

# M 20. PCR sur LCR : jusqu'à quand ? Et à quelle température préanalytique ?

## ABSTRACT

Nous souhaitons vérifier l'impact de la modification de 2 variables préanalytiques (température de conservation, et durée de stockage d'un prélèvement) sur les performances d'une PCR en temps réel de détection d'agents pathogènes sur les Liquides Céphalo-Rachidiens. Nous avons donc comparé les résultats de la PCR à J0, J7, J14, J21 et J60, à 2 températures de conservation différentes (+4°C et -20°C). Les pathogènes testés sont huit virus neurotropes (CMV, HSV 1 et 2, VZV, JC et BK virus, virus des oreillons, entérovirus) et 3 bactéries responsables d'atteinte neurologiques centrales (*Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi* et

*Listeria monocytogenes*). Pour chaque micro-organisme, la variation des Ct (Cycles Threshold) de chaque PCR a été évaluée au cours du temps par rapport à J0 et pour les 2 températures testées.

Les résultats démontrent qu'il n'existe aucune modification de la sensibilité de détection des pathogènes testés avec ces différentes variables préanalytiques : 4°C ou à -20°C, et jusqu'à 2 mois après la date du prélèvement. Ces nouvelles données pourraient donc être utiles en cas d'impossibilité de stockage à -20 degrés, ou si l'analyse doit être différée dans le temps.

## INTRODUCTION

Les conditions préanalytiques jouent un rôle principal dans la qualité du résultat d'une analyse biologique. Des recommandations existent [1], mais sans réelles larges études publiées sur l'impact d'une modification de ces paramètres. De plus, avec les contraintes actuelles de Qualité et d'accréditation, certaines analyses peuvent se voir refusées en cas de non-respect des exigences

préanalytiques, ce qui peut contribuer à la perte de chance pour le patient.

L'objectif de cette étude est de démontrer l'absence d'impact de la conservation préanalytique des LCR sur la sensibilité de détection par PCR des virus et bactéries neurotropes, à +4°C ou -20°C, et cela à J0, J7, J14, J21 et J60.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Huit virus et bactéries neurotropes ont été introduits dans des LCR stériles : Cytomégalovirus (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*.
- L'extraction a été réalisée par MagNaPure 96 (Roche®) et l'amplification

avec le Thermocycler ABI 7500 (Life technologies®), avec un bactériophage ADN M13 (BioLabs®) ou ARN MS2 (Roche®) [2]

- Les PCR ont été réalisées à J0, J7, J14, J21 et J60 (J0 étant le jour de réception au laboratoire). Chaque paramètre a été testé 8 fois.
- Un écart-type de variation de Ct moyen supérieur à 1,5 (0.5 log) sera considéré comme significatif.

## RÉSULTATS

Les résultats des Ct (moyenne sur 8 essais), des écart-types et des différences de Ct avec J0 pour les 11 pathogènes testés sont résumés dans le tableau 1.

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

testées ont été déterminées pour chaque 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 (figure 1 et 2)

Micro-organisme		J0		J7		J14		J21		J60	
		+4°C	-20°C	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C	+4°C	-20°C
HSV1	Ct moyen	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	Ct moyen	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	Ct moyen	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	Ct moyen	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			
CMV	Ct moyen	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	Ct moyen	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	Ct moyen	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	Ct moyen	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			
Borrelia	Ct moyen	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	Ct moyen	33,47	34,23	34,39	34,56	33,07	33,33	34,1			
	écart type	0,27	0,23	0,32	0,18	-33,47	0,3	0,21			
	différence ct/J0	0	0,76	0,92	1,09	-0,4	-0,14	0,63			
Listeria	Ct moyen	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			

Tableau 1 : Résultats des Ct (moyenne sur 8 essais), des écart-types et des différences de Ct avec J0 pour les 11 pathogènes testés.

