

Dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels au premier trimestre

Aspect pré-analytique

Focus on preanalytics for Down's syndrome screening during first trimester of pregnancy

Rémi Gebeile¹

Christelle Roger²

Christophe Doche^{2,3}

Laurence Doche^{3,4}

¹ Service d'hématologie et microbiologie, Laboratoire de biologie médicale, Centre hospitalier de Chambéry, France

² Service de biochimie, Laboratoire de biologie médicale, Centre hospitalier de Chambéry, France

³ ProBioQual, Lyon, France
<christophe.doche@ch-chambery.fr>

⁴ LBM MS LabosChambéry, La Motte Servolex, France

Résumé. L'objectif de cette étude est de préciser les conditions pré-analytiques requises pour le dépistage de la trisomie 21 au premier trimestre par les marqueurs sériques maternels. La variation de concentration des deux marqueurs utilisés, l'hCG β et la PAPP-A, a été analysée à température ambiante, à +4 °C et lors de cycles de congélation-décongélation. Avec un écart acceptable de 5 % pour chacun des deux marqueurs, le sérum peut être conservé pendant 72 h à température réfrigérée comprise entre +2 et 8 °C. Il peut également subir trois cycles de congélation-décongélation sans que les résultats soient affectés. La conservation à température ambiante (entre 20 et 25 °C) oblige à une analyse dans les 24 h. À partir de cette étude, la rédaction de recommandations permet de donner un cadre précis au traitement pré-analytique et au transport des échantillons sanguins, dans un domaine où les variations peuvent entraîner des décisions thérapeutiques lourdes.

Mots clés : trisomie 21, PAPP-A, hCG bêta libre, pré-analytique

Abstract. The aim of the study is to specify the pre-analytical conditions required for Down's syndrome screening in first trimester by maternal serum markers. The concentration variation of both markers, hCG β and PAPP-A, was analyzed at room temperature, at 4°C and during freezing-thawing cycles. Serum can be kept during 72h between 2 and 8°C with an acceptable bias of 5% for each marker. It can also undergo three freezing-thawing cycles without any variation of results. Preservation at room temperature (between 20 and 25°C) requires an analysis within 24h. From this study, writing recommendations enable to give a precise frame to pre-analytical processing and transport of blood samples, in a field where variations can lead to heavy therapeutic decisions.

Key words: Down's syndrome, PAPP-A, free beta hCG, preanalytics

Article reçu le 08 octobre 2013,
accepté le 29 novembre 2013

L'observation

Le dépistage prénatal du risque de trisomie 21 (T21) par dosage des marqueurs sériques maternels est réalisé en France par 82 laboratoires agréés. Ce dépistage est proposé à toutes les femmes enceintes, sur tout le territoire ; cela nécessite donc le transport des échantillons, des sites de prélèvements aux laboratoires exécutants. La phase pré-

analytique va présenter une importance toute particulière pour ce dépistage aux conséquences parfois lourdes.

Pratiqué depuis 2010 au premier trimestre de la grossesse entre 11 et 13 semaines d'aménorrhée (SA) (11 SA plus 0 jour et 13 SA plus 6 jours), il combine le risque lié à l'âge maternel, le risque lié à la valeur de la clarté nucale et le risque attribué à deux marqueurs biochimiques de variations antagonistes, la fraction β libre de l'hCG (hCG β) et la *pregnancy-associated plasma protein A* (PAPP-A).

Le paramètre biochimique le plus fragile est l'hCG totale qui se clive facilement en ses deux unités α et β . Il a été

Tirés à part : C. Doche

montré que la fraction β libre peut augmenter avec le temps, la température ou une contamination bactérienne du prélèvement, par dégradation de l'hCG totale [1-4]. Morin *et al.* rapportent qu'une erreur aléatoire sur la mesure de la concentration de l'hCG β de 5 % conduit à une erreur de l'ordre de 15 % dans le calcul de risque [2].

Cette étape pré-analytique a fait l'objet de peu d'études pour le dépistage du premier trimestre. Les quelques publications existantes sont plutôt optimistes et rassurantes mais acceptant parfois des variations de 10 % de la concentration des marqueurs.

