

# Les Liquides Céphalo-Rachidiens: conservation pré-analytique à +4 °C ou -20 °C ?



V. JACOMO, O. SCHAAL, P. FOURNIER  
Département des Maladies Infectieuses | Laboratoire Biomnis, Lyon.

## ABSTRACT

Afin de vérifier l'impact des conditions pré-analytiques de température, de transport et de conservation sur la sensibilité de détection par PCR en temps réel sur les Liquides Céphalo-Rachidiens, huit virus neurotropes ont été testés : Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, virus Varicelle Zona, polyomavirus JC, polyomavirus BK, Morbillivirus, Enterovirus et 3 bactéries potentiellement responsables d'atteintes neurologiques centrales : *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi* et *Listeria monocytogenes*. Deux températures de conservation ont été évaluées en parallèle +4 °C (+/-2 °C)

et -20 °C (+/-2 °C) et les essais menés à J0, J7, J14 ; J21 et J 60 de conservation des prélèvements à ces 2 températures.

Pour chaque micro-organismes, la variation des Cycles Threshold au cours du temps et pour les 2 températures testées a été évaluée. Les résultats démontrent qu'il n'existe pas de différence de sensibilité des PCR entre les températures de conservation de +4 °C ou de -20 °C. Le délai de conservation à l'une ou l'autre de ces températures n'impacte pas la sensibilité jusqu'à 2 mois après la date du prélèvement.

## INTRODUCTION

Le respect des conditions pré-analytiques pour la réalisation de PCR à partir de Liquides Céphalo-Rachidiens (LCR) et nécessitant un délai avant technique est fondamental.

Il n'existe pas de recommandations précises [1]. Ces conditions sont généralement guidées par des recommandations destinées à des laboratoires in situ, par des ouvrages parfois anciens, n'ayant pas toujours évolué avec la

généralisation des techniques de biologie moléculaire, souvent dogmatiques.

L'objectif de cette étude est de démontrer l'absence d'impact de la conservation pré-analytique des LCR sur la sensibilité de détection par PCR des virus et bactéries neurotropes, entre +4 °C (+/- 2), comparativement à la conservation congelée à -20 °C (+/- 2).

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Huit virus et bactéries neurotropes ont été testés. Cytomegalovirus (CMV), Herpes Simplex Virus 1 (HSV1), Herpes Simplex Virus 2 (HSV2), virus Varicelle Zona (VZV), virus JC, virus BK, Enterovirus, Morbillivirus (rougeole), *Listeria monocytogenes*, *Treponema pallidum* et *Borrelia burgdorferi*.
- La dilution retenue pour les tests est celle pour laquelle un résultat faiblement positif a été obtenu, avec une détection tardive par PCR avec des Ct compris entre 33 et 35 cycles.

- Les PCR ont été réalisées à J0, J7, J14, J21 et J60. (J0 étant le jour de réception au laboratoire).
- L'extraction a été réalisée par l'automate d'extraction Magnapure96 (Roche®), l'amplification avec le Thermocycler ABI 7500 (Life technologies®).
- Pour chacune des PCR, un bactériophage ADN M13 (BioLabs®) ou ARN MS2 (Roche®)[2] a été ajouté.
- Chaque paramètre a été testé 8 fois.

## RÉSULTATS

Les résultats des moyennes des Ct obtenus sur 8 essais, pour chacun des paramètres testés sont résumés dans le tableau 1.

Les courbes d'évolution des Ct au cours du temps pour les 2 températures

Micro-organisme		J0	J7 +4°C	J7 -20°C	J14 +4°C	J21 +4°C	J21 -20°C	2 mois +4°C
HSV1	moyenne	32,5	32,23	32,46	32,28	32,25	32,09	32,18
	écart type	0,38	0,19	0,38	0,31	0,2	0,4	0,45
	différence ct/J0	0	-0,27	0,23	-0,22	-0,25	-0,41	-0,32
HSV2	moyenne	32,01	32,45	32,46	32,03	32,23	30,85	31,53
	écart type	0,33	0,26	0,13	0,2	0,26	0,1	0,19
	différence ct/J0	0	-0,27	0,45	0,02	0,22	-1,16	-0,48
VZV	moyenne	33,48	33,98	33,77	33,46	34,98	34,88	34,21
	écart type	0,12	0,11	0,23	0,21	0,33	0,33	0,24
	différence ct/J0	0	0,5	0,29	-0,02	1,5	1,4	0,73
JC	moyenne	31,86	31,72	31,97	31,08	31,3	31,48	31,01
	écart type	0,15	0,16	0,19	0,15	0,2	0,13	0,18
	différence ct/J0	0	-0,14	0,11	-0,78	-0,56	-0,38	-0,85
Borrelia	moyenne	34,83	34,54	34,66	34,79	34,51	34,91	34,43
	écart type	0,07	0,09	0,21	0,13	0,13	0,16	0,2
	différence ct/J0	0	-0,29	-0,17	-0,04	-0,32	0,08	-0,4
Treponema	moyenne	33,47	34,23	34,39	34,56	33,07	33,33	34,1
	écart type	0,27	0,23	0,32	0,18	-0,37	0,3	0,21
	différence ct/J0	0	0,76	0,92	1,09	-0,4	-0,14	0,63
Listeria	moyenne	32,76	32,76	32,78	32,8	32,9	32,57	32,21
	écart type	0,36	0,28	0,2	0,19	0,23	0,24	0,42
	différence ct/J0	0	0	0,02	0,04	0,14	-0,19	-0,55
CMV	moyenne	34,71	36,3	36,18	34,76	35,42	35,1	35,47
	écart type	1,3	0,52	1,28	0,41	0,49	0,52	0,43
	différence ct/J0	0	1,59	1,47	0,05	0,71	0,39	0,76
BKV	moyenne	30,11	29,62	30,08	29,26	29,44	29,65	29,63
	écart type	0,15	0,1	0,23	0,97	0,1	0,07	0,36
	différence ct/J0	0	-0,49	-0,03	-0,85	-0,67	-0,46	-0,48
Rougeole	moyenne	35,41	30,46	35,52	33,57	33,56	40,96	32,61
	écart type	0,4	0,17	0,44	0,23	1,16	3,66	0,27
	différence ct/J0	0	-4,95	0,11	-1,84	-1,85	5,55	-2,8
Enterovirus	moyenne	35,28	33	33,1	32,93	31,23	33,74	32,47
	écart type	0,32	0,26	0,33	0,36	0,13	0,29	0,31
	différence ct/J0	0	-2,28	-2,18	-2,35	-4,05	-1,54	-2,81

