

## Les variables préanalytiques en hémostase

M. ZILI\*, B. NCIRI\*\*

L. MECHMECH\*

M. SANHAJI\*, S. ABID\*\*\*

L. BOUGHNIM\*, S. YALAOUI\*

\* Laboratoire de Biologie

Médicale Hôpital

Abderrahmen Mami-Ariana

\*\* Laboratoire d'Hématologie

Hôpital Militaire de Tunis

\*\*\* Centre National de

Transfusion Sanguine Tunis

**Résumé :** Le contrôle des variables préanalytiques en hémostase demeure une étape cruciale dont la qualité conditionne une grande partie de la crédibilité du résultat final. Dans cet article, nous allons passer en revue les recommandations quant au recueil de l'échantillon, son acheminement au laboratoire, son traitement préalable et sa conservation éventuelle.

**Mots-clés :** Variables préanalytiques- Prélèvement- Hémostase.

**Summary :** The control of preanalytical variables is critical, particularly for haemostasis assays, since this has a direct influence on the quality of results and their clinical reliability. This paper reviews the precautions that have to be taken in the blood collection, the transport to the laboratory, sample preparation and storage.

**Key-words :** Preanalytical variables- Blood collection - Haemostasis.

L'étude de l'hémostase a bénéficié de grands progrès, mettant à la disposition du biologiste des automates de plus en plus performants et des réactifs de grande qualité. Pour être réellement efficaces, ces examens biologiques nécessitent une plus grande exigence dans la gestion des échantillons à analyser, du prélèvement, à son transport au laboratoire, à son traitement préalable à l'analyse et à sa conservation éventuelle. Ces éléments sont regroupés sous le terme général de variables préanalytiques.

### Facteurs susceptibles de modifier le résultat

#### Facteurs personnels

Le bilan d'hémostase doit être interprété en fonction de certains paramètres tels que l'âge et le sexe. La notion de grossesse est importante à connaître, de nombreux facteurs étant alors modifiés : élévation des taux circulants des facteurs VII et VIII, diminution des taux d'antithrombine et de protéine S... (1). Par ailleurs, certains examens d'hémostase ne peuvent être interprétés qu'en fonction du groupe sanguin. C'est le cas particulier du facteur Willebrand, dont le taux est plus bas chez les sujets de groupe O (2).

#### Facteurs environnementaux

Le patient doit être au repos depuis au moins dix

minutes, sans être nécessairement à jeun. On peut accepter l'absorption d'un petit déjeuner ne comportant pas de matières grasses (lait, beurre, chocolat, œufs). Par contre l'étude des fonctions plaquettaires et l'étude de la fibrinolyse nécessitent un prélèvement à jeun (3). La prise récente d'alcool et le tabac sont susceptibles de modifier les résultats de certains tests (4, 5).

L'heure du prélèvement peut être importante pour certains paramètres. En effet, du fait de l'existence d'une variation circadienne de l'activité fibrinolytique, l'étude de la fibrinolyse nécessite un prélèvement réalisé le matin entre 7 et 9 heures (3).

#### Etats pathologiques

Le prélèvement du bilan de thrombophilie doit être réalisé à distance de l'épisode thrombotique du fait de la consommation possible des inhibiteurs physiologiques de la coagulation. En plus, on note une augmentation réactionnelle des concentrations de C4b-BP, de protéine S et de facteur VIII : c liée au contexte inflammatoire (6).

#### Prise de médicament

De nombreux médicaments, notamment ceux à visée antithrombotique peuvent modifier les résultats de certains tests d'hémostase, par conséquent toute prise médicamenteuse doit être signalée.

Le temps de saignement et l'étude des fonctions plaquettaires sont fortement influencés par de nombreuses

thérapeutiques, en particulier l'aspirine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les antiagrégants plaquet-taires. Ces tests doivent être effectués 10 jours après l'arrêt du traitement (3).

