Article original

Ann Biol Clin 2018 ; 76 (1) : 53-9

Dosage de la procalcitonine (PCT) en microméthode sur analyseur AQT90 FLEX® et étude de la stabilité *in vitro*

Determination of procalcitonin (PCT) in micro-method on AQT90 FLEX® analyzer and in vitro stability study

Louis Mine
Morgane Petit
Valérie Nivet-Antoine
Jean-Louis Beaudeux
Carole Hennequin

Laboratoire de biochimie générale, Hôpital universitaire Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France
<carole.hennequin@aphp.fr>

Résumé. La société Radiometer® propose le dosage de la PCT sur sang total en microméthode à l'usage de la biologie délocalisée sur l'automate AQT90 FLEX®. Nous avons vérifié les performances analytiques de cet automate en macrotube hépariné et microtube EDTA pour l'usage pédiatrique selon le protocole de la Société française de biologie clinique (SFBC) modifié conformément aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 : 2012. Les échantillons (n = 61 ; 30 macrotubes ; 31 microtubes) ont été analysés par la méthode de référence sur Brahms Kryptor Compact Plus® *vs* l'automate AQT90 FLEX®. Dans un second temps, avons étudié la stabilité de la PCT à température ambiante pendant 24 h. Une bonne corrélation entre les deux méthodes, que ce soit sur macro- ou microtubes, est observée (respectivement r = 0,990 et 0,993). Les représentations de Bland-Altmann confirment l'excellente corrélation avec néanmoins un déviant, au-delà des normes d'acceptabilité définies selon la norme ISO 5725-6, pour chaque type de tubes et pour les deux gammes de concentrations (inférieure et supérieure à 1 ng/mL). Les biais observés n'affectent pas la décision clinique. Aucune dégradation de la PCT après 24 h n'a été mise en évidence par le test de Mann et Whitney sur macro- et microtubes (p = 0,50 et 0,34 respectivement). En conclusion, la détermination de la PCT sur AQT90 FLEX® présente des caractéristiques analytiques satisfaisantes et peut être utilisée en biologie délocalisée sur sang total, sans traitement pré-analytique. En macrotube hépariné et microtube EDTA, la PCT est stable à température ambiante jusqu'à 24 h.

Mots clés : *PCT, AQT90 FLEX, microméthode, stabilité*

Abstract. Radiometer® has developed a point-of-care test for fast PCT measurement on whole blood in micromethod on a AQT90 FLEX® instrument. We have verified the analytical performances of the AQT90 FLEX® PCT assay in heparinized macrotube and EDTA microtube for pediatric use, according to modified French Society of Clinical Biology (SFBC) protocol to the requirements of the standard NF EN ISO 15189: 2012. The samples (n=61, 30 macrotubes, 31 microtubes) were analyzed by the Brahms Kryptor Compact Plus® reference method vs the AQT90 FLEX®. In a second step, we studied the stability of the PCT at room temperature for 24 h. A good correlation between the two methods on macro- or microtubes is observed (respectively r=0.990 and 0.993). The Bland-Altmann representations confirm the excellent correlation with a deviant, above the acceptable limit, which was calculated according to ISO 5725-6, for each type of tube and for the two concentration ranges (lower and greater than 1 ng/mL). The biases observed do not affect the clinical decision. No degradation of PCT after 24 h was demonstrated by the Mann and Whitney test on macro- and microtubes (p=0.50 and 0.34, respectively). The

Article reçu le 28 juin 2017,
accepté le 10 août 2017

Tirés à part : C. Hennequin

doi:10.1684/abc.2017.1308

determination of PCT on AQT90 FLEX® has satisfactory analytical characteristics and can be used as point-of-care testing device on whole blood without pre-analytical treatment. In heparinized macrotube and EDTA microtube, the PCT is stable at room temperature up to 24 h.

