

Evaluation de l'extracteur SaMag-12 pour automatisation partielle de la PCR CMV sur DBS

Hantz S, Courivaud C, Mayeras M, Ribot E, Alain S.
 Laboratoire Bactériologie-Virologie-Hygiène,
 CNR Herpesvirus, CHU Dupuytren, Limoges, France
 UMR 1092, INSERM, Université Limoges

Introduction

La PCR sur DBS (spot de sang séché) est un outil indispensable au diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à cytomégalovirus (CMV). Malgré des essais d'automatisation complète de l'extraction, la technique employée au CNR des Herpesvirus (Leruez et al. 2011) demeure la plus sensible. Elle repose sur un découpage des DBS, une lyse à la soude et élimination du papier puis une extraction sur colonne du lysat.

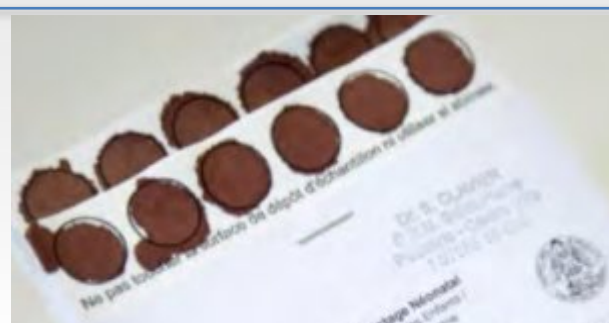
Objectifs

L'ensemble du processus d'extraction étant long et complexe et devant l'impossibilité d'automatiser l'intégralité de ce processus, nous avons souhaité réaliser la seconde étape de l'extraction sur automate. Dans ce contexte, nous avons testé les performances de la trousse SaMag sur automate SaMag-12 (Sacace).

Matériel et Méthodes

Matériel

- 19 sang totaux de patients greffés de cellules souches hématopoïétiques ou de rein (suivi de la charge virale CMV)
- 15 QCMD DBS (2012 et 2013)
- 6 DBS prélevés en 2012 pour évaluer la conservation
- 2 DBS d'enfants suspects d'infection congénitale à CMV



dépôt de 50µL de sang total sur les spots du papier buvard destiné au test de Guthrie

- Découpage d'un spot en fines lamelles à l'aide de ciseaux stériles et d'une pince stérile
- ajouter 1,5 mL de solution de lavage
- incubation 30 min à T° ambiante
- éliminer la solution de lavage
- ajouter 150µL de tampon d'extraction à la soude
- incubation 10 min à 100°C
- récupérer le lysat
- ajouter 30µL de solution neutralisante

Automate SaMag-12 system (Sacace):

- ✓ automate de paillasse
- ✓ 12 positions en parallèle
- ✓ kit SaMag Blood DNA Extraction kit
- ✓ principe: billes magnétiques



Nuclisens Easy Mag, bioMérieux :

- ✓ 24 positions en parallèle
- ✓ principe : extraction magnétique basée sur la technologie BOOM® (particules de silice)
- ✓ protocole spécifique B



- PCR R-gene (bioMérieux)
- automate Rotogène
- prise d'essai 10 µL



Résultats

✓ Comparaison des performances des extractions bioMérieux et Samag :

Echantillons	Nb copies/mL	Log copies/mL	Delta log	Extractions
110 404 687	8 326	3,92		Easy Mag (200µL)
110 404 687	7 436	3,87	- 0,05	Easy Mag (DBS)
110 404 687	10 880	4,04	0,12	SaMag (DBS)
120 014 928	138 944	5,14		Easy Mag (200µL)
120 014 928	27 752	4,44	- 0,70	Easy Mag (DBS)
120 014 928	56 024	4,75	- 0,39	SaMag (DBS)
110 257 204	2 823	3,45		Easy Mag (200µL)
110 257 204	1 196	3,08	- 0,37	Easy Mag (DBS)
110 257 204	3 004	3,48	0,03	SaMag (DBS)

L'extracteur SaMag permet d'obtenir un meilleur rendement que l'Easy Mag pour les DBS avec des charges virales mesurées souvent supérieures à celles obtenues à partir de l'extraction de 200µL de sang total sur Easy Mag en routine.

✓ Vérification de l'absence d'ADN dans la solution de lavage:

Echantillons	Délai après réalisation du spot	Nb copies/mL	Extractions
110 404 687	J+1	0	Easy Mag
120 014 928	J+1	162,75	Easy Mag
110 257 204	J+6	0	Easy Mag
110 257 204	J+6	0	SaMag

Parmi les 2 solutions de lavage issues d'analyses réalisées à J+1, une faible charge virale est détectée pour un échantillon. Pas de détection sur les analyses effectuées à J+6 après réalisation du spot.

