

une conséquence de l'activité de l'analyte en question. L'hémoglobine ne contenant pas de plasma sera identifiée comme couleur et sera considérée induite par l'activité enzymatique, ce qui serait erroné dans ce cas. Les résultats des tests peuvent être trop élevés, si le paramètre en question (par exemple, la protéine C) est directement proportionnel au changement de couleur, ou trop bas si l'activité est inversement proportionnelle au changement de couleur (par exemple, antithrombine).

- Le degré d'interférence dépend du principe de test pour le paramètre de coagulation analysé.
- Il est important de savoir que l'hémolyse peut interférer avec les résultats, mais la plupart des tests possèdent des protections intégrées et ne sont enclins aux résultats erronés qu'au-dessus d'un certain seuil. Par conséquent, il est très important de lire attentivement les notices d'utilisation car pour le même test, différents réactifs présentent différentes tolérances.
- Si l'on ne sait pas si le degré d'hémolyse présent dans un échantillon interférera ou non avec les résultats du test, il faut mesurer le niveau d'hémoglobine plasmatique sur un analyseur d'hématologie ou de chimie.
- Si les échantillons sont visuellement grossièrement hémolysés, il est conseillé de prélever un autre échantillon. Si le patient présente un état hémolytique, le médecin doit traiter les résultats avec réserve et doit indiquer si les résultats sont probablement trop élevés ou trop bas à tort. Une interprétation est toujours possible.

#### b) Ictère

- La bilirubine présente dans les échantillons des cas d'ictère a le même effet que les échantillons hémolysés, bien que cela soit toujours associé à la pathologie du patient et non induit dans le processus de prélèvement.

#### c) Lipémie

- En cas de concentrations élevées de lipides dans le plasma, les échantillons sont très troubles, ce qui peut interférer avec les tests de coagulation utilisant des

systèmes de détection optique, car cela repose sur une mesure du changement de transmission de lumière dans les échantillons.

#### Messages à retenir

- La qualité des résultats des tests de coagulation dépend fortement de plusieurs variables pré-analytiques et peut être erronée dans certaines conditions.
- Il est essentiel d'avoir un volume de remplissage correct du tube car un rapport plasma/anticoagulant incorrect entraînera des résultats erronés.
- Il faut prélever les échantillons avec les précautions adéquates afin d'empêcher toute stase excessive et toute hémolyse traumatique.
- Un délai excessif entre le prélèvement et l'analyse des échantillons affectera les résultats des tests.
- Les temps de stockage d'échantillons autorisés avant que les résultats ne soient affectés ne s'appliquent que si les tubes sont également adéquatement remplis et que si l'échantillon n'est pas exposé à des températures trop chaudes ni à une agitation mécanique excessive.
- L'association de sous-remplissage du tube, de températures élevées et d'agitation entraîne une atteinte plus rapide, et par conséquent, les temps de stockage maximum recommandés ne s'appliquent plus.
- Les échantillons doivent être centrifugés et le plasma séparé des globules rouges dès que possible.
- En règle générale, il faut analyser les échantillons dans les 6 heures après le prélèvement et si cela n'est pas possible, il faut congeler le plasma en vue d'une analyse ultérieure.
- La présence d'hémolyse, d'ictère ou de lipémie peut affecter la précision des résultats.

*La prochaine édition s'intéressera au test du temps de Quick, au concept de rapport normalisé international et d'anticoagulation orale.*



## **Sysmex Educational Enhancement & Development**

Développement et perfectionnement des connaissances Sysmex

Bulletin d'information SEED-Afrique | No 2 | Décembre 2010

### *Introduction à la coagulation*

*L'objectif de ce bulletin d'information est de présenter au personnel de laboratoire les facteurs pré-analytiques influençant les résultats de test de coagulation afin de s'assurer qu'aucun résultat erroné n'est émis.*

### **Influences pré-analytiques sur les résultats de test de coagulation**

Les tests de coagulation classiques constituent une partie intégrante des analyses de laboratoire permettant de prendre des décisions cliniques. D'importants progrès technologiques ont été faits grâce à la mise en place de procédures de contrôle de qualité strictes destinées à la phase analytique des tests. La validité des résultats générés pour les échantillons des patients dépend cependant considérablement de plusieurs variables pré-analytiques qui ne peuvent être détectées par les processus de contrôle qualité conventionnels. Cela constitue un sujet très important car les facteurs pré-analytiques influençant la fiabilité des résultats de tests de laboratoire sont fréquents.