Les héparines peuvent influencer certains examens, voire les rendre ininterprétables. La présence d'héparine fausse la recherche de lupus anticoagulant (7), la recherche de la résistance à la protéine C activée et les méthodes fonctionnelles de dosage des protéines C et S. En outre, les héparines tout particulièrement les héparines non fractionnées, abaissent le taux d'antithrombine, qui ne se corrige que 3 semaines après l'arrêt de l'héparine. Pour la surveillance du traitement anticoagulant, il est indispensable que le biologiste soit informé sur la nature de l'héparine, la posologie exprimée en UI, la voie d'administration, les horaires réels d'administration et le moment du prélèvement. Pour interpréter un résultat discordant, le biologiste pourra, avec le clinicien, s'assurer que les bonnes pratiques de traitement et surtout que les horaires de prélèvement par rapport à l'injection ont été respectés (3) (tableau I). Quant aux antivitamines K, ils agissent en abaissant les taux des facteurs II, VII, IX et X, ainsi que les protéines C et S, dont le dosage devra être effectué avant l'instauration du traitement ou au moins, un mois après son arrêt (8).

Les taux d'antithrombine et de protéine S sont diminués sous oestrogènes. Leurs dosages doivent être effectués un

mois après l'arrêt d'une contraception orale contenant des oestrogènes (3).

### Le prélèvement

#### Le tube de prélèvement

La qualité du matériel de prélèvement est très importante en hémostase. Il est recommandé d'utiliser des tubes en verre siliconé ou des tubes en plastique type polypropylène. Par ailleurs l'usage des tubes sous vide longtemps discuté en hémostase, est actuellement admis, voire conseillé (9).

#### L'anticoagulant

L'anticoagulant de référence est le citrate trisodique 3.2% (0.109 mole) ou 3.8% et les dates de péremption de ces tubes doivent être contrôlées.

L'anticoagulant utilisé peut varier en fonction des paramètres à doser et de la durée du transport du tube. L'utilisation d'un anticoagulant bloquant à la fois la coagulation et l'activation plaquettaire, tel que le mélange CTAD (citrate, théophylline, adénosine, dipyridamole) est particulièrement adaptée à la surveillance des traitements anticoagulants par l'héparine, car en inhibant l'activation des plaquettes, il réduit la neutralisation de l'héparine par le facteur 4 plaquettaire (F4P) (3).

Le CTAD est utilisé pour l'étude des fonctions plaquet-taires et il peut être préconisé pour l'étude de la fibrinolyse, dans certaines situations tel que un délai d'acheminement long au laboratoire (5). Le citrate aci-

**Tableau I : Horaires des prélèvements au cours de la surveillance du traitement curatif par les héparines**

Héparine et posologie	Mode d'administration	Heure de prélèvement
Héparine non fractionnée 400 à 800 UI/ Kg/ 24h	Voie intra-veineuse continue	Indifférente
	Voie intra-veineuse discontinue	1 heure avant l'injection suivante
	Voie sous-cutanée 2 ou 3 injections/ jour	1 heure avant l'injection suivante <b>ou</b> Entre 2 injections (au pic)
Fraxodi® 171 UI/ Kg/ 24h	Voie sous-cutanée 1 injection/ jour	Au pic : entre 4 <sup>ème</sup> et 6 <sup>ème</sup> heure après l'injection
Lovenox® 100 UI/ Kg/ 12h	Voie sous-cutanée 2 injections/ jour	Au pic : entre 3 <sup>ème</sup> et 4 <sup>ème</sup> heure après l'injection
Innohep® 175 UI/ Kg/ 24h	Voie sous-cutanée 1 injection/ jour	Au pic : entre 4 <sup>ème</sup> et 6 <sup>ème</sup> heure après l'injection

difié est préconisé pour la mesure de l'activité du t-PA et de son inhibiteur le PAI-1 (10).

Quant à la numération plaquettaire, on utilise l'EDTA comme anticoagulant.

