

DÉTECTION DE L'ADN DES MYCOBACTÉRIES DU COMPLEXE TUBERCULOSIS PAR PCR : Evaluation de quatre troussees commerciales

Trombert-Paolantoni S, Clairet V, , Maury L
Laboratoire Cerba, Cergy-Pontoise, France

OBJET DE L'ETUDE

La recherche d'ADN de *M. tuberculosis* par PCR est recommandée en cas de prélèvement pulmonaire microscopie positive et en cas de forte suspicion de tuberculose pulmonaire si la microscopie est négative. Elle présente l'intérêt d'un rendu rapide du résultat par rapport à la culture, technique de référence pour le diagnostic de tuberculose maladie. Le but de notre étude a été d'évaluer en terme de sensibilité et de spécificité, par rapport à la culture et par rapport aux contrôles de qualité externe, les troussees Real Accurate *M. tuberculosis* PCR de Pathofinder et MTB Q-PCR Alert de Nanogen qui ciblent la séquence d'insertion IS6110 ainsi que les troussees Roche Cobas Taqman MTB et Cobas Amplicor MTB qui ciblent le gène de l'ARNr16S.

MATERIEL ET METHODES

	Cobas Amplicor MTB Roche	Cobas Taqman MTB Roche	Pathofinder Eurogentec	MTB Q-PCR Alert Kit Nanogen
CIBLE	Gène de l'ARN16S	Gène de l'ARN16S	IS6110	IS6110
SONDES	Détection ELISA	Taqman	Taqman	Taqman
NATURES DE PRELEVEMENTS VALIDEES PAR LE FOURNISSEUR	Expectorations et LBA	Expectorations et LBA	Expectorations et LBA	Expectorations, LBA et urines
MARQUAGE CE	oui	oui	oui	oui
PROTOCOLE DE DECONTAMINATION	Fluidification Décontamination Centrifugation	Fluidification Décontamination Centrifugation	Fluidification Décontamination Centrifugation	Fluidification Décontamination Centrifugation
EXTRACTION	Extraction ROCHE sans purification	Extraction ROCHE sans purification	EasyMag bioMérieux, (extraction et purification)	EasyMag bioMérieux, (extraction et purification)
CONTROLE INTERNE D'AMPLIFICATION	oui	oui	oui	oui, contrôle également l'extraction
VOLUME DE DECONTAMINATION	100 µL	100 µL	200 µL	200 µL
VOLUME D'ELUTION	200 µL	200 µL	70 µL	70 µL
VOLUME D'ELUTION UTILISE	50 µL	50 µL	10 µL	5 µL
AMPLIFICATION	Cobas Amplicor	LC 480 II	LC 480 II	LC 480 II
TEMPS DE REALISATION DE L'ANALYSE	7 heures	7 heures	7 heures	7 heures

RESULTATS

ETUDE DE LA SENSIBILITÉ : Prélèvements positifs en PCR parmi 30 prélèvements positifs en culture pour *M. tuberculosis*

	Cobas Amplicor Roche	Cobas Taqman Roche	Pathofinder	Nanogen
Pulmonaire				
Expectoration n = 10	10	9	10	9
Tubage gastrique n = 3	3	3	3	3
Aspiration bronchique n = 5	5	5	5	5
LBA n = 3	3	2	3	3
Extrapulmonaire				
Biopsie ganglionaire n = 6	6	6	6	6
LCR n = 1	1	1	1	1
Liquide articulaire n = 1	1	1	1	1
Biopsie pleurale n = 1	1	1	1	1

ETUDE DE LA SPÉCIFICITÉ : Prélèvements négatifs en PCR parmi 31 prélèvements positifs en culture pour des mycobactéries non tuberculeuses

	Cobas Amplicor Roche	Cobas Taqman Roche	Pathofinder	Nanogen
Pulmonaire				
Expectoration n = 20	20	20	19	20
Tubage gastrique n = 3	3	3	3	3
Aspiration bronchique n = 5	5	5	4	4
LBA n = 3	3	3	3	3

CONTROLES DE QUALITE EXTERNES

Quality Control for Molecular Diagnosis 2008

Nature	Charge bactérienne / échantillon	Cobas Amplicor Roche	CobasTaqman Roche	Pathofinder	Nanogen
LCR	10.000	positif	positif	positif	positif
	1000	positif	positif	positif	positif
	1000	positif	positif	positif	positif
	100	positif	positif	négatif	négatif
	0	négatif	négatif	négatif	négatif
Expectoration	10.000	positif	positif	positif	positif
	1000	positif	positif	négatif	négatif
	1000	positif	positif	positif	positif
	100	positif	négatif	positif	négatif
	0	négatif	négatif	négatif	négatif

College of American Pathologists Survey 2009

	Expectoration
Cobas Amplicor Roche	Positif
Cobas Taqman Roche	Positif
Pathofinder	Positif
Nanogen	Positif

INHIBITION DE LA PCR

n = 50 prélèvements

	% prélèvements présentant des inhibiteurs de la PCR
Cobas Amplicor Roche	18 % (9/50)
Cobas Taqman Roche	38 % (19/50)
Pathofinder	4 % (2/50)
Nanogen	2 % (1/50)

CONCLUSION

La trousse Cobas Taqman Roche donne des résultats satisfaisants (2/30 prélèvements faussement négatifs, 1/10 CQE faussement négatif, absence de faux positif) mais nécessite de fréquentes réanalyses liés aux inhibiteurs. De plus, l'interprétation des courbes de faible amplification par le logiciel n'est pas adaptée et a nécessité des contrôles. Les troussees Nanogen et Pathofinder donnent des résultats satisfaisants pour les prélèvements cliniques en terme de sensibilité (Nanogen : 1/30 prélèvement faussement négatif ; Pathofinder : absence de prélèvement faussement négatif). Cependant, il existe de rares faux positifs (Nanogen : 1/31 prélèvement ; Pathofinder : 2/31 prélèvements) nécessitant une interprétation prudente des résultats positifs faibles, au delà de 36 CT.