Tableau 1 : résultats des Ct (moyenne sur 8 essais) pour chacun des micro-organismes testés. Valeur des écart-types et des différences de Ct avec J0

testées ont été tracées pour chaque agent pathogène, et comparées à la valeur cible de Ct correspondant à celle du J0. Les bornes acceptables de +/- 1.5 Ct (0.5 log) par rapport au Ct cible sont également reportées sur les courbes afin de visualiser la sensibilité de la PCR (pour exemples figure 1 et 2).

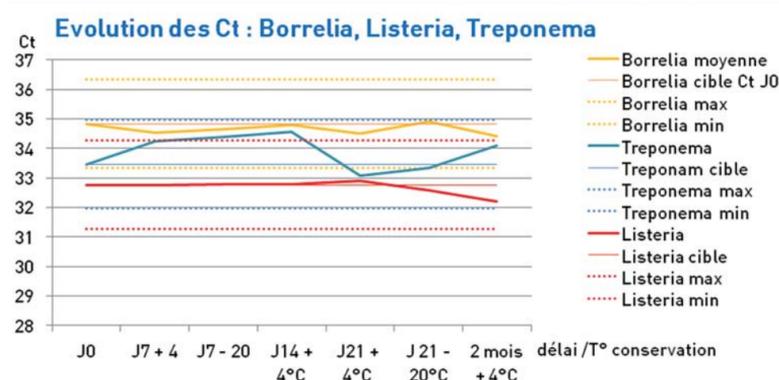


Figure 1 : évolution des Ct au cours du temps et avec les 2 températures pour *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes* et *Treponema pallidum*

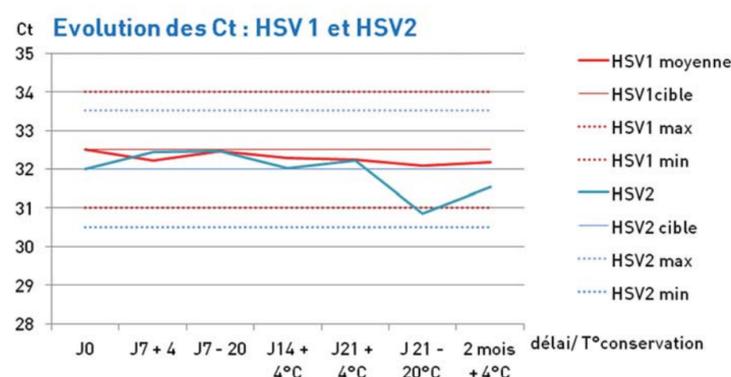


Figure 2 : évolution des Ct au cours du temps et avec les 2 températures pour Herpes Simplex Virus 1 et 2

## DISCUSSION

La valeur des Ct obtenue ne présente pas d'augmentation au cours du temps et jusqu'à 2 mois après conservation du prélèvement à +4 °C. Des variations sont observées mais sont non significatives car ne dépassant pas 1.5 Ct d'augmentation.

Pour VZV et CMV, il est observé une augmentation supérieure à 1.5 Ct après 21 jours et 7 jours, pour les 2 températures de conservation ; cette baisse de

sensibilité n'est pas confirmée à 2 mois. Il existe donc d'autres paramètres susceptibles de modifier la sensibilité des résultats de la PCR pour ces virus.

Pour le virus de la rougeole, 2 valeurs de Ct sont en dehors des bornes acceptables et sont dues à des interférences d'autres natures (problème lors de la congélation, problème de pipetage...) car il n'existe pas de tendance à la baisse de sensibilité et les valeurs sont corrigées dans le temps.

## CONCLUSION

Il n'a pas été observé d'impact de la température de conservation pré-analytique des LCR au cours du temps à +4°C et -20°C sur les résultats de PCR. La conservation pré-analytique à +4 °C n'induit pas de baisse de la sensibilité de la PCR, jusqu'à 2 mois.

La stabilité des microorganismes serait peut être plus liée à la nature de prélèvement plutôt qu'aux conditions de température [3- 4]. L'impact des conditions pré-analytiques sur d'autres matrices, et sur les différents microorganismes susceptibles d'y être retrouvés devra être étudié.

### Références

1- REMIC, V Edition tome 1. 2015 : 27-31  
2- J Dreier et al. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription PCR assays. J Clin Microbiol 2005 43(9): 4551-4557

3- A.V. Villanueva et al. Effects of Various Handling and Storage Conditions on Stability of *Treponema pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid. J Clin Microbiol 1998, 7; 2117-2119  
4- X. Wang et al. Stability of infectivity of novel pandemic influenza A (H1N1) virus in blood-derived matrices under different storage conditions. BMC Infect Dis 2011; 11: 354.