Pour l'étude, le dosage des marqueurs sériques maternels est réalisé avec l'automate Kryptor Thermo Fischer Scientific. Les fiches techniques recommandent une centrifugation des échantillons dans les 6 h, une conservation avant analyse d'au maximum 24 h à température réfrigérée, avec une congélation au-delà, mais en évitant des cycles de congélation et décongélation [5, 6]. Ces recommandations très prudentes nécessitaient d'être investiguées de façon plus poussée.

Les conditions pré-analytiques sont un élément indispensable à maîtriser pour assurer la fiabilité des résultats, et elles doivent être précisées aux prescripteurs et aux préleveurs dans un manuel de prélèvement [7].

Matériel et méthodes

Patientes

L'étude a été réalisée à partir des surplus de sérums frais prélevés sur les patientes venues pour faire pratiquer le dépistage de la T21 par les marqueurs sériques au 1^{er} trimestre. Le recueil des échantillons a été effectué par les quatre laboratoires privés du groupement de laboratoires de l'agglomération chambérienne et par le laboratoire du centre hospitalier où sont également réalisées les analyses.

Chaque patiente a été informée oralement de l'étude et a donné son accord avant signature du formulaire de consentement de dépistage de la trisomie 21 qui comporte la phrase suivante : « L'éventuel surplus de sérum restant après réalisation de vos analyses, au lieu d'être jeté, peut être utilisé à des fins scientifiques ». Il est notifié que la patiente peut refuser en s'adressant aux responsables du laboratoire agréé.

Étude de stabilité

Quinze patientes ont été prélevées sur tube sec sans gel (Becton Dickinson) de 7 mL. Les échantillons sont centrifugés et décantés ; les sérums sont stockés à température ambiante puis transportés au laboratoire exécutant. Toutes ces étapes sont réalisées dans un délai maximal de 6 h.

Dès leur arrivée, les sérums sont dosés pour l'hCG β et la PAPP-A (J0).

Deux parties aliquotes sont décantées et conservées à +4 °C (entre 3 et 6 °C dans la période concernée pour une température acceptable entre 2 et 8 °C) ou température ambiante (comprise entre 20 et 25 °C dans la période concernée, pour une température acceptable entre 18 et 25 °C). Les deux aliquots sont ensuite analysés pour les deux marqueurs à 24, 48 et 72 h (J1, J2 et J3).

Les échantillons conservés à température réfrigérée sont ramenés à température ambiante pendant 30 min, analysés, puis à nouveau réfrigérés immédiatement après analyse.

Test de congélation-décongélation

Trente-et-une patientes ont été prélevées sur tube sec sans gel (Becton Dickinson) de 7 mL. Les échantillons sont centrifugés et décantés ; les sérums sont stockés à température ambiante puis transportés au laboratoire exécutant. Toutes ces étapes sont réalisées dans un délai maximal de 6 h. Dès leur arrivée, les sérums sont dosés pour l'hCG β et la PAPP-A (J0).

Chaque sérum est ensuite décanté en une partie aliquote de volume suffisant pour subir 3 cycles de congélation-décongélation. L'échantillon est décongelé à température ambiante pendant 30 min, puis homogénéisé par 7 retournements lents successifs. Il est ensuite recongelé immédiatement après analyse.

La conservation se fait à -18 °C (entre -15 et -21 °C dans la période concernée, pour une température acceptable entre -15 et -25 °C). Les dosages sont réalisés à J1, J2 et J3.

Les jours ne sont pas obligatoirement consécutifs en cas de prélèvement en fin de semaine, ce qui permet d'inclure dans l'étude le transport et la conservation des prélèvements réalisés en fin de semaine.

Matériel

Les analyses sont réalisées sur automate Kryptor Compact – Société Thermo Fisher Scientific. Le dosage d'hCG β utilise la technologie TRACE – référence produit : 809.075 [5]. Le dosage de PAPP-A utilise la technologie TRACE - référence produit 866.075 [6]. Les dosages sont réalisés par série, encadrés par plusieurs contrôles internes de qualité, Thermo Fisher Scientific (trois niveaux) et ProBioQual (un niveau), pour chaque paramètre.

Mode opératoire statistique

Étude statistique

Les statistiques sont réalisées avec le logiciel MedCalc. Le test de Kolmogorov-Smirnov est utilisé pour tester la normalité des distributions des concentrations obtenues en PAPP-A et en hCG β .

