



Recommandations destinées aux professionnels de santé concernant les conditions d'acheminement et de stockage du liquide amniotique en vue du diagnostic prénatal de la toxoplasmose

Rédaction : Hélène Yera et Patrick Bastien.

Avec la participation des membres du Pôle Biologie Moléculaire du CNR de la Toxoplasmose : Marie-Pierre Brenier-Pinchart, Sophie Cassaing, Frédéric Dalle, Laurence Delhaes, Denis Filisetti, Jean Menotti, Hervé Pelloux, Florence Robert-Gangneux, Yvon Sterkers, Feriel Touafek et Emmanuelle Varlet-Marie.

Mise à jour du 15-04-2013.

1- Pratiques : résultats de l'enquête « Pratiques de PCR-Toxoplasmose en diagnostic prénatal »

Une enquête a été menée en juillet 2007 par le Pôle "Biologie Moléculaire" du CNR de la Toxoplasmose. Elle a été envoyée par courriel aux 28 laboratoires de Parasitologie participant au Contrôle de Qualité national en PCR-*Toxoplasma*. Vingt-un laboratoires ont répondu.

Conditions d'acheminement des échantillons de liquide amniotique (LA) :

Le transport se faisait à température ambiante pour 20 laboratoires, et à +4°C pour un seul laboratoire. Trois signalaient qu'ils recevaient les LA à +4°C s'ils avaient une provenance extra-CHU. Aucun antibiotique n'était rajouté dans les LA avant acheminement.

Stockage des LA avant analyse :

Le stockage des LA avant analyse était de durée très variable : de 0 heure (extraction immédiate) à 7 jours. Le délai entre la réception et le prétraitement (pré-analytique) du LA était de moins de 24h pour la moitié des laboratoires (13 /22).

2- Etudes référencées

Peu d'études sur le sujet. Une seule étude a été retrouvée : elle teste la **conservation du LA (non lyophilisé) en vue du diagnostic moléculaire** (Joss & Ho Yen, J Med Microbiol1997). Cette étude sur du LA artificiellement infecté avec des toxoplasmes (souche RH) conclut à une conservation du LA sans aucun prétraitement pendant 14 jours à température ambiante ou pendant au moins 7 jours à +4°C dans le cas où la concentration de toxoplasmes est > 16 tachyzoites/ ml. Méthodes d'extraction : ébullition pendant 15 min, précédée ou non d'un prétraitement à la protéinase K pendant 2h. PCR nichée. Cible B1. Concentrations de toxoplasmes testées : 1600, 160, 80, 32 et 16 tachyzoites/ ml. Conservation du LA : à température ambiante pendant 7 jours puis 14 jours, et à 4°C pendant 7 jours.

Résultats : pas de perte évidente de sensibilité (résultats qualitatifs) par rapport à J0 quel que soit la méthode d'extraction ou la température.

Inconvénients de cette étude : utilisation d'une PCR nichée et étude qualitative uniquement. Une étude, ainsi que des données du CNR, existent sur la conservation du LA lyophilisé en vue du diagnostic moléculaire (Kaiser et al., Clinica ChimicaActa 2007) ; nous ne les avons pas retenues pour ces recommandations.



3- Expériences au sein du Groupe de travail

- Cochin : Un échantillon de LA prélevé 12 jours auparavant et conservé probablement à +4°C. Transport probablement à température ambiante. PCR et inoculation à la souris positives. Toutefois, la souche isolée est virulente pour la souris (souris mortes en 3-4 semaines lors de la primo-culture et en 10 jours lors de la subculture). La conservation de cette souche dans le LA pendant 12 jours pourrait être en relation avec sa virulence chez la souris (génotype atypique, Yera et al., *Acta Tropica* 2014).
- Montpellier : Une étude ancienne à Montpellier (données non retrouvées) avait testé les LA de patientes conservés stérilement à +4°C pendant plusieurs mois (environ 50 LA). Les LA positifs étaient restés positifs (résultats qualitatifs uniquement) et les négatifs étaient restés négatifs.
- De ces deux expériences, il est possible d'observer que les toxoplasmes peuvent rester vivants pendant 12 jours à +4°C et que l'ADN du parasite se conserve pendant plusieurs mois à +4°C dans le LA primaire. Toutefois, on ne peut pas dire si le signal (nombre de toxoplasmes vivants et quantité d'ADN cible) a baissé en intensité.

4-Recommandations sur les conditions d'acheminement et de stockage du LA avant prétraitement

Au vu des données disponibles, le Pôle Biologie moléculaire du CNR peut faire les recommandations suivantes :

- Les LA peuvent être acheminés à température ambiante, si possible rapidement (dans les 24 heures) sans antibiotiques ajoutés.
- En cas de délai d'acheminement supérieur (> 24 h), un transport à +4°C est conseillé, même si quelques données (ci-dessus) montrent que la conservation du LA pendant 14 jours à température ambiante n'affecte pas le résultat qualitatif de la PCR pour une concentration de toxoplasmes >16 / ml.
- Le stockage du LA en dehors du transport et en pré-analytique doit se faire à +4°C.
- Les échantillons peuvent être prétraités pour la PCR par centrifugation et les culots conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.
- L'inoculation à la souris doit être effectuée sans congélation dans les 72h qui suivent le prélèvement. Ce délai peut être prolongé, mais en l'absence d'études, le CNR ne peut pas se prononcer sur la validité de l'analyse dans ces conditions.
- En cas de délai supérieur (jusqu'à 8 jours pour l'inoculation et 15 jours pour la PCR), les examens peuvent être effectués mais les résultats négatifs doivent être rendus avec la réserve suivante : "Du fait du non-respect du pré-analytique, les résultats négatifs ne permettent pas d'exclure une toxoplasmose congénitale".