériels

✓ Contrôle qualité sang total QCMD (2012): 4.77 log₁₀, 4.48 log₁₀, 3.79 log₁₀, 3.78 log₁₀, 2.84 log₁₀, 2.86 log₁₀ et 2.55 log₁₀ UI/mL

✓ 30 échantillons de patients avec une CV CMV détectable en routine (13 sangs totaux, 5 LBA, 3 biopsies, 3 urines et 6 dilutions d'un liquide amniotique (LA) prélevé lors d'une infection congénitale à CMV).

✓ 54 échantillons issus de matrices différentes (sang total, plasma, LA, urine, LCR), préalablement inocuées avec le standard international WHO puis diluées en matrice CMV négative.

Méthodes

Pour chaque panel d'échantillons testés, l'extraction et les amplifications ont été réalisées le même jour

Extraction automatisée Nuclisens EasyMag Biomérieux (Protocole spécifique B)

PCR CMV R-gene (Argène)

- ✓ Technologie Taqman
- ✓ Validée ST, plasma, sérum, LCR, LBA, urines, biopsies, liquide amniotique
- ✓ 4 points de gamme
- ✓ Contrôle interne pour chaque échantillon exprimé en Ct
- ✓ Résultats exprimés en copies/mL et convertis en UI/mL en fonction du coefficient de corrélation calculé pour chaque matrice selon la méthode des moyennes géométriques (CNR CMV)

PCR CMV Simplexa (Focus Diagnostics)

- ✓ Technologie Taqman
- ✓ Validée sur ST et plasma
- ✓ 2 contrôles positifs: un fort et un faible
- ✓ Contrôle interne (gène de *A. Thaliana*) pour chaque échantillon exprimé qualitativement
- ✓ Résultats exprimés en UI/mL

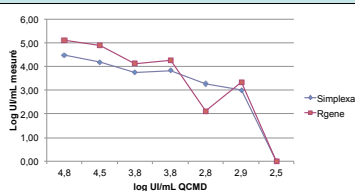
Automate Rotor Gene Q (Qiagen)



Automate Integrated Cyclers (3M)

Résultats

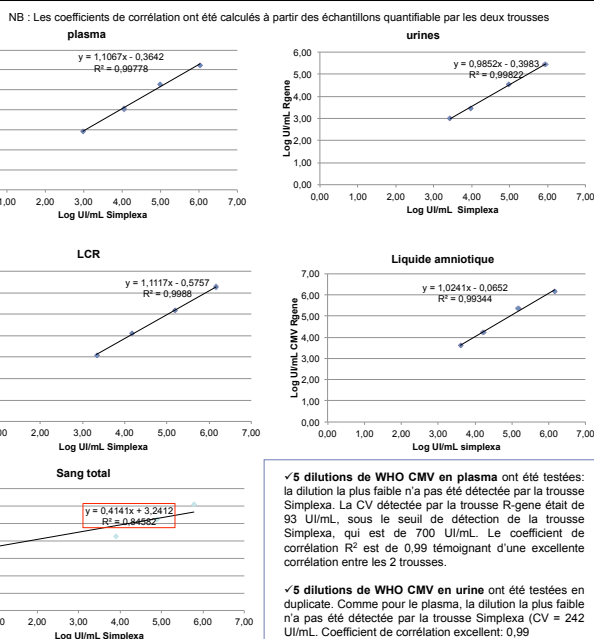
Contrôle qualité sang total QCMD 2012



QCMD (log UI/mL)	Simplexa (log UI/mL)	Δ QCMD Simplexa	R-gene (log UI/mL)	Δ QCMD R-gene
4,77	4,48	0,29	5,12	0,35
4,48	4,20	0,28	4,88	0,41
3,79	3,74	0,05	4,13	0,34
3,78	3,83	0,05	4,26	0,48
2,84	3,25	0,41	2,11	0,72
2,86	3,00	0,14	3,35	0,49
2,55	ND		ND	
Moyenne Δ=		0,20		0,47

✓ Les CV Simplexa et R-gene présentent une différence moyenne respectivement de 0,20 et 0,47 log avec la valeur attendue (moy Δ QCMD)
 ✓ Avec un seuil à 700 UI/mL, le point 352 UI/mL du QCMD n'a pas été détecté par la trousse Simplexa. Ce point n'a pas été détecté de façon similaire avec la technique R-gene.