La fièvre isolée est un motif fréquent de consultation aux urgences pédiatriques. La difficulté de sa prise en charge réside dans l'absence de signes cliniques permettant l'orientation vers les étiologies bactériennes à risque de complications. Depuis plus de 10 ans, la protéine C réactive (CRP) et la procalcitonine (PCT) sont reconnues comme les deux biomarqueurs à utiliser en routine pour le diagnostic étiologique d'une fièvre isolée [1]. Plusieurs travaux ont montré que l'utilisation d'une microméthode de dosage de la CRP de façon délocalisée dans l'unité de soins (service d'accueil des urgences) permet une diminution de moitié de la durée d'hospitalisation et une diminution par 2,6 du coût moyen des examens supplémentaires suite à des prescriptions excessives associées [2]. En pédiatrie, les difficultés de prélèvement importantes et le souci de prélever de faibles volumes (épargne sanguine) conduit à l'utilisation de micro-prélèvements. La société Radiometer® (Neuilly-Plaisance, France) propose le dosage de la PCT sur sang total en microméthode à l'usage notamment de la biologie délocalisée sur l'automate AQT90 FLEX®. L'évaluation analytique de cette méthodologie a été préalablement réalisée sur macrotubes [3]. En revanche, à notre connaissance, le dosage sanguin de la PCT sur microtubes n'a pas été évalué. En complément, la stabilité de la PCT à température ambiante a été étudiée à 6 h et 24 h sur macrotubes héparinés et à 24 h sur microtubes EDTA.

Matériel et méthode

Durant la période septembre à octobre 2016, ont été inclus dans l'étude, les échantillons parvenant au laboratoire entre 7 h et 12 h avec prescription d'une PCT sur macrotube héparinate de lithium ou microtube héparinate de lithium. Dans ce second cas, une prescription de NFS (numération de formule sanguine) sur microtube EDTA était nécessaire, afin de disposer d'un microprélèvement approuvé sur l'AQT90 FLEX®. Le seul critère d'exclusion était un volume insuffisant de sang pour réaliser l'ensemble des analyses soit 750 µL.

Validation de la méthode de dosage de la PCT sur AQT90 FLEX®

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 (SFBC) modifié conformément aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 : 2012 [4]. La fidélité intermédiaire a été évaluée à l'aide de deux contrôles de qualité à 2 niveaux différents, l'un présentant une concentration basse à 0,6 ng/mL et l'autre une concentration élevée à 10 ng/mL. La comparaison de méthodes a comporté 2 volets :
– 30 échantillons ont été recueillis sur macrotubes héparinés. Le sang total était aliquoté dans 2 tubes à volumes équivalents. L'un était centrifugé puis le dosage de la PCT effectué sur Brahms Kryptor Compact Plus® (ThermoScientific, Brahms, Hennigsdorf, Germany), méthode de référence utilisée en routine dans le laboratoire. Simultanément, l'autre tube aliquote était utilisé pour le dosage de la PCT en sang total sur l'AQT90 FLEX® ;
– 31 échantillons ont été recueillis sur microtubes EDTA destinés à la détermination de la PCT sur AQT90 FLEX® en sang total, comparativement au dosage sur microtubes héparinés centrifugés sur Brahms Kryptor Compact Plus(.
Les analyseurs ont été utilisés selon les recommandations et avec les réactifs préconisés par les fournisseurs.

Étude de la stabilité de la PCT

La stabilité de la PCT a été étudiée après conservation à température ambiante des échantillons recueillis :
– sur macrotube hépariné : un nouveau dosage sur l'AQT90 FLEX® était effectué à 6 h et 24 h ;
– sur microtube EDTA : un nouveau dosage sur l'AQT90 FLEX® était effectué à 24 h (sur ce microtube, seul le délai de 24 h a été étudié pour des raisons de volume d'échantillon).
Les protocoles d'étude de la validité de l'AQT90 FLEX® et de stabilité de la PCT sur macro- et microtubes sont représentés sur les *figures 1 et 2*.
La méthode de référence pour le dosage de la PCT utilise une technique sandwich sur Brahms Kryptor Compact Plus® en phase homogène *time resolved amplified cryptate emission* (Trace), avec des anticorps monoclonaux murins anti-katacalcine conjugué au cryptate, se fixant à la région carboxyterminale et anticorps polyclonaux de mouton anti-calcitonine, se fixant à la région médiane de la PCT [5]. Cette technique présente un seuil de détection de 0,02 ng/mL. La méthode testée pour le dosage de la PCT sur l'AQT90 FLEX® utilise une technique sandwich avec des réactifs sous forme sèche dans une cupule de test. Les anticorps de capture sont biotinylés et pré-immobilisés à la