✓ Evaluation sur les contrôles de qualité externes du QCMD (campagne 2012 et 2013):

Echantillons	Nb copies/mL	Log copies/mL	Valeurs attendues	Delta Log	Albumine
12 01	504	2,7	3,7	1	1,37*10 ⁴
12 02	9104	3,96	4,3	0,34	5,68*10 ⁴
12 04	748	2,87	3,7	0,83	1,45*10 ⁴
12 05	6196	3,79	4	0,21	2,82*10 ⁴
12 06	Neg	Neg	Neg	ND	4,64*10 ⁴
12 07	244	2,39	3,4	1,01	9,44*10 ⁶
12 08	3836	3,58	4	0,42	2,30*10 ⁴
13 01	660	2,82	3,7	0,88	1,20*10 ⁴
13 02	Neg	Neg	Neg	ND	1,30*10 ⁵
13 03	444	2,65	3,4	0,75	2,33*10 ⁴
13 04	3636	3,56	4	0,44	3,23*10 ⁴
13 05	208	2,32	3,7	1,38	8,12*10 ³
13 06	356	2,55	3,69	1,14	7,96*10 ⁴
13 07	1820	3,26	4	0,74	2,47*10 ⁴
13 08	60	1,78	3,4	1,62	1,96*10 ⁴

✓ Evaluation de la répétabilité à J+1

Valeurs attendues (Log10 copies/mL)	Résultats (Log10 copies/mL)	Delta log	Moyenne	Ecart type
3,82	3,82	0	3,72	0,15
	3,62	-0,20		
	3,64	-0,18		
	3,93	0,11		
	3,57	-0,25		
3,91	3,59	-0,32	3,58	0,17
	3,75	-0,16		
	3,66	-0,25		
	3,63	-0,28		
	3,29	-0,62		
5,01	5,07	0,60	4,92	0,11
	4,89	-0,12		
	4,96	-0,05		
	4,91	-0,10		
	4,78	-0,23		

✓ Evaluation de la répétabilité à J+7

Valeurs attendues (Log10 copies/mL)	Résultats (Log10 copies/mL)	Delta log	Moyenne	Ecart type
3,82	3,79	-0,03	3,76	0,14
	3,71	-0,11		
	3,99	0,17		
	3,7	-0,12		
	3,62	-0,2		
3,91	3,25	-0,66	3,43	0,22
	3,42	-0,49		
	3,58	-0,33		
	3,71	-0,20		
	3,2	-0,71		
5,01	5,2	0,19	5,07	0,10
	5,06	0,05		
	5,13	0,12		
	5,01	0		
	4,96	-0,05		

✓ Evaluation de la répétabilité à J+14

Valeurs attendues (Log10 copies/mL)	Résultats (Log10 copies/mL)	Delta log	Moyenne	Ecart type
3,82	4,39	0,57	4,12	0,20
	4,16	0,34		
	4,09	0,27		
	4,14	0,32		
	3,83	0,01		
3,91	3,58	-0,33	3,79	0,16
	3,98	0,07		
	3,9	-0,01		
	3,79	-0,12		
	3,69	-0,22		
5,01	5,06	0,05	5,07	0,08
	5,18	0,17		
	5	-0,01		
	5,05	0,04		
	5,05	0,04		

✓ Evaluation de la répétabilité à J+131

Valeurs attendues (Log10 copies/mL)	Résultats (Log10 copies/mL)	Delta log	Moyenne	Ecart type
5,01	4,95	-0,06	5,09	0,16
	5,27	0,26		
	5,05	0,04		

Pour des charges virales comprises entre 3,8 et 5 log₁₀ copies/mL, la répétabilité à J1 (5 répliquas) est très bonne avec des coefficients de variation compris entre 2,23 et 4,74% pour la trousse SaMag. La répétabilité est équivalente avec des coefficients de variation compris entre 1,97 et 6,41% à J7 et entre 1,57 et 4,85% à J14. La reproductibilité est également très satisfaisante avec des coefficients de variation entre 1,72% pour un échantillon à 5 log₁₀ et 5,69% pour un échantillon à 3,82 log₁₀.

✓ Analyses d'échantillons cliniques:

N° DBS	Nb copies/mL	Log copies/mL	PCR Albumine (copies/ml)
2011 01	0	0	1,34*10 ⁵
2011 02	0	0	1,60*10 ⁵
2012 01	0	0	1,08*10 ⁵
2012 02	0	0	2,06*10 ⁵
2013 01	0	0	1,18*10 ⁵
2013 02	0	0	1,13*10 ⁵
2018 01	0	0	5,32*10 ⁵
2018 02	0	0	2,98*10 ⁵

✓ Détermination de la sensibilité:

Les échantillons avec une charge virale inférieure à 3 log₁₀ copies/mL ne sont pas systématiquement détectés. Une analyse de type Probit a permis de déterminer une sensibilité 95% à 3,38 log₁₀ copies/mL. L'analyse de 2 spots en parallèle est recommandée devant la difficulté pour améliorer la sensibilité de cette technique.

Conclusion

L'extraction des spots de sang séché est une technique qui nécessite une pré-lyse manuelle, les tentatives d'extraction intégralement automatisées utilisées pour la détection d'autres virus tels que le VHC ou le VIH n'étant pas satisfaisantes pour la détection du CMV. Néanmoins, la dernière étape peut s'effectuer sur automate pour éviter l'utilisation de colonnes. Nous avons validé dans cette étude l'utilisation d'un petit automate de paillasse, le SaMag-12 (Sacace). Son utilisation couplée à la PCR CMV R-gene (bioMérieux) a permis de détecter l'ADN du CMV de J1 à plus de 4 mois après la réalisation des spots, ainsi que l'ensemble des contrôles de qualité du QCMD des campagnes 2012 et 2013. Aucun des patients testés n'a été retrouvé positif malgré une quantité d'albumine évaluée par PCR entre 10⁵ et 10⁶ copies/mL, témoignant d'une très bonne qualité d'extraction.