Ces variables peuvent être globalement classées comme variables contrôlables telles que le prélèvement et la manipulation des échantillons et variables incontrôlables qui se rapportent aux facteurs qui sont endogènes et spécifiques à chaque échantillon individuel (comme par exemple, la présence d'hémolyse ou d'ictère).

### **Prélèvement des échantillons**

Le processus de la phlébotomie est extrêmement fréquent, bien que généralement pratiqué sans prendre en compte de la nécessité de procédures normalisées, essentiellement à cause de la méconnaissance par le personnel réalisant le prélèvement de sang des conséquences d'un mauvais prélèvement d'un échantillon sur la précision des résultats de tests de laboratoire. Les échantillons de sang incorrectement prélevés constituent une cause majeure de rejet d'échantillon et de résultats de tests de coagulation erronés. La mauvaise qualité des échantillons due à une technique de prélèvement incorrecte n'est pas toujours ouvertement évidente.

### **a) Site de ponction veineuse**

- Chaque fois que cela est possible, seules les veines antécubitales doivent être utilisées.
- En règle générale, plus la veine est petite et distale, plus importante est la probabilité pour que le prélèvement d'échantillons soit techniquement difficile et les échantillons compromis. L'hémolyse traumatique ex vivo et les échantillons coagulés sont plus fréquents lorsque d'autres sites sont utilisés.
- Le sang ne doit pas être prélevé sur le bras où un goutte-à-goutte est posé. Cela est important pour protéger l'intégrité du site du goutte-à-goutte, ainsi que pour éviter toute dilution accidentelle de l'échantillon avec la perfusion.

### **b) Technique de prélèvement du sang**

- Les systèmes de prélèvement en tube sont plus fréquemment utilisés que les seringues ordinaires.
  - L'échantillon est prélevé directement dans l'anticoagulant approprié minimisant ainsi l'éventualité de coagulation accidentelle des échantillons.
  - La probabilité de sous-remplissage des tubes est minimisée.
- Le calibre de l'aiguille ne doit pas être trop petit (idéalement 19-21 G), sans quoi il existe une probabilité plus importante d'hémolyse ex vivo car les globules rouges sont rompus en raison de la force de vide élevée appliquée pendant le prélèvement. Une augmentation significative du dosage des D-dimères est observée dans les échantillons prélevés avec des aiguilles ayant un diamètre plus petit.

- Les garrots sont fréquemment utilisés dans la vénéséction, mais ne doivent pas être utilisés sans raison. Les garrots doivent être retirés dès que le flux sanguin arrive dans le tube de prélèvement et ne doivent jamais être posés pendant plus de 1 minute afin de minimiser la stase veineuse. L'occlusion veineuse provoque une hémococoncentration, une augmentation de l'activité fibrinolytique et éventuellement l'activation de certains facteurs de coagulation. Une période de stase de une à trois minutes entraînera des modifications cliniquement significatives des valeurs du temps de Quick, du temps de thromboplastine partielle activée, du fibrinogène et des D-dimères.
- Tandis que l'on pensait qu'il ne fallait jamais utiliser le tube du premier écoulement pour les tests de coagulation, les dernières directives du CLSI ont abandonné cette exigence car il n'existe aucune preuve indiquant une différence significative des résultats des tests de coagulation entre les tubes du premier et du second écoulement. Si plusieurs tubes sont cependant prélevés, il est alors recommandé de ne pas prélever le tube destiné à la coagulation en premier.
- Le sang ne doit pas être prélevé à partir de cathéters veineux centraux ou périphériques car il est très probable qu'il soit dilué et contaminé par l'héparine. Parfois cependant, chez les patients gravement atteints, seul l'accès veineux est possible. Dans ce cas, il ne faut pas utiliser les 10 premiers millilitres pour les tests de coagulation.