Par ailleurs pour le suivi des traitements thrombolytiques, il est préconisé d'utiliser une antiprotéase pour éviter la poursuite de l'activation de la fibrinolyse in vitro. On peut utiliser un mélange citrate plus aprotinine préparé par le laboratoire (3).

### **Les conditions de prélèvement**

Les modalités de prélèvement sont aussi importantes. En effet, la veine choisie au pli du coude doit être d'un calibre suffisant pour permettre une ponction franche et un écoulement facile du sang en jet continu, ce qui évitera l'activation de la coagulation (4). Quant au garrot, il doit être peu serré et laissé en place le minimum de temps possible (moins de 1 minute), mais l'idéal est de prélever sans garrot (3, 9).

Le prélèvement doit être fait dans le bras opposé à la perfusion d'héparine. Parfois le prélèvement sur cathéter est inévitable, entraînant un retentissement sur le temps de céphaline avec activateur et le temps de thrombine, du fait de la présence d'héparine dans le cathéter. Un rejet de 10 à 15 ml de sang est donc nécessaire avant le prélèvement pour l'étude de l'hémostase.

Quant à l'aiguille de prélèvement, elle doit être d'un calibre assez grand (0.7 à 1 mm).

Actuellement on recommande que le tube d'hémostase soit prélevé en deuxième position après un tube sans anticoagulant. En revanche, si le bilan ne nécessite pas un tube sec, ou si on utilise des tubes «sérum» sous vide avec activateur de la coagulation, il y a risque de souillure et le tube d'hémostase sera prélevé en premier. Le tube d'hémostase peut être prélevé en premier, à condition que le préleveur soit suffisamment qualifié, pour piquer de façon franche (9, 12).

Il est impératif de respecter le volume de sang prélevé par rapport au volume de l'anticoagulant. Il faut donc s'assurer du bon remplissage du tube et un minimum de 90% est nécessaire (3). Lorsque la mesure de l'hématocrite est en dehors de l'intervalle 30-55%, il faut modifier le volume (V) d'anticoagulant utilisé en

appliquant la formule de McGann :  $V = 0.00185 \times \text{volume de sang (ml)} \times (100 - \text{hématocrite}\%)$  (4).

Le tube de prélèvement devra être agité par retournements lents.

### **Particularité du prélèvement en pédiatrie**

Le prélèvement constitue un problème important en pédiatrie et il est souvent difficile d'obtenir un volume de sang suffisant, soit parce que l'écoulement du sang se tarit rapidement, soit parce que le volume sanguin total du patient est faible. On dispose actuellement de tubes à prélèvement à usage pédiatrique d'un volume réduit à 2 ml. L'introduction de microprélèvements sur tube capillaire représente un progrès important chez le nouveau-né et le prématuré. Cependant, les tests globaux d'exploration de l'hémostase ne sont pas encore réalisables sur sang capillaire (11).

### **L'acheminement au laboratoire**

L'acheminement au laboratoire doit être le plus rapide possible et un délai entre le prélèvement et le traitement de l'échantillon inférieur à 2 heures est toléré. Il est important de mentionner l'heure du prélèvement, surtout lorsqu'il s'agit de dosage de facteurs labiles comme les facteurs V et VIII de la coagulation (13).

Le transport du tube de prélèvement est fait à température ambiante, la température idéale étant comprise entre 15° et 20° C. La conservation au froid est à proscrire. Elle est à l'origine d'altérations des fonctions plaquettaires et d'une activation des facteurs VII et X induisant notamment un raccourcissement du temps de Quick (3).

### **Le traitement de l'échantillon**

La majorité des analyses spécifiques de l'hémostase sont réalisées le jour même sur du plasma pauvre en plaquettes (PPP), obtenu par centrifugation à 15-20°C pendant 15 minutes à 2500 g. Pour certaines analyses, le plasma peut être congelé : le PPP est décanté, soumis à une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. Le surnageant est recueilli à distance de l'interface avec l'air et le culot cellulaire. Il est aliquoté dans des tubes en plastique (3, 5).