Étude de stabilité

(à température ambiante et à +4 °C)

Les résultats des dosages de la PAPP-A et de l'hCGβ à J0 ont été pris pour référence. La comparaison des concentrations obtenues entre J0-J1, J0-J2 et J0-J3 a été réalisée par le test t de Student sur séries appariées. Pour chaque couple de mesures a été calculé l'écart relatif : $[(\text{Jindiqué} - \text{J0})/\text{J0}] * 100$. La moyenne de ces rapports a permis de calculer l'écart moyen.

Test de congélation-décongélation

Le test de Student sur séries appariées a été utilisé pour comparer les résultats des trois cycles de congélation-décongélation par rapport au résultat obtenu lors du premier dosage pris comme valeur de référence (J0). Pour chaque couple de mesures a été calculé l'écart relatif par rapport à J0 : $[(\text{Résultat après } x \text{ cycles de congélation} - \text{J0})/\text{J0}] * 100$. La moyenne de ces rapports a permis de calculer l'écart moyen.

Résultats

Stabilité à température ambiante et à +4 °C

PAPP-A

À température ambiante, les concentrations de la PAPP-A augmentent avec le temps. Un écart significatif est noté dès 24 h ($p = 0,0106$). L'écart moyen est de 2,24 % à 24 h, 3,07 % à 48 h ($p = 0,001$) et 3,66 % à 72 h ($p = 0,0002$) (figure 1).

À +4 °C, la PAPP-A est stable 24 h. Une différence significative apparaît à 48 h avec un écart moyen observé de

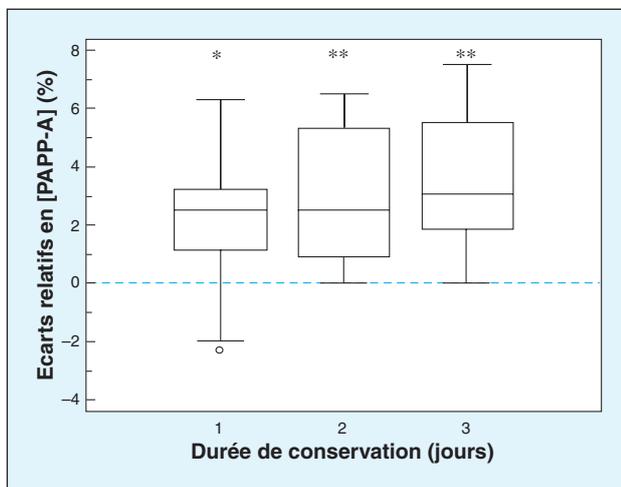


Figure 1. Représentation en Box-plot des écarts relatifs des concentrations en PAPP-A en fonction de la durée de conservation des échantillons à température ambiante. * différence significative $p \leq 0,05$; ** différence fortement significative $p \leq 0,001$.

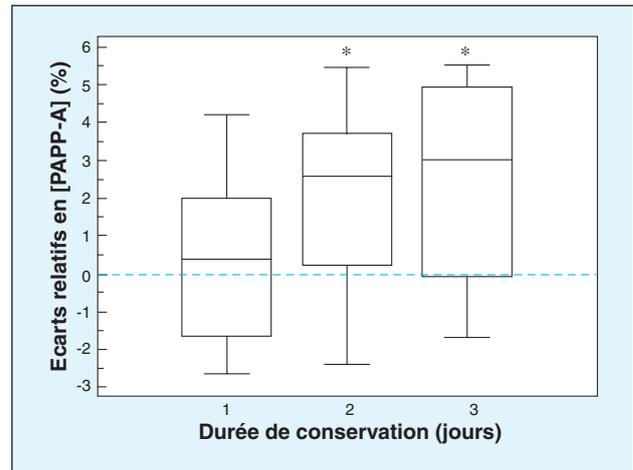


Figure 2. Représentation en Box-plot des écarts relatifs des concentrations en PAPP-A en fonction de la durée de conservation des échantillons à +4 °C. * différence significative $p \leq 0,05$; ** différence fortement significative $p \leq 0,001$.