### c) Tubes de prélèvement sanguin

- Le sang doit être prélevé dans un tube avec du citrate de sodium (bouchon bleu clair).
- Le citrate est disponible à 3,2 % ou 3,8 %. Les deux conviennent et donnent les mêmes résultats du moment que le tube de prélèvement est correctement rempli et analysé lorsque le sang est encore frais. L'effet du sous-remplissage et du vieillissement est plus prononcé avec le citrate à 3,8 %.
- Il faut s'assurer que le tube n'a pas expiré.

### d) Remplissage des tubes

- Les tubes doivent être correctement remplis. Le remplissage incorrect des tubes constitue l'une des raisons les plus fréquentes de rejet des échantillons.
- Le volume de remplissage minimal requis dépend du paramètre testé, mais généralement, les tubes doivent

être remplis à 80 % du niveau délimité au minimum (en conservant le volume de vide). Un tube de 5 ml doit donc contenir au minimum 4 ml de sang.

- Il est essentiel de réaliser un remplissage adéquat afin de garantir un rapport sang/anticoagulant correct. Le citrate élimine le calcium du sang, ce qui empêche ce dernier de coaguler dans le tube. Le rapport anticoagulant/sang dans les tubes doit être correct sans quoi les résultats des tests seront erronés. Tous les tests impliquant la coagulation comme critère de détection requièrent l'ajout de chlorure de calcium dans la méthode d'analyse. La quantité de chlorure de calcium incluse dans le réactif est déterminée selon la quantité attendue de citrate dans le plasma après prélèvement. Par conséquent, si le tube est sous-rempli, il y aura trop de citrate dans le plasma et donc, trop peu de calcium à compenser. Par conséquent, les temps de coagulation seront faussement prolongés.
- Les échantillons présentant un taux d'hématocrite très élevé présenteront le même résultat que si les tubes étaient sous-remplis, c'est-à-dire qu'il y a trop d'anticoagulant par rapport au plasma. Des tubes spéciaux doivent être préparés pour les patients par le laboratoire. Il existe un nomogramme à partir duquel il est possible de voir la quantité de citrate à ajouter à un tube ayant un volume de remplissage de 5 ml spécifique pour les hématocrites. Cela s'applique généralement aux valeurs d'hématocrites supérieures à 50 %.
- Les tubes ne seront pas sur-remplis si le sang est prélevé à l'aide d'un système à vide. Un sur-remplissage est cependant possible si le sang est prélevé à l'aide d'une aiguille et d'une seringue standard et si le bouchon des tubes est retiré en vue du remplissage.
- Les tubes sur-remplis et sous-remplis entraîneront des résultats erronés.

## Manipulation, transport et stockage des échantillons

### a) Mélange des échantillons

- Le sang doit être correctement mélangé avec l'anticoagulant dans le tube en retournant le tube plusieurs fois.
- Il est essentiel d'empêcher la formation de micro-caillots dans le tube. Le processus d'activation de la coagulation utilise des facteurs de coagulation et peut entraîner des résultats de tests de temps de coagulation faussement longs ou courts.

### b) Délais entre le prélèvement et l'analyse

- La période entre le prélèvement des échantillons et leur traitement est essentielle. La période maximale autorisée dépend du test spécifique à réaliser. En règle générale, les échantillons doivent être traités dans les 6 heures après le prélèvement, sans quoi la rotation des échantillons doit être décélérée, la partie de plasma retirée et congelée au minimum à -20°C. Un seul cycle de congélation-décongélation est autorisé.
- Les échantillons anciens sont activés. Tout comme dans les échantillons incorrectement mélangés, de mini-caillots se forment dans le tube utilisant ainsi des facteurs de coagulation pouvant entraîner des temps de coagulation longs ou courts erronés. L'opérateur ne peut voir ces micro-caillots.