Les explorations fonctionnelles plaquettaires sont réalisées

sur du plasma riche en plaquettes (PRP), obtenu après centrifugation lente à 120 g pendant 10 minutes, avec l'obligation de se débarrasser des globules rouges (3).

Par ailleurs, l'échantillon destiné à l'étude de la fibrinolyse, doit être maintenu à + 4° C, tout au long de sa préparation.

### Congélation du plasma

La congélation doit être très rapide en tube propylène hermétiquement bouché, sous un volume minimum de 300 ml. La température idéale qui permet de préserver l'activité biologique des facteurs est de - 70°C, mais en cas de conservation ne dépassant pas une quinzaine de jours, la congélation à - 20° C est acceptable. En cas de transport, il est impératif de maintenir les plasma congelés dans de la glace pilée ou dans de la carboglace, en fonction du délai d'acheminement au laboratoire (13). Au moment de l'analyse, l'échantillon doit être rapidement décongelé au bain-marie à 37° C, sans toutefois l'y laisser une fois la décongélation réalisée.

### Conclusion

Les examens d'hémostase sont particulièrement sensibles aux contraintes préanalytiques et il est fondamental d'assurer un prélèvement de qualité. Par conséquent il est préférable que le prélèvement soit effectué au laboratoire par une personne expérimentée et sous la responsabilité directe du biologiste. Lorsque le prélèvement est effectué en dehors du laboratoire et pour éviter que de mauvaises conditions ne nuisent à la réalisation correcte de l'analyse, il est indispensable d'établir, avec les personnes chargées des prélèvements et celles ayant la responsabilité du transport des échantillons biologiques, un protocole qui devra être rigoureusement respecté.

### Références

- 1- Conard J. Hémostase et grossesse. In : Sampol J, Arnoux D, Boutière B. Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, 1995 : 551-63.
- 2- Gill JC, Endres-Books J, Bauer J, Marks WJ, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987, 69 : 1691-5.
- 3- Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose (GEHT). Les variables préanalytiques en hémostase. *Sang Throm Vaiss* 1998, 10 (numéro spécial) : 1-40.
- 4- Oueslati A. Les prélèvements en hématologie. In : Les prélèvements en biologie clinique. Unité des laboratoires de biologie médicale. Tunis 2001 : 20-23.
- 5- Sié P. Exploration de la coagulation. In : Sampol J, Arnoux D, Boutière B. Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, 1995 : 147-63.
- 6- Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose (GEHT). Stratégie de diagnostic biologique des maladies hémorragiques et thrombotiques constitutionnelles ou acquises. *Sang Throm Vaiss* 1993, 5 (supplément) : 1-40.
- 7- Arnoux D, Boutière B, Sanmarco M. les anticorps «anti-phospholipides» : intérêt clinique et diagnostic biologique. *Ann Biol Clin* 2000, 58 (5) :557-74.
- 8- Gaussem P, Siguret V, Aiach M. Exploration de l'hémostase dans la pathologie thromboembolique veineuse. *Ann Biol Clin* 1998, 56 : 49-56.
- 9- Schved J-F, Jude B, Boneu B. les prélèvements sanguins veineux pour l'étude de l'hémostase à l'aide de tubes sous vide. *Ann Biol Clin* 2002, 60 :731-3.
- 10- Alessi MC, Aillaud MF, Juhan-Vague I. Exploration de la fibrinolyse. In : Sampol J, Arnoux D, Boutière B. Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, 1995 : 165-175.
- 11- Hurtaud-Roux MF, Schlegel N. Hémostase du nouveau-né et de l'enfant. In : Sampol J, Arnoux D, Boutière B. Manuel d'hémostase. Paris, Elsevier, 1995 : 565-85.
- 12- Gottfried EL, Adachi MM. Prothrombinetime and activated partial thromboplastin time can be performed on the first tube. *Am J Clin Pathol* 1997, 107 : 681-3.
- 13- Schved J-F, Sarlat C, Gris JC. Recommandations pratiques pour la réalisation des tests d'hémostase : du prélèvement au