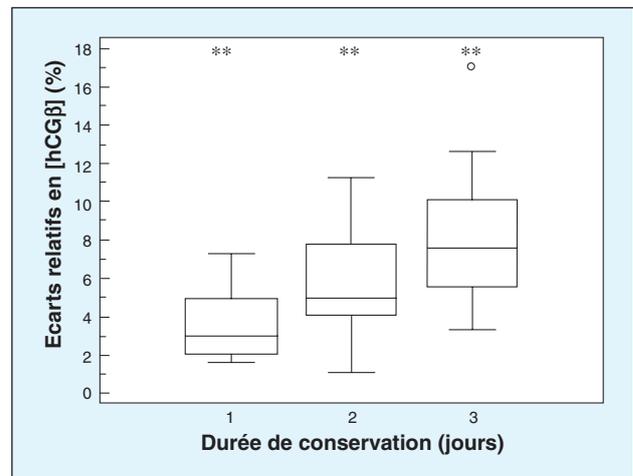


Figure 3. Représentation en Box-plot des écarts relatifs des concentrations en hCGβ en fonction de la durée de conservation des échantillons à température ambiante. * différence significative $p \leq 0,05$; ** différence fortement significative $p \leq 0,001$.

2,07 % ($p = 0,0130$). À 72 h, l'écart moyen est de 2,45 % ($p = 0,0139$) (figure 2).

hCGβ

La conservation du sérum à température ambiante conduit à une augmentation des concentrations de l'hCGβ. Cette hausse est significative ($p = 0,0231$) à partir de 24 h avec un écart moyen évalué à 3,49 %. Cet écart augmente avec le temps : à 48 h, il est de 5,76 % ($p = 0,001$) puis de 8,20 % à 72 h ($p = 0,0001$) (figure 3).

La conservation du sérum à +4 °C n'entraîne pas d'augmentation de concentration significativement différente de l'hCGβ pendant 72 h (figure 4).

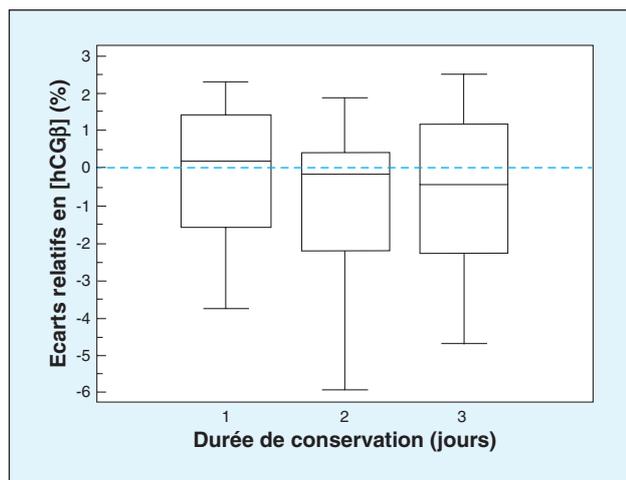


Figure 4. Représentation en Box-plot des écarts relatifs des concentrations en hCGβ en fonction de la durée de conservation des échantillons à +4 °C. * différence significative $p \leq 0,05$; ** différence fortement significative $p \leq 0,001$.

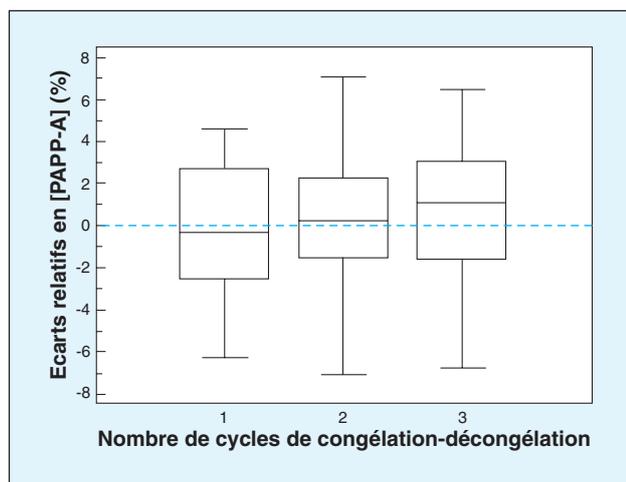


Figure 5. Représentation en Box-plot des écarts relatifs des concentrations en PAPP-A en fonction du nombre de cycles de congélation-décongélation. * différence significative $p \leq 0,05$; ** différence fortement significative $p \leq 0,001$.

Test de congélation-décongélation

Les trois cycles de congélation-décongélation sont sans influence significative sur les concentrations de la PAPP-A (figure 5).