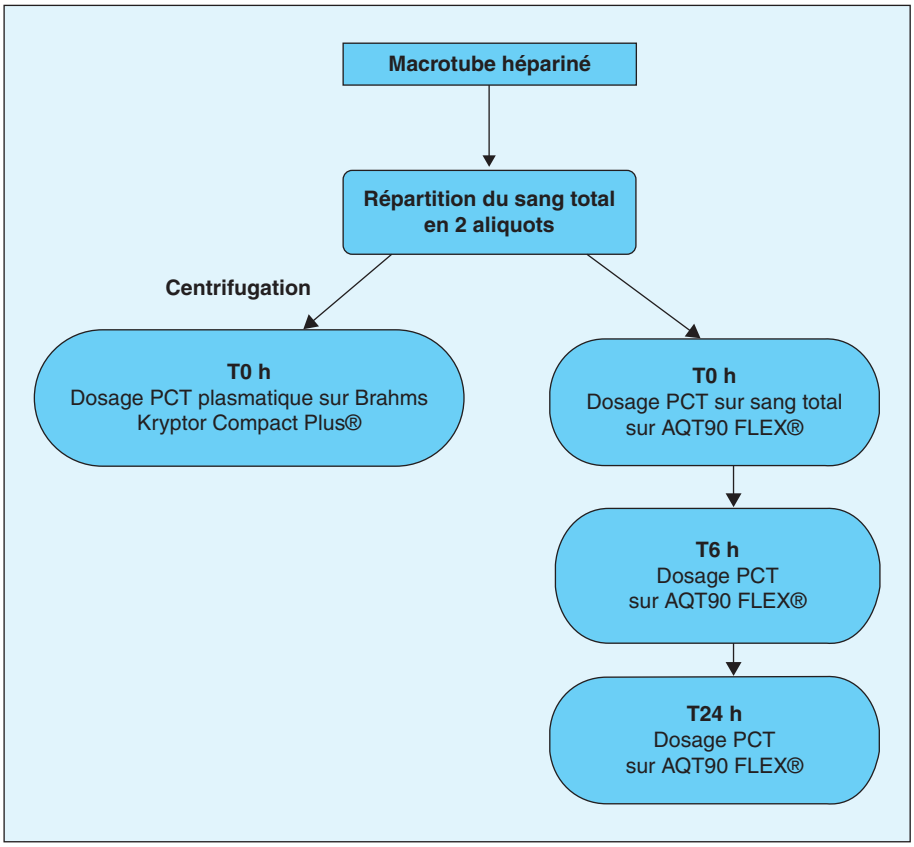

Figure 1. Protocole de validation de la PCT et étude de la stabilité en macrotube hépariné sur AQT90 FLEX®.

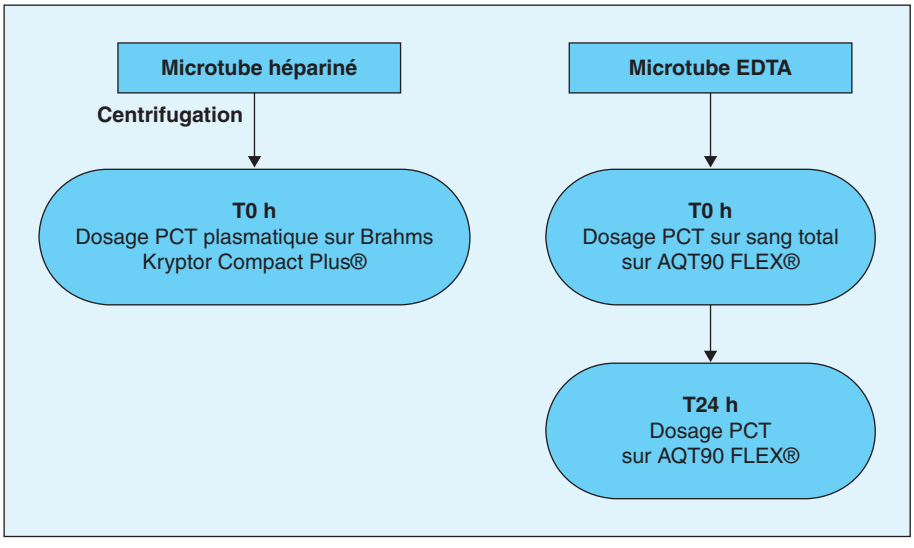

Figure 2. Protocole de validation de la PCT et étude de la stabilité en microtube EDTA sur AQT90 FLEX®.

