

Date : 22/03/2018 au 31/05/2018

Intitulé de l'étude : Etude de la stabilité pré-analytique de la procalcitonine (PCT) sur sang total avec Héparinate de Lithium ou EDTA

Responsable(s) de l'étude : Claudio ILARDO, Cécile REYNAUD, Régine BONNETON

∞ ∞ ∞ ∞ ∞

1-Introduction :

La procalcitonine (PCT) est une hormokine, contraction d'hormones et de cytokines. En condition physiologique, la procalcitonine est sécrétée par les cellules C de la thyroïde, puis rapidement métabolisée en calcitonine pour être stockée dans la glande thyroïde. Sous l'effet direct d'endotoxines ou indirect de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β) rencontrées lors d'infections bactériennes la procalcitonine est également sécrétée par diverses cellules parenchymateuses telles que les hépatocytes, les myocytes, les adipocytes ou les cellules rénales. Depuis vingt ans, de nombreuses études ont cherché à évaluer son utilité clinique notamment pour distinguer une infection bactérienne d'un processus inflammatoire ou d'une infection non bactérienne [1]. Des études montrent que l'initiation ou la poursuite d'une antibiothérapie pour le traitement des infections des voies respiratoires basses n'est pas conseillée si la PCT est inférieure à 0,5 ng/mL et au contraire préconisée pour des valeurs supérieures à 0,5 ng/mL [2]. De même, le seuil décisionnel de 0,5 ng/mL est le seuil retenu pour les infections bactériennes systémiques: bactériémie, méningite [3].

Dans ce contexte, l'intégrité pré-analytique de la PCT est un élément essentiel de son dosage. Il a été démontré que la PCT est stable jusqu'à 4 jours à 4 °C dans le plasma recueilli sur tube héparinate de lithium centrifugé et décanté [4]. Après plusieurs années de conservation (3 à 5 ans) à - 80 °C, Schuetz *et al.* ont observé une diminution de la concentration sérique d'environ 10 % [5]. Jusqu'à présent le fournisseur Radiometer ® préconisait une analyse dans les 3 heures pour les échantillons conservés à une température ambiante de 18-25°C et 24h pour un plasma séparé rapidement et conservé entre 2 et 8°C [6]. En 2014, l'étude menée par Goode *et al.* [7] ne révèle aucune dégradation de la PCT plasmatique conservée à température ambiante pendant 72h. Plus récemment Mine *et al.* ont démontré une stabilité *in vitro* de 24h sur sang total EDTA ou héparine conservé à température ambiante [8]. L'objectif de cette étude est d'évaluer la stabilité pré-analytique de la PCT sur sang total EDTA et héparinate de lithium à température ambiante (15-25 °C) afin d'assurer une bonne prise en charge de nos échantillons.

2-Échantillons et recueil :

L'étude est réalisée à partir de patients du laboratoire. En accord avec l'article L.1211-2 du CSP 2ème alinéa et l'article L.1221.8 du CSP, chaque patient est informé à l'aide d'une affiche, que le laboratoire est susceptible d'utiliser les surplus d'échantillons dans le cadre d'études des performances des DMDIV. Il est notifié que le patient peut refuser en s'adressant aux responsables du laboratoire agréé.

Durant la période du 22 mars au 31 mai 2018 ont été inclus dans notre étude 21 échantillons de patient avec une prescription de PCT. Pour chaque patient, il a été prélevé un tube EDTA et un tube héparinate de lithium. Après une évaluation rapide de la PCT (T0h), la stabilité de la PCT a été étudiée après une conservation, sur sang total, de 8h et de 24 h à température ambiante.

Les résultats devront couvrir l'ensemble de la gamme de mesure et notamment autour du seuil décisionnel (0,5 ng/mL).

3-Enregistrement et identification :

Chaque échantillon est identifié manuellement.