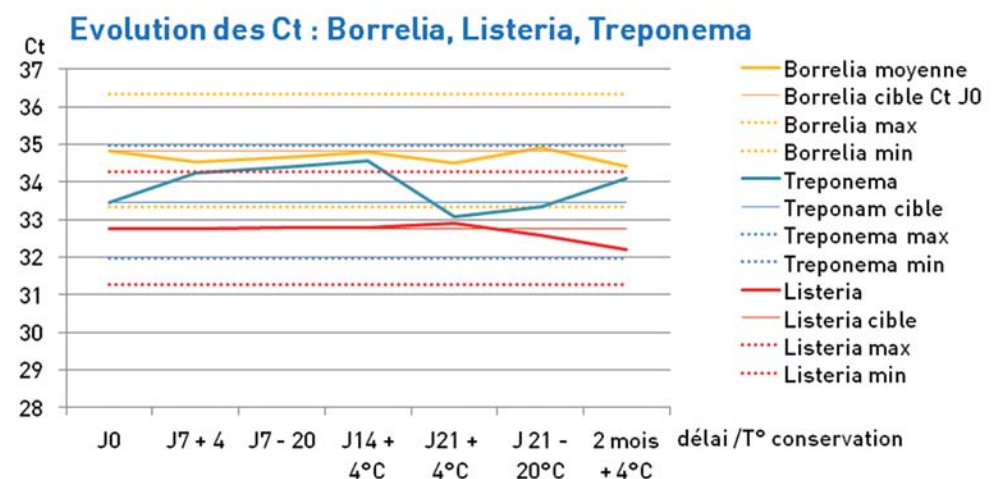


Figure 1 : évolution des Ct au cours du temps et avec les 2 températures pour *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes* et *Treponema pallidum*.

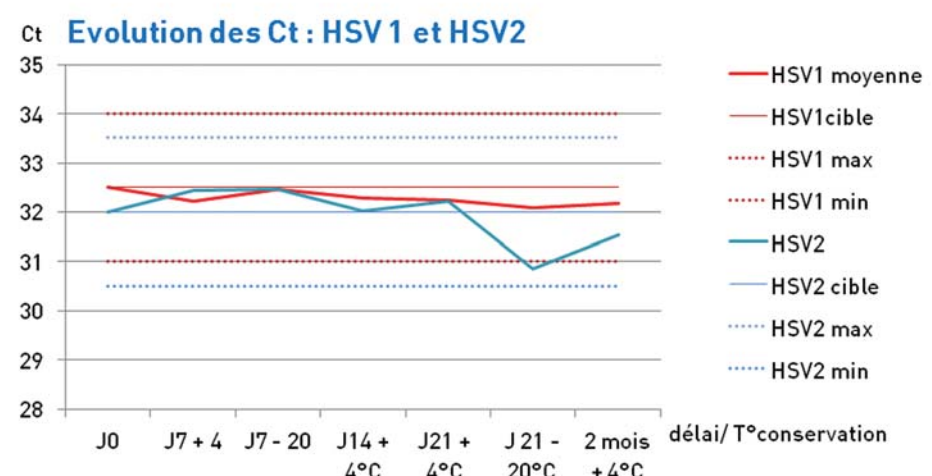


Figure 2 : évolution des Ct au cours du temps et avec les 2 températures pour Herpes Simplex Virus 1 et 2

## DISCUSSION

La valeur obtenue des Ct 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.

Pour le virus de la rougeole, 2 valeur 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 par exemple) car il n'existe pas de tendance à la baisse de sensibilité, et les valeurs sont corrigées dans le temps. Il existe donc d'autres paramètres susceptibles de modifier la sensibilité des résultats de la PCR pour ces virus.

## CONCLUSION

Les 2 paramètres préanalytiques évalués (température ambiante ou congélation à -20°C) n'ont aucun impact sur la détection des 11 pathogènes testés, et ce jusqu'à 2 mois après la date du prélèvement.

Cette nouvelle donnée pourra être utilisable en cas de nécessité de délai dans la prise en charge de l'analyse, ou en cas de conservation préalable hors laboratoire d'analyse. 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 préanalytiques 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.