### c) Conditions de stockage

- L'effet du temps dépend également de la température à laquelle l'échantillon est stocké.
- Les résultats de temps de Quick sont stables pendant 24 heures au maximum à condition que l'échantillon soit stocké à 4-6 °C ou à température ambiante et qu'il n'ait pas été exposé à une agitation mécanique excessive ou à des températures élevées pendant le transport ou dans des laboratoires non climatisés. L'échantillon peut être stocké sous forme de sang total ou de plasma.
- Le temps de thromboplastine partielle activée et la plupart des autres tests de coagulation sont probablement stables jusqu'à 8 heures au maximum à moins que le patient soit traité avec de l'héparine anticoagulante. L'échantillon peut être stocké sous forme de sang total ou de plasma.
- Il est recommandé d'observer un délai de 2 heures au maximum avant d'analyser des échantillons issus de patients traités par l'héparine.

### d) Centrifugation des échantillons

- Les échantillons doivent être adéquatement centrifugés pour que le plasma ne contienne pas de plaquettes. Comme les plaquettes sont source de phospholipides, les plaquettes résiduelles peuvent conduire à des temps de coagulation courts erronés, notamment si le plasma doit être congelé et décongelé.
- Il n'est pas nécessaire d'avoir une centrifugeuse thermorégulée.
- Pour les tests de coagulation habituels, il est recommandé d'utiliser une centrifugation à 1500 x g pendant 15 minutes à température ambiante.

- Idéalement, les échantillons doivent être centrifugés dans l'heure après le prélèvement.
- En règle générale, il est recommandé de centrifuger les échantillons et d'éliminer le plasma se trouvant sur la couche supérieure des globules rouges dès que possible afin d'éviter des résultats erronés. Le contact avec les globules rouges constitue une source d'activation.
- Lorsque le plasma est séparé en vue du stockage, il est essentiel d'éviter toute couche tampon et tout plasma riche en plaquettes. Si le plasma est contaminé par les plaquettes, les temps de coagulation peuvent être faussement courts, étant donné que celles-ci constituent une source riche en phospholipides. Certains tests sont plus affectés que d'autres.

### Autres variables des échantillons pouvant entraîner des résultats de tests de coagulation erronés.

#### a) Hémolyse

- L'hémolyse constitue l'une des principales sources d'interférence dans les tests de coagulation.
- La source d'hémolyse, qu'elle survienne in vivo, à cause d'une ponction veineuse traumatique ou d'une mauvaise manipulation des échantillons, n'est pas spécifique.
- Les causes de l'hémolyse traumatique comprennent :
  - l'utilisation d'aiguilles fines,
  - une phlébotomie difficile,
  - une agitation ou un mélange excessif de l'échantillon,
  - une exposition à des températures excessivement chaudes ou froides,
  - une centrifugation trop longue ou à une vitesse trop élevée.
- L'hémolyse entraîne la libération d'hémoglobine dans le plasma. Cela peut interférer avec les résultats obtenus sur des analyseurs de coagulation utilisant des systèmes de détection optique de coagulation.
- Les tests chromogéniques fonctionnent sur le principe de mesure de la « couleur » dans le plasma. Ces tests utilisent le fait que les protéines impliquées dans le maintien de l'équilibre hémostatique sont principalement des enzymes fonctionnant en clivant un substrat spécifique. Dans le système d'analyse, le substrat naturel est remplacé par un substrat chromogénique qui, lorsqu'il est activé par l'enzyme active, entraîne le changement de couleur du plasma proportionnellement à l'activité enzymatique. Ainsi, toute couleur observée est interprétée comme étant