surface de la cupule. Les anticorps traceurs utilisés pour la détection sont marqués avec un chélate d'europium et sont ajoutés aux anticorps de capture. Cette technique présente un seuil de détection de 0,12 ng/mL.

Outils d'analyse

L'exploitation des résultats obtenus sur AQT90 FLEX® comparativement à ceux obtenus sur Brahms Kryptor Compact Plus® a été réalisée par détermination de la

Tableau 1. Évaluation de la fidélité intermédiaire (moyenne, écart type et coefficient de variation) du dosage de la PCT sur AQT90 FLEX®.

	n	Moyenne (ng/mL)	ET (ng/mL)	CV (%)
Contrôle niveau 1	32	0,59	0,04	6,65
Contrôle niveau 2	32	10,59	0,18	1,73

Tableau 2. Biais moyen, écart type et valeur du test de Mann et Whitney comparativement entre les résultats de PCT analysés immédiatement (0 h) et après conservation à température ambiante 6 h et 24 h sur macrotube hépariné et 24 h sur microtube EDTA.

	Macrotube hépariné		Microtube EDTA
	T0 h *vs* T6 h	T0 h *vs* T24 h	T0 h *vs* T24 h
n	30	30	31
Biais moyen	- 0,052	0,077	- 0,571
ET	0,432	0,313	0,947
p	0,8650	0,4965	0,3421

droite de régression linéaire (Passing-Bablok) et à l'aide des graphes des différences de Bland-Altman. Les limites d'acceptabilité ont été déterminées selon la règle NF ISO 5725-6 : moyenne des différences entre les deux méthodes ± 1,96 écart type [6]. Un échantillon donnant un résultat en dehors de ces limites d'acceptabilité est qualifié de déviant. La stabilité de la PCT a été évaluée par un test non paramétrique de Mann et Whitney à T0 h vs T6 h et T24 h sur macrotube hépariné et T0 h vs T24 h sur microtube EDTA : une valeur de $p < 0,05$ a été considérée significative.

Résultats

Les spécifications de *fidélité intermédiaire* de l'AQT90 FLEX® sur les 2 niveaux de contrôles de qualité étudiés sont présentés dans le *tableau 1*.

Validation du dosage de la PCT sur AQT90 FLEX en macrotube hépariné

Les concentrations en PCT des 30 échantillons étudiés s'étendent de 0,04 à 45 ng/mL. La régression linéaire de la concentration en PCT sur AQT90 FLEX® et Brahms Kryptor Compact Plus® montre une bonne corrélation sur toute la gamme de concentration étudiée (r = 0,990 ; y = 0,813 x + 0,399). Compte tenu du seuil décisionnel clinique à 0,5 ng/mL, nous avons porté une attention particulière à la zone de concentration comprise entre 0,04 et 1 ng/mL. L'analyse des graphes de Bland-Altman confirme la bonne corrélation entre les deux méthodes. Pour des concentrations de PCT inférieures à 1 ng/mL, la moyenne des différences est de -0,044 ng/mL (ET = 0,107) avec un déviant sur dix-huit échantillons en dehors des normes d'acceptabilité définies, la valeur de la PCT observée sur AQT90 FLEX® étant surestimée par rapport à celle observée sur Brahms Kryptor Compact Plus® sans toutefois dépasser le seuil décisionnel clinique de 0,5 ng/mL (*figure 3A*). Pour des concentrations supérieures à 1 ng/mL (n = 12), un échantillon présente un biais (10,5 ng/mL) supérieur à la norme d'acceptabilité (*figure 3B*).