Les cycles de congélation-décongélation entraînent une augmentation des concentrations en hCGβ dès le premier cycle ($p = 0,0231$). Cette augmentation s'accroît avec les cycles de congélation-décongélation : l'écart moyen est de 1,11 % après un cycle, 1,75 % après 2 cycles ($p = 0,001$) et 3,09 % après 3 cycles ($p = 0,0001$) (figure 6).

Discussion

Dans la littérature, il existe de grandes différences de délais de conservation. La stabilité de la concentration d'hCGβ dans le sérum, entre 2 et 8 °C, varie selon les auteurs de 37 h à 94 jours [2, 8]. Ces variations sont souvent dues aux différences des durées de stabilité étudiées. Certaines études de stabilité des échantillons congelés s'étalent de 6 à 240 jours [2, 8].

Dans le contexte du dépistage prénatal de la trisomie 21, l'intérêt principal est l'obtention rapide de résultats pour poursuivre les investigations, si nécessaire. L'étude que nous avons menée s'est volontairement limitée à un délai de 72 h qui correspond au délai classique de transmission des échantillons d'un laboratoire préleveur vers un laboratoire agréé en incluant l'éventualité d'un prélèvement la veille d'une fin de semaine.

Pour la stabilité à température ambiante, il faut se référer avec attention aux valeurs de température réellement observées ; en effet, elles peuvent être très variables selon les conditions et les études montrant alors une stabilité différente des analytes par rapport à la température ambiante de 20 à 25 °C [4].

Les différences sont également liées aux limites de variations considérées comme acceptables pour les différents analytes, elles s'étalent entre 3 % [2] et 10 % [8]. Certains auteurs utilisent comme variation acceptable un chiffre correspondant à leur coefficient de variation (CV) analytique de fidélité intermédiaire [9]. Parfois, les raisons du choix de la valeur seuil ne sont pas précisées [8], elle semble toutefois correspondre à un écart total acceptable. Dans notre

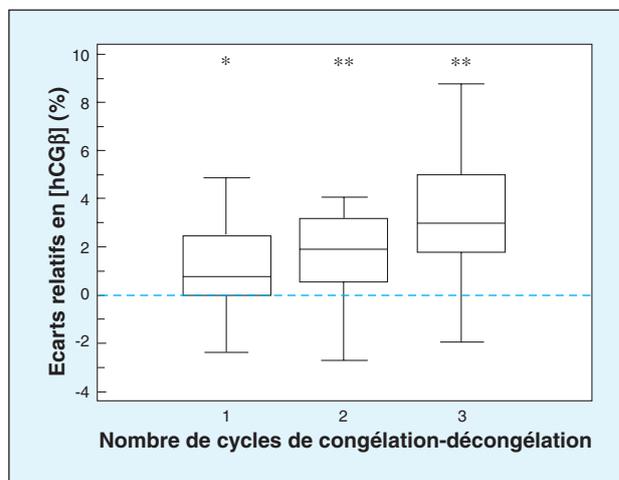


Figure 6. Représentation en Box-plot des écarts relatifs des concentrations en hCGβ en fonction du nombre de cycles de congélation-décongélation. * différence significative $p \leq 0,05$; ** différence fortement significative $p \leq 0,001$.

étude, nous avons décidé d'utiliser comme variation maximale acceptable la valeur de 5 %, qui correspond aussi bien au CV analytique qu'au biais acceptable utilisé et préconisé par les associations de contrôle de qualité [10]. Cette valeur est largement inférieure à l'écart total acceptable qui est pour les deux marqueurs de 12,2 % [10]. L'équipe de Morin et Moineau a également retenu le seuil de 5 % comme variation acceptable, qui correspond à leur CV inter-série en utilisant la même technologie TRACE sur appareil Kryptor de la société Thermo Fisher Scientific [9].