4-Protocole :

Les performances analytiques du dosage de la PCT sur AQT90 FLEX® ont été évaluées selon le protocole de validation de technique de la Société française de biologie clinique et conformément aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 : 2012 [9].

Les dosages sont réalisés par séries, encadrées par plusieurs contrôles internes de qualité de la société Radiométer® (2 niveaux). Des évaluations externes de la qualité fournies par ProBioQual® sont régulièrement évaluées pour chaque paramètre.

Le domaine de mesure est compris entre 0,12 et 100 µg/L

5-Matériel :

- Les échantillons sont collectés sur tube EDTA et tube Héparinate de Lithium de chez BD Vacutainer®
- Automate AQT90 FLEX de chez Radiometer®
- Trousse réactif PCT test Kit ref 92-964 de chez Radiometer®
- CIQ Radiometer®
- EEQ Probioqual®

6-Analyse statistique :

Les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel XLSTAT de la société Addinsoft®.

Un test de Shapiro-Wilk est effectué pour tester la normalité des distributions des taux obtenus. Dans la mesure où la distribution ne suit pas une loi normale, la comparaison entre les populations est évaluée à partir d'un test de Mann et Whitney.

Les corrélations sont évaluées à l'aide d'une régression linéaire et du calcul du coefficient de corrélation (r). La concordance des séries est étudiée par la méthode de Bland et Altman [10], en utilisant des limites de suivi (LS) fixées à partir de normes d'écart-type de fidélité intermédiaire (σ_{FI}) acceptables provenant de la SFBC [8]. Les limites de suivi sont calculées comme suit: $LS = \pm 4.24 \sigma_{FI}$ pour chaque niveau de concentration. Les fidélités intermédiaires retenues pour le calcul des limites de suivi sont de 10 % autour de 0,2 ng/mL et de 5% pour 0,5 ng/mL et 5 ng/mL.

7-Résultats:

Tableau I : Statistique descriptive de la stabilité *in vitro* sur Héparinate de lithium

Statistique	Héparine T0h	Héparine T8h	Héparine T24h	Mann et Whitney T0h versus T8h	Mann et Whitney T0h versus T24h	Biais analytique moyen T0h versus T8h	Biais analytique moyen T0h versus T4h
Nb d'observations	21	21	21	p-value 1,000	p-value 0,811	-0,71%	-7,08%
Minimum	0,120	0,120	0,120				
Maximum	15,000	15,000	15,000				
1er Quartile	0,290	0,290	0,300				
Médiane	0,640	0,630	0,630				
3ème Quartile	1,900	1,900	2,100				
Moyenne	1,774	1,794	1,844				
Variance (n-1)	10,513	10,582	10,632				
Ecart-type (n-1)	3,242	3,253	3,261				

Tableau II : Statistique descriptive de la stabilité *in vitro* sur EDTA

Statistique	EDTA T0h	EDTA T8h	EDTAT 24h	Mann et Whitney T0h versus T8h	Mann et Whitney T0h versus T24h	Biais analytique moyen T0h versus T8h	Biais analytique moyen T0h versus T4h
Nb d'observations	21	21	21	p-value 0,94	p-value 0,87	-1,63%	-6,50%
Minimum	0,120	0,120	0,120				
Maximum	14,000	15,000	14,000				
1er Quartile	0,290	0,320	0,320				
Médiane	0,680	0,690	0,720				
3ème Quartile	2,000	2,000	2,200				
Moyenne	1,761	1,820	1,831				
Variance (n-1)	9,336	10,540	9,351				
Ecart-type (n-1)	3,056	3,246	3,058				