Validation du dosage de la PCT sur AQT90 FLEX® en microtube EDTA

Les concentrations en PCT des 31 échantillons étudiés s'étendent de 0,05 à 36 ng/mL. La régression linéaire de la concentration en PCT sur AQT90 FLEX® et Brahms Kryptor Compact Plus® montre une bonne corrélation sur toute la gamme de concentration étudiée (r = 0,993 ; y = 1,186 x – 0,053) pour l'ensemble des échantillons. Pour des concentrations en PCT inférieures à 1 ng/mL (n = 15), la moyenne des différences est de 0,161 ng/mL (ET = 0,137) avec un déviant observé, c'est-à-dire au-delà des normes d'acceptabilité définies, la valeur de la PCT observée sur AQT90 FLEX® étant surestimée par rapport à celle observée sur Brahms Kryptor Compact Plus®, de la même façon que sur macrotubes (*figure 4A*). Pour des concentrations supérieures à 1 ng/mL (n = 16), un échantillon de concentration élevée (36 ng/mL sur Brahms Kryptor Compact Plus®) présente un biais supérieur à la norme d'acceptabilité définie (*figure 4B*).

Étude de la stabilité de la PCT

Sur macrotube hépariné, aucune dégradation de la PCT plasmatique à 6 h ou 24 h comparé à 0 h n'a été mise en évidence : les résultats du test de Mann et Whitney ne montrent aucune différence significative des valeurs de la PCT à T0 h vs T6 h et T24 h (respectivement p = 0,8650 et p = 0,4965). Compte tenu du faible volume d'échantillon en microtube EDTA, seule la détermination à 24 h a été réalisée comparativement à 0 h. De même, aucune différence significative à T0 h vs T24 h n'est mise en évidence (p = 0,3421) (*tableau 2*).

Discussion

La prescription de PCT a considérablement augmenté ces dernières années, notamment dans les services d'urgence, le traitement du sepsis devant être initié idéalement dans les 3 à 6 heures après le diagnostic [7]. C'est pourquoi l'utilisation d'analyseurs de biologie délocalisée pour la détermination de la PCT est d'un grand intérêt pour réduire le délai entre prélèvement et examen. Après l'utilisation de méthode