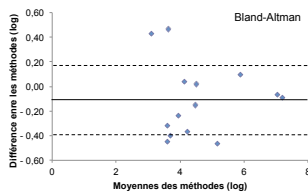
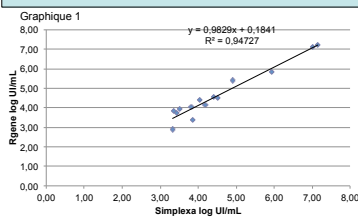
Matrices



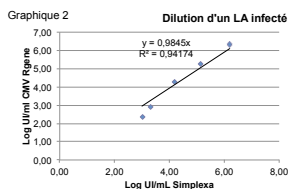
✓ 5 dilutions de WHO CMV en plasma ont été testées: la dilution la plus faible n'a pas été détectée par la trousse Simplexa. La CV détectée par la trousse R-gene était de 93 UI/mL, sous le seuil de détection de la trousse Simplexa, qui est de 700 UI/mL. Le coefficient de corrélation R² est de 0,99 témoignant d'une excellente corrélation entre les 2 trousse.

✓ 5 dilutions de WHO CMV en urine ont été testées en duplicate. Comme pour le plasma, la dilution la plus faible n'a pas été détectée par la trousse Simplexa (CV = 242 UI/mL). Coefficient de corrélation excellent: 0,99

Patients



✓ 11 sang totaux et 3 urines sont inclus dans la corrélation présentée dans le graphique 1 (2 échantillons de sang totaux n'étaient pas conforme pour l'analyse)
 ✓ Le liquide amniotique infecté dilué ne provenant que d'un seul patient est analysé dans le graphique 2
 ✓ La corrélation globale est très bonne (R² = 0,94) pour les charges virales d'échantillons cliniques
 ✓ La moyenne des différences des charges virales (Δlog [technique simplexa/technique R-gene]) est de -0,11 (+/- 0,29 DS: -0,4 à +0,18).



✓ 5 dilutions de WHO CMV en LCR ont été testées : pas de détection de la valeur la plus faible (CV R-gene= 186 UI/mL). Excellente corrélation entre les 2 trousse (R²= 0,99).
 ✓ 5 dilutions de WHO CMV en LA ont été testées en duplicate: la dilution la plus faible n'a pu être détectée avec aucune des 2 techniques. Une très bonne corrélation a été retrouvée dans le LA (R²= 0,99).
 ✓ 5 dilutions de WHO CMV en sang total ont été testées. La corrélation (R²=0,84) est moins satisfaisante car un point de dilution est vraisemblablement sur-quantifié avec la trousse R-gene. Une erreur technique est à envisager pour cet échantillon car le coefficient R² sur sang total provenant d'échantillons cliniques est de 0,94.
 ✓ Les évaluations de la trousse Simplexa sur 5 LBA et 3 biopsies ont permis de quantifier la CV CMV sur tous ces prélèvements. Les échantillons n'ayant pu être testés de façon simultanée avec la trousse R-gene, le coefficient de corrélation n'a pu être déterminé.

Conclusions

La trousse Simplexa couplée au système d'amplification miniaturisé 3M Integrated Cyclers a permis d'amplifier les ADN quelle que soit la matrice utilisée avec une excellente corrélation quelle que soit la matrice (coefficients R² de 0,99 pour les matrices inocuées avec des particules virales et de 0,94 pour les CV réalisées sur sang total provenant d'échantillons cliniques).

De plus, la manipulation de la trousse est très aisée et permet de rendre des résultats en une heure environ soit 2h30 en comptant l'extraction.

La très bonne corrélation entre les deux trousse permet d'envisager, grâce à l'adoption des valeurs de CV en UI/mL, une comparaison des résultats issus de ces deux trousse. Cependant, le seuil à 700UI/mL de la trousse Simplexa peut être limitant pour des contextes cliniques où une sensibilité maximale est exigée (LCRs et liquides amniotiques).