Figure 1 : Graphique de différence sur tube Héparinate de lithium

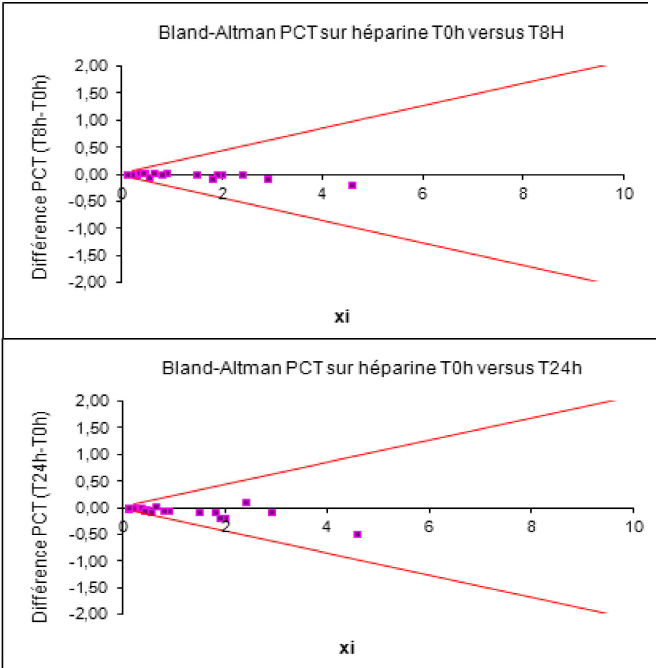
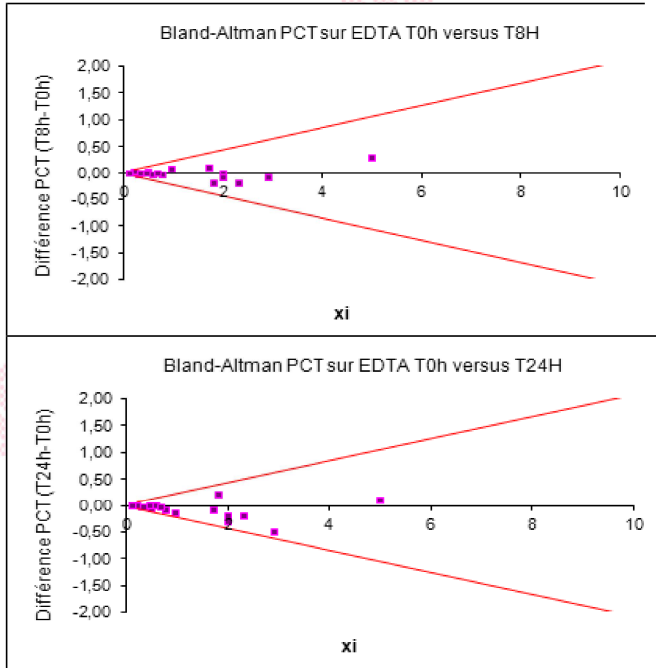


Figure 2 : Graphique de différence sur tube EDTA



8-Discussion :

Compte tenu du seuil décisionnel clinique à 0,5 ng/mL, nous avons porté une attention particulière à la zone de concentration comprise entre 0,12 et 1 ng/mL. L'analyse des graphes de Bland-Altman (figures 1 et 2) confirme la bonne corrélation sur les deux natures d'anticoagulant entre T0h, T8h et T24h.

Le biais analytique moyen est compris entre -0,7 % et -7%. L'ensemble des points étudiés reste dans les limites de suivi. Les concentrations en PCT des 21 échantillons étudiés s'étendent de 0,12 à 15 ng/mL. Les régressions linéaires de la concentration en PCT entre T0h et T24h montrent une bonne corrélation sur toute la gamme étudiée, et ce, quelle que soit la nature de l'anticoagulant (sur tube hépariné: $r = 0,999$; $y = 1,005 - 0,062$ et sur tube EDTA : $r = 0,999$; $y = 0,997 + 0,008$).