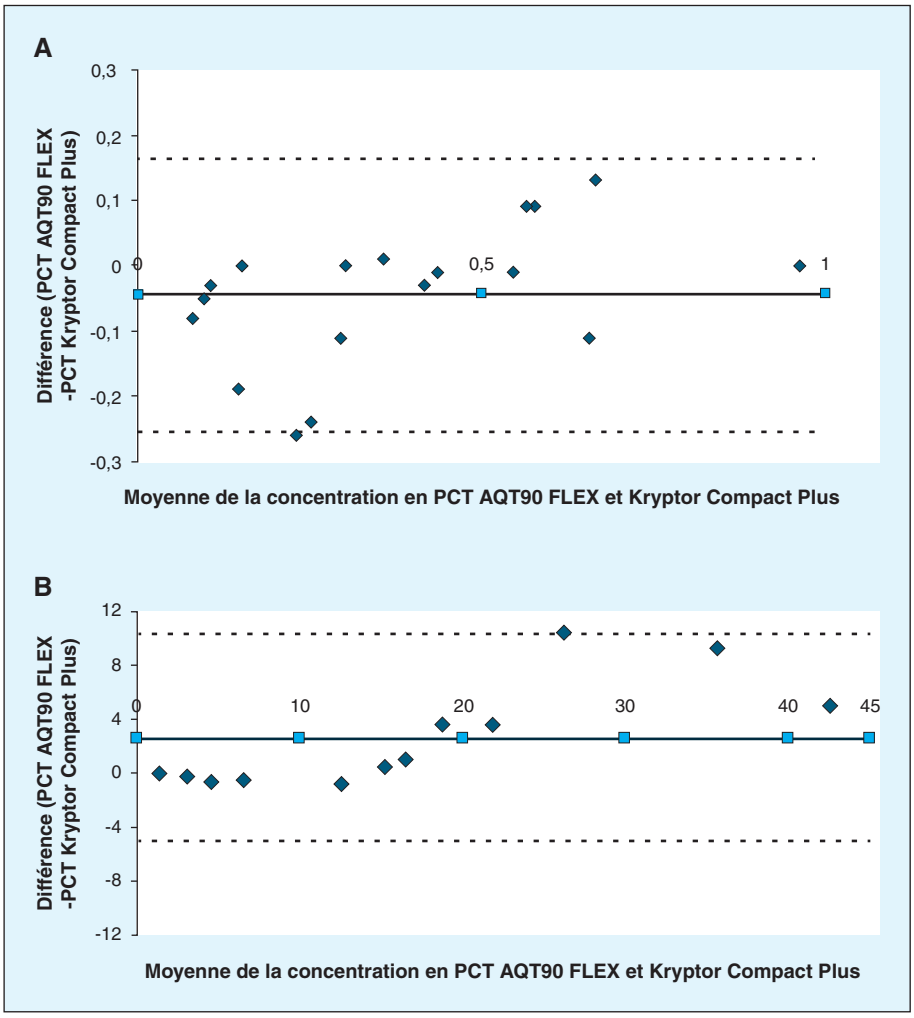

Figure 3. Graphes des différences (Bland-Altman) pour le dosage de la PCT réalisé sur macrotubes héparinés sur Brahms Kryptor Compact Plus® *vs* AQT90 FLEX® pour la gamme 0 à 1 ng/mL (**A**) et sur la gamme de concentration supérieure à 1 ng/mL (**B**). La ligne pleine représente la moyenne des différences entre les valeurs observées par les 2 méthodes (biais) ; les lignes pointillées représentent les limites acceptables hautes et basses à 95 % (différence moyenne ± 1,96 x écart type).

immunochromatographique semi-quantitative [5] différentes méthodes sur appareil de biologie délocalisée ont été développées, notamment une méthode immunochromatographique quantitative sur sang total [8] et récemment une méthode sandwich immuno-fluorimétrique en une étape sur analyseur Radiometer AQT90 FLEX®. Ce dernier présente toutes les caractéristiques nécessaires pour un appareil de biologie délocalisée : faible encombrement, aucune étape pré-analytique requise, faible volume d'échantillon nécessaire, haute sensibilité, gamme de mesure étendue (0,12 à 100 ng/mL en sang total), résultat en 20 min et praticabilité d'utilisation. Par ailleurs, d'autres analytes d'urgence peuvent être dosés sur cet analyseur. La détermination de la PCT sur sang total sur cet analyseur a récemment été évaluée comparativement à la méthode BRAHMS PCT sur Brahms Kryptor compact Plus® sur échantillon héparinate de lithium. Les auteurs ont rapporté une excellente corrélation entre les deux méthodes (r^2 = 0,9885) [3]. Cependant, les auteurs n'ont pas évalué le dosage sur microtube EDTA. Or, en pédiatrie, l'utilisation de microprélèvements est fréquente voire systématique, dans un objectif évident d'épargne sanguine.

Les résultats de notre étude montrent que la fidélité intermédiaire observée pour les deux contrôles de qualité est comparable à celle observée par Dupuy *et al.* [3] avec des CV de reproductibilité inférieurs à 10 % et à ceux rapportés par Steinbach *et al.* pour la PCT déterminée sur Brahms Kryptor Compact Plus® [9].

Concernant les macrotubes héparinés, notre étude confirme les résultats de Dupuy *et al.* [3] : une bonne corrélation

