



Detection du CMV dans la salive à l'aide de la trousse Rgene™ CMV (BioMérieux)

Hantz S, Boyer B, Voisin M, Alain S.

Centre National de Référence des Cytomégalovirus, Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU de Limoges, Limoges, France

Introduction

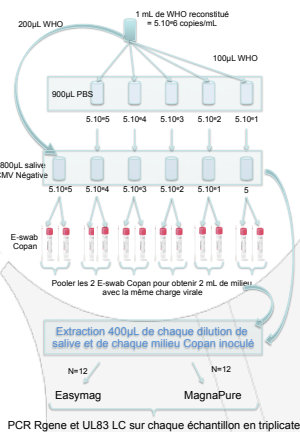
Le diagnostic d'infection congénitale à CMV est effectué, à la naissance, à partir des urines, prélevées sur poche, par culture virale ou par PCR. Chez les enfants infectés, le virus est aussi excrété dans la salive. La sensibilité clinique et la spécificité d'une PCR salivaire prélevée sur milieu de transport pour PCR comparées à la culture atteignent 100% et 99,9 % respectivement (Boppana et al., 2011). Ceci justifie sa validation avec les méthodes commerciales incluant extraction des acides nucléiques, et PCR quantitative.

Objectifs

Nous avons donc testé la trousse Rgene™CMV (BioMérieux) utilisée en routine au laboratoire dans cette application, en comparant différentes méthodes de prélèvement et d'extraction des acides nucléiques. Pour cette comparaison, nous avons utilisé le standard international de l'OMS, dilué dans une matrice salivaire et éventuellement distribuée en milieu de transport UTM E-Swab Copan, déjà utilisé au laboratoire pour la recherche d'Herpes simplex par PCR.

Méthodes

- Le standard international OMS à 5.10⁶ UI/mL a été dilué au 1/10ème en PBS puis de 10 en 10 dans un pool de salives de donneurs CMV séronégatifs.
- La gamme de salive de 5.10⁵ UI/mL à 5 UI/mL a été conservée à +4°C 24h avant extraction, ou prélevée à l'écouvillon, déchargée dans un milieu de transport UTM (Copan) et conservée à température ambiante.
- La pesée du milieu UTM avant et après décharge de l'écouvillon montre un volume prélevé de 180uL de salive.
- 400uL de chaque point ont été extraits en triplicate avec Magnapure™ Compact (Roche Diagnostics) et Easy Mag™(BioMérieux) et la charge virale a été mesurée par la trousse Rgene™ CMV (BioMérieux) sur rotor geneQ (seuil 75copies/mL) et par une PCR maison ciblant UL83 (Mengelle et al., 2003) sur light cycler 1 (seuil 500 copies/mL).



Résultats

La reproductibilité de l'extraction mesurée au Nanodrop™ est très bonne avec un meilleur rendement du Magnapure compact : 39,3+/-3ng/uL Easy Mag et 62+/-8ng/uL Magnapure compact.

La dilution en UTM diminue 10 fois la concentration d'ADN (4,84+/-0,5 et 4,63+/-0,8).

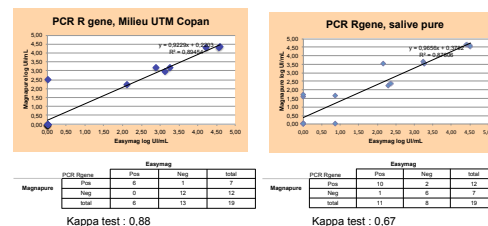
Le controle interne de la PCR Rgene™ ne montre pas d'inhibition.

En Rgene™ la sensibilité à 100% (3/3) est 3,69 et 4,49 log UI/ml sur salive pure et en milieu UTM après extraction en Easy mag, 2,69 et 4,69 log UI/ml en Magnapure Compact; 1/3 est détecté à 2,69 log UI/ml sur salive pure et en UTM 1/3 à 3,69 en Easy Mag et 2/3 à 3,69 log UI/ml en Magnapure compact.

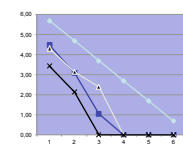
Les résultats sont identiques avec la PCR maison pour l'extraction Easy mag, inférieurs d'un log avec l'extraction Magnapure compact quel que soit le milieu

Essais en QPCR Rgene à partir de 200uL de salive pure ou en milieu UTM :

1) Comparaison entre les extracteurs avec la PCR R gene

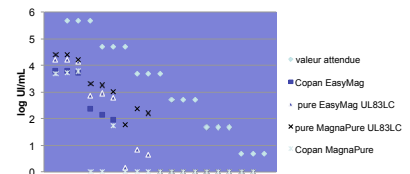


2) Pas d'amélioration en augmentant le volume de prise d'essai



3) Même différence avec la PCR « maison » UL83LC:

Effet de l'extraction et du milieu avec la PCR UL83



Conclusions

L'amplification du CMV dans la salive est réalisable avec la trousse Rgene™ avec un bénéfice en terme de quantification et de seuil de détection par rapport à une PCR "maison" dans le même gene. A partir du standard OMS, l'extraction Magnapure compact (Roche) sur salive pure est la plus efficace. L'utilisation de milieu UTM Copan diminue la sensibilité par dilution, non compensée par une augmentation de prise d'essai et ce quel que soit l'extracteur. Si ce handicap n'est pas pénalisant pour de fortes charges virales, il peut conduire à des faux négatifs pour des charges virales plus faibles. Sachant que la charge virale moyenne des enfants excréteurs en crèche va de 2 à 5 log UI/ml (données du CNR) les charges virales faibles peuvent être manquées par un test peu sensible. Il est donc souhaitable d'étudier d'autres milieux de transport avant une éventuelle campagne de dépistage. Ces conclusions doivent être vérifiées sur échantillons cliniques, car le standard OMS peut donner des résultats différant de ceux obtenus par dilution d'échantillons dans certaines matrices urines ou salive notamment (data CNR CMV non présentés).