L'analyse statistique (tableaux I et II) montre des valeurs strictement comparables entre le 1^{er} quartile et la médiane (0,29 et 0,68 ng/mL). Entre T0h et T24h, on note une légère surestimation (autour de 10 %) pour les valeurs se situant au 3^{ème} quartile (2 ng/mL). En 1977, Meisner et *al.* [11] avaient déjà décrit ce phénomène d'augmentation de la concentration en PCT quelques heures après le prélèvement. Ces auteurs ont émis plusieurs hypothèses dont le « fresh-plasma-effect » lié à un phénomène de relargage, ou une dégradation de la procalcitonine en plus petits fragments qui augmenterait l'affinité vis-à-vis des anticorps réactionnels.

Pour les deux natures d'anticoagulant, aucune différence statistique significative à T0 *versus* T24h n'est mise en évidence par le test non paramétrique de Mann et Whitney ($p_{(\text{héparine})} = 0,811$; $p_{(\text{EDTA})} = 0,87$).

En tenant compte du seuil de décision de 0,5 ng/mL, les résultats de cette étude indiquent que la mesure du taux de PCT, 24h après le recueil, n'a pas d'impact sur l'interprétation thérapeutique. Ces travaux révèlent une stabilité *in vitro* de la PCT, collectée sur tube hépariné ou EDTA et conservée à température ambiante jusqu'à 24 h. La dispersion géographique de notre patientèle ne permet pas toujours d'être dans des délais pré-analytiques inférieurs à 3 heures (recommandations du fournisseur Radiometer®). Ce résultat important permet dorénavant d'accepter une demande d'examen biologique pour le dosage de la PCT dans des conditions pré-analytiques supérieures aux recommandations du fournisseur et en adéquation avec notre territoire de santé.

9-Conclusion :

Sur sang total et sans traitement pré-analytique, la PCT prélevée sur tube hépariné de lithium et EDTA est stable à température ambiante jusqu'à 24h.

10-Références bibliographiques :

1. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993;341:515-8.
2. Schuetz P, Christ-Crain M, Thomann R, Falconnier C, Wolbers M, Widmer I, *et al.* Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections. The ProHOSP Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2009 ; 302 : 1059-66
3. Riedel S. Procalcitonin and the role of biomarkers in the diagnosis and management of sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 ; 73 : 221- 7.
4. Steinbach G, Rau B, Debard A-L, Javourez J-F, Bienvenu J, Ponzio A, *et al.* Multicenter evaluation of a new immunoassay for procalcitonin measurement on the Kryptor System. *Clin Chem Lab Med* 2004 ; 42 : 440-9.
5. Schuetz P, Christ-Crain M, Huber A, Müller RB. Long term stability of procalcitonin in frozen samples and comparison of Kryptor® and Vidas® automated immunoassays. *Clin Biochem* 2010 ; 43 : 341-4.
6. Fiche technique Radiometer ® AQT90 flex PCT test Kit, code number 996-390 version 10709E
7. Goode KM, Nicholls R, Pellicori P, Clark AL, Cleland JGF. The in vitro stability of novel cardiovascular and sepsis biomarkers at ambient temperature. *Clin Chem Lab Med* 2014 ; 52 : 911-8.
8. Mine L, Petit M, Nivet-Antoine V, Beaudeau JL, Hennequin C. Dosage de la procalcitonine (PCT) en microméthode sur analyseur AQT90 FLEX® et étude de la stabilité *in vitro*. *Ann Biol Clin* 2018 ; 76(1) : 53-9 doi:10.1684/abc.2017.1308
9. Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J. Giroud C, et les membres du sous-groupe 2 analytique de la SFBC. Vérification/validation des performances d'une méthode d'analyse. *Ann Biol Clin* 2010 ; 68 : 247-94.
10. Bland JM, Altman DG : Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1, 307-10, 1986.
11. Meisner M, Tschaikowsky K, Schnabel S, Schmidt J, Katalinic A, Schüttler J. Procalcitonin, influence of temperature, storage, anticoagulation and arterial or venous asservation of blood samples on Procalcitonin concentrations. *Eur J Clin Chem Biochem* 1997; 35 (8): 597-601.