Nous montrons que la concentration en hCG β sérique est augmentée après 48 h à température ambiante, nous ne retenons donc qu'une conservation maximale acceptable de 24 h. L'étude ne permet pas d'être plus précis dans cette première période de conservation. L'équipe de Morin a étudié le pourcentage d'augmentation de la concentration à chaque heure, autorisant une conservation dans ces conditions de 32 h pour une variation acceptable de 5 % [2]. Une précédente étude, au deuxième trimestre, avait montré une bonne stabilité des concentrations de l'hCG β pendant 72 h lors d'un transport sans précaution que le sérum soit décanté ou simplement centrifugé dans un tube avec gel séparateur [3]. Cependant, il ne semble pas raisonnable de conserver l'hCG β plus de 32 h à température ambiante. Ce paramètre est le plus sujet à variations de tous ceux utilisés pour le dépistage. La PAPP-A est stable pendant 72 h à température ambiante contrairement à ce qui est indiqué dans la notice du fournisseur [6]. Il est difficile d'évaluer exactement l'impact sur le risque, des variations de l'hCG β et de la PAPP-A conservées à température ambiante au-delà de 24 h. Les deux paramètres augmentent avec le temps mais leur impact sur le calcul est opposé. Une augmentation de la concentration de l'hCG β fait augmenter ce risque, tandis qu'une augmentation de concentration de la PAPP-A le fait baisser. Sachant que la variation de concentration de l'hCG β est plus importante que celle de la PAPP-A (5,76 % - 8,20 % de hausse versus 3,07 % - 3,66 % respectivement à 48 et 72 h), le risque estimé est alors faussement augmenté. S'il se retrouve supérieur à 1/250 la patiente peut être considérée, à tort, comme étant dans la zone à risque accru. Ce résultat ne peut être rendu.

La conservation du sérum à +4 °C (2 à 8 °C) ne pose pas de problème pendant 72 h pour les deux paramètres. Chacun augmente légèrement et régulièrement sans jamais dépasser 5 % de variation. Lambert-Messierlian et son équipe ont observé des médianes à 1,10 pour l'hCG β et à 1,03 pour la PAPP-A pour des dosages après transport des sérums à température ambiante et conservation jusqu'à 3 jours à +4 °C [11]. Cette conservation peut donc être préconisée sans problème.

Les résultats obtenus lors des cycles de congélation-décongélation ne montrent pas de variation importante des paramètres. L'augmentation de la concentration en PAPP-A

n'est pas statistiquement significative. La concentration de l'hCG β augmente légèrement mais cette hausse reste bien inférieure au seuil de 5 %, même lors de la troisième décongélation. Ainsi, il est possible d'accepter des échantillons arrivés décongelés, ce que préconise déjà l'équipe de Brest [8], puis de les recongeler après analyse. La possibilité de ré-analyse reste alors intacte.

Nous n'avons pas testé la stabilité de la congélation à long terme, celle-ci étant connue largement supérieure à la durée maximale de conservation envisagée. C'est d'ailleurs le moyen de conservation utilisé pour les contrôles de qualité [12], et pour les échantillons après analyse selon la législation [13]. Les échantillons congelés peuvent être transmis sans problème.

Bien que non reconnue en France, certains auteurs ont étudié la conservation en goutte de sang séché sur papier, qui permettrait d'allonger les délais de conservation et de transmission (42,6 jours vs 72 h pour l'hCG β à température ambiante) [8, 14]. Cependant, la conservation de la PAPP-A est alors à peine meilleure que celle de l'hCG β en sérum à température ambiante pour une variation acceptable de 5 % (1,6 jour vs 1 jour) [9, 14]. Bersinger obtient un CV intra-essai plus élevé pour les échantillons sur papier que dans le sérum : 6,5 % vs 4,3 % [15]. Cette technique qui a été testée en France fut assez rapidement abandonnée.

Conclusion

Cette étude nous a permis de confirmer les délais de conservation des échantillons après prélèvement dans le cadre du dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques maternels du premier trimestre. Ainsi nous avons pu rédiger des préconisations pour la réalisation et la prise en charge pré-analytique de ces prélèvements. Ces préconisations sont synthétisées sous forme de tableau (*tableau 1*). L'hCG β étant le paramètre le plus sujet à variations parmi

Tableau 1. Préconisations préanalytiques pour le dosage des marqueurs sériques maternels de trisomie 21 du premier trimestre.

Étape	Préconisations
Prélèvement	Sang veineux Tube sec
Centrifugation (et décantation si absence de gel séparateur)	Dans les 6 h après prélèvement
Conservation du sérum	Entre 20 et 25 °C : si dosage dans les 24 h après prélèvement Entre 2 et 8 °C : si dosage dans les 72 h après prélèvement Entre - 15 et - 25 °C si dosage au-delà de 72 h après prélèvement
Congélation-décongélation	Trois cycles au maximum

les marqueurs sériques maternels que sont l'hCG β , l'hCG intacte, la PAPP-A et l' α -foeto-protéine [2-4, 16], nous avons affiné les recommandations pour les prélèvements du dépistage de la trisomie 21 au deuxième trimestre.