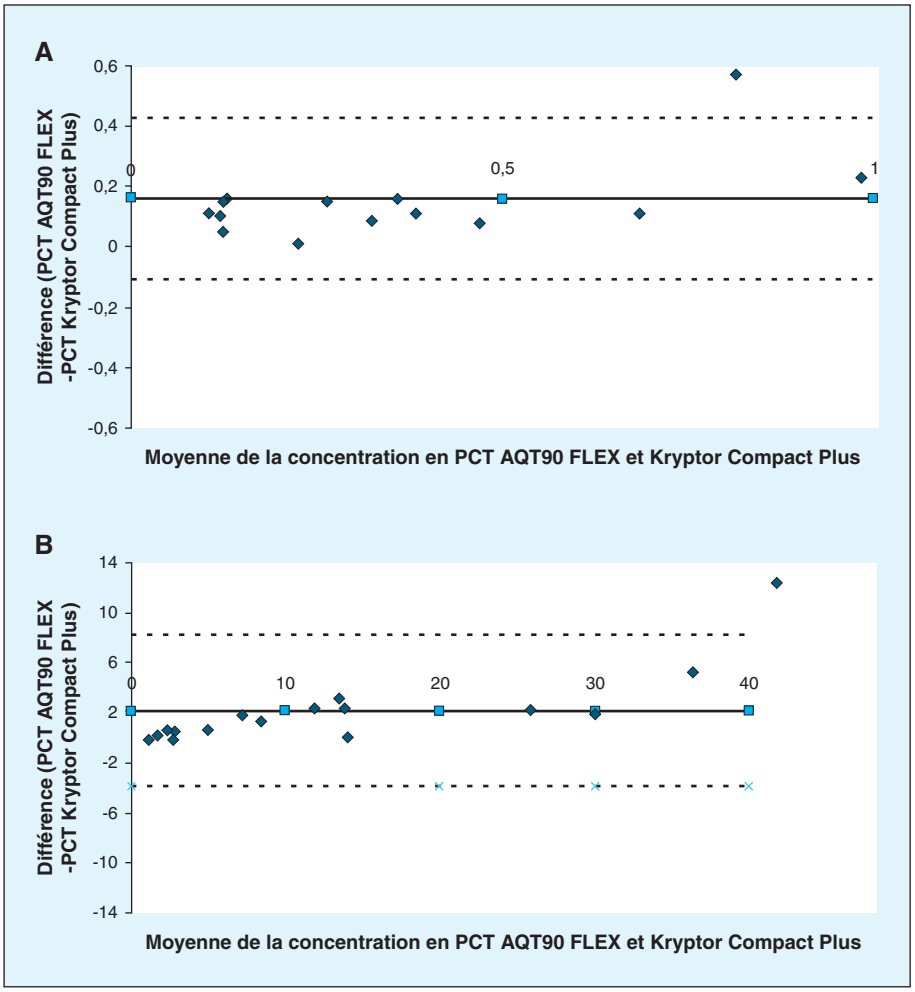

Figure 4. Graphes des différences (Bland-Altman) pour le dosage de la PCT réalisé sur microtubes EDTA sur AQT90 FLEX® *vs* microtubes héparinés sur Brahms Kryptor Compact Plus® pour la gamme 0 à 1 ng/mL (**A**) et pour la gamme de concentration supérieure à 1 ng/mL (**B**). La ligne pleine représente la moyenne des différences entre les valeurs observées par les 2 méthodes (biais) ; les lignes pointillées représentent les limites acceptables hautes et basses à 95 % (différence moyenne ± 1,96 x écart type).

est observée sur toute la gamme de concentration étudiée (0,04 ng/mL à 45 ng/mL). Dans la gamme de concentration faible (0,12 à 1 ng/mL), l'analyse du graphe de Bland-Altman montre un seul déviant avec une valeur surestimée sur AQT90 FLEX®, sans toutefois dépasser le seuil décisionnel clinique de 0,5 ng/mL. L'initiation ou la continuation d'une antibiothérapie pour le traitement des infections des voies respiratoires basses n'est pas conseillée si la PCT est inférieure à 0,25 jusqu'à 0,5 ng/mL et au contraire préconisée pour des valeurs supérieures à 0,5 ng/mL [10]. De même, le seuil décisionnel de 0,5 ng/mL est le seuil retenu pour les infections bactériennes sytémiques : bactériémie, méningite [11]. Ainsi, le dosage de la PCT sur AQT90 FLEX® n'aurait pas conduit à traiter à tort un patient par une antibiothérapie. De même, sur microtubes EDTA *vs* microtube hépariné sur Brahms Kryptor Compact Plus®, dans la zone de concentration inférieure à 1 ng/mL, un échantillon déviant de concentration supérieure au seuil de décision clinique de 0,5 ng/mL est observé et dont la valeur apparaît à nouveau surestimée sur AQT90 FLEX®. Dans la gamme de concentration supérieure à 1 ng/mL, sur macrotubes ou microtubes, un seul déviant est observé sans impact sur l'interprétation clinique des résultats, compte tenu des concentrations élevées en PCT de ces échantillons (supérieure à 10 ng/mL).