Ces conditions pré-analytiques du dosage des marqueurs sériques sont précisées aux prescripteurs et aux préleveurs, à l'aide d'un manuel de prélèvement.

La justification de ces recommandations pré-analytiques s'intègre dans le cadre de l'accréditation de ce secteur analytique.

Remerciements. Nous remercions le laboratoire de biologie médicale Labos Chambéry pour sa participation à la collecte et l'acheminement des prélèvements.

Liens d'intérêts : Co-pilotes du programme de contrôle de qualité du dépistage de la trisomie 21 par les marqueurs sériques au sein de l'association ProBioQual (L. Doche, C. Doche) ; Cordonnateur du Club utilisateurs Brahms Thermo Fisher Scientific pour le dépistage de la trisomie 21 (C. Doche).

Références

1. Digeon B, Bartoli M, Doche L, Doche C. Marqueurs biochimiques d'anomalies fœtales et contrôle de qualité : organisation en France. *Ligand Assay* 2000 ; 5 : 31-7.
2. Morin JF, Moineau MP, Moulin P, Morin V, Codet JP. Variabilité analytique de la fraction libre de l'HCG. Influence des conditions de conservation des échantillons. 17^e colloque en immunoanalyse et biologie spécialisée. Poitiers, France, 18-20 octobre 2000.
3. Doche C, Bartoli M, Mercier S, Demiaux JP, Gascht J, Digeon B. Prenatal screening for Down syndrome : preanalytical precautions. *Prenat Diagn* 2000 ; 20 : 683-6.
4. Cruz J, Cruz G, Minekawa R, Maiz N, Nicolaidis KH. Effect of temperature on free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A concentration. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010 ; 36 : 141-6.
5. Thermo Scientific. Brahms Free β hCG Kryptor. 21/01/2013.
6. Thermo Scientific. Brahms PAPP-A Kryptor. 06/04/2011.
7. Centre hospitalier Chambéry, service de biochimie. Dépistage trisomie 21. Calendrier perpétuel des prélèvements sanguins. 2009.
8. Cowans NJ, Stomatopoulou A, Hellström J, Mäkelä MM, Spencer K. PAPP-A and free β -hCG stability in first trimester serum using PerkinElmer AutoDelfia[®] and Delfia[®] Xpress systems. *Prenat Diagn* 2010 ; 30 : 127-32.
9. CHU Brest. Estimation du risque de trisomie 21 fœtale par les marqueurs sériques maternels. Conditions préanalytiques. Dosage des marqueurs : bêta hCG libre, PAPP-A, hCG totale et AFP.
10. ProBioQual. Note technique. EEQ - Marqueurs biochimiques de risque trisomique - MSM 21 - 2013. R03-MSMPO-ENR-1300-02. Mai 2013.
11. Lambert-Messerlian GM, Eklund EE, Malone FD, Palomaki GE, Canick JA, D'Alton ME. Stability of first- and second-trimester serum markers after storage and shipment. *Prenat Diagn* 2006 ; 26 : 17-21.
12. Digeon B, Doche C. Contrôle de qualité des marqueurs biochimiques de risque trisomique. Organisation et pratique après six années d'expérience. *Revue médicale de l'Assurance maladie* 1996 ; 4 : 65-8.
13. Arrêté du 23 juin 2009 fixant les règles de bonnes pratiques en matière de dépistage et de diagnostic prénatals avec utilisation des marqueurs sériques maternels de trisomie 21.
14. Cowans NJ, Stomatopoulou A, Liitti P, Suonpaa M, Spencer K. The stability of free- β human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein-A in first trimester dried blood spots. *Prenat Diagn* 2011 ; 31 : 293-8.
15. Bersinger NA, Marguerat P, Pescia G, Schneider H. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) : measurement by highly sensitive and specific enzyme immunoassay, importance of first-trimester serum determinations, and stability studies. *Reprod Fertil Dev* 1995 ; 7 : 1419-23.
16. Massé J, Summers A, Cherian G, Forest JC. Transportation of maternal serum specimens for screening for chromosomal aneuploidies : effect of seasonal variations, distance and freezing on the stability of biological markers. *Clin Biochem* 2000 ; 33 : 273-7.