Au total, que ce soit sur macrotubes ou microtubes, l'AQT90 FLEX® présente une excellente précision et une bonne corrélation avec le dosage de la PCT sur Brahms Kryptor Compact Plus® sur toute la gamme de concentration clinique, particulièrement dans les concentrations faibles et les biais observés n'affectent pas la décision clinique. Si la limite de quantification de l'AQT90 FLEX est

plus importante (0,12 ng/mL) que celle sur Brahms Kryptor Compact Plus® (0,02 ng/mL), elle reste toutefois acceptable en regard du seuil décisionnel clinique de 0,25 ng/mL en faveur de l'arrêt du traitement antibiotique [12].
Il a été précédemment 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 [9]. 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 % [13]. La stabilité en sang total, laissé à température ambiante sur une période de 24 h a été peu étudiée. Si les résultats de Goode *et al.* [14] ne montrent aucune dégradation de la PCT plasmatique à 4 h, 24 h et 72 h comparativement à 0 h, l'auteur ne conclut pas de manière stricte en regard des larges limites d'acceptabilité obtenues dans son étude. Notre étude montre que la PCT, en sang total à température ambiante, sur macrotube héparinate de lithium ou sur microtube EDTA, est stable 24 h. Ce résultat important permet dorénavant d'accepter une demande d'examen biologique pour dosage de la PCT dans des conditions pré-analytiques convenables et maintenant connues.

Conclusion

La mesure de la PCT sur AQT90 FLEX® développée par Radiometer présente des caractéristiques analytiques acceptables, même lors de concentrations faibles. Celui-ci peut être utilisé en biologie délocalisée sur sang total, sans traitement pré-analytique. La PCT est stable à température ambiante jusqu'à 24 h.

Remerciements. Les auteurs tiennent à remercier l'équipe technique du laboratoire de biochimie générale pour leur participation.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Hsiao AL, Baker MD. Fever in the new millennium : a review of recent studies of markers of serious bacterial infection in febrile children. *Curr Opin Pediatr* 2005 ; 17 : 56-61.

2. Cohen R, Romain O, Levy C, Perreaux F, Decobert M, Hau I, *et al*. Impact of CRP rapid test in management of febrile children in paediatric emergency units of Ile-de-France. *Arch Pediatr* 2006 ; 13 : 1566-71.

3. Dupuy AM, Chevrier Q, Olejnik Y, Bargnoux AS, Badiou S, Cristol JP. Analytical evaluation of point-of-care procalcitonin (PCT) and clinical performances in an unselected population as compared with central lab PCT assay. *Clin Chem Lab Med* 2017 ; 55 : e167-71.

4. 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.

5. Schuch G, Duc-Marchand C, Venet C, Mann H, Tixier A, Bionda C. Utilisation au quotidien de la procalcitonine dans un service de soins intensifs : comparaison de la technique semi-quantitative PCT-Q Brahms à celle automatisée PCT-Kryptor. *Ann Biol Clin* 2011 ; 69 : 663-70.

6. Afnor. Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure - Partie 6 : utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude. Norme française NF ISO 5725-6. La Plaine Saint-Denis : Afnor, décembre 1994, 40 pages.

7. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, *et al*. Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. *N Engl J Med* 2017 ; 376 : 2235-44.

8. Kutz A, Hausfater P, Oppert M, Alan M, Grolimund E, Gast C, *et al*. Comparison between BRAHMS PCT direct, a new sensitive point-of-care testing device for rapid quantification of procalcitonin in emergency department patients, and established reference methods – a prospective multinational trial. *Clin Chem Lab Med* 2016 ; 54 : 577-84.

9. 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.

10. 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.

11. Riedel S. Procalcitonin and the role of biomarkers in the diagnosis and management of sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012 ; 73 : 221-7.

12. Corti C. Point-of-care procalcitonin test to reduce antibiotic exposure in patients hospitalized with acute exacerbation of COPD. *Int J COPD* 2016 ; 11 : 1381-9.

13. 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.

14. 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.