

### SUJETS ABORDÉS

- ✓ Contrôle des substances potentiellement dangereuses pour la santé
- ✓ Sécurité au laboratoire
- ✓ Responsables de sécurité
- ✓ Guide de sécurité
- ✓ Mesures de sécurité - Précautions universelles
- ✓ Équipement général de laboratoire
- ✓ Métrologie
- ✓ Évaluation et utilisation des coagulomètres

**Contrôle des substances potentiellement dangereuses pour la santé :** la norme EN ISO 15189 spécifie les exigences de qualité et de compétence applicables aux laboratoires de biologie médicale. Elle est destinée à être utilisée dans toutes les disciplines effectivement pratiquées par les laboratoires de biologie médicale. Son application est donc fondamentale pour les laboratoires car leurs services doivent satisfaire les besoins à la fois des patients et des cliniciens responsables des soins prodigues à ces patients. Les prestations des laboratoires incluent la prescription des examens, la préparation du patient et son identification, le prélèvement d'échantillons, le transport, la conservation, le prétraitement et l'analyse d'échantillons biologiques, suivis de l'interprétation des résultats, du compte rendu et du conseil, tout en assurant la sécurité du personnel et le respect de l'éthique.

**Sécurité au laboratoire :** les laboratoires dans lesquels on manipule des échantillons chimiques et biologiques sont des lieux potentiellement dangereux. Il a été constaté ces dernières années que le secteur accordait une importance de plus en plus grande aux pratiques de travail sûres, tant pour des raisons de santé qu'environnementales. Ainsi, grâce à cette sensibilisation, on insiste davantage sur des points comme la documentation en matière de sécurité, la formation du personnel et l'évaluation des risques. Les employeurs ont la responsabilité de fournir les vêtements et l'équipement de protection nécessaires et l'obligation de dispenser les formations en matière de pratiques de travail sûres. Si ces pratiques sont en place, la probabilité qu'un membre du personnel ou le public subisse des blessures graves devrait être grandement réduite.

**Responsables de sécurité :** il est important de nommer un ou plusieurs responsables de sécurité pour chaque service. Ces personnes sont responsables de mettre en place et de maintenir les pratiques de sécurité. La sécurité reste néanmoins la responsabilité de tous les membres du personnel dans le laboratoire.

**Guide de sécurité :** il convient de rédiger un guide de sécurité exhaustif qui traite de tous les aspects des pratiques de travail sûres pour l'entièreté du service. Tous les membres du personnel doivent lire ce guide et signer une déclaration pour indiquer qu'ils l'ont compris. Les responsables de sécurité doivent conserver des exemplaires du guide. Le guide doit aussi être à disposition, placé à des endroits facilement accessibles pour l'ensemble du personnel, soit sous forme imprimée, soit de préférence sous forme électronique, afin de systématiquement disposer de la version à jour.

**Mesures de sécurité - Précautions universelles :** selon le système de précautions universelles, tout danger d'infection d'une source quelle qu'elle soit sera évité ou minimisé grâce à de bonnes pratiques de travail. Tous les échantillons sanguins, les produits sanguins (y compris les kits et les réactifs à base de plasma) et les autres matières d'origine humaine doivent être considérés comme comportant un risque possible d'infection. Il faut toujours prendre les mesures de protection maximales, quelle que soit la

matière avec laquelle on travaille. Aucune autre classification du risque ne doit être faite. L'ensemble des matières et fluides corporels autres que le sang, qu'ils soient recueillis ou apportés dans l'unité à des fins d'analyse ou autre, doivent être manipulés avec autant de soin que le sang.

*Le laboratoire* : le laboratoire doit toujours être propre et bien rangé. Les documents doivent être séparés des zones d'analyse de laboratoire. Essayer de ne pas entreposer d'articles en vrac dans le laboratoire. Faire en sorte que tout le personnel participe au maintien de l'ordre dans le laboratoire.

*Vêtements de protection* : toute personne qui entre dans le laboratoire, y compris les visiteurs, doit porter une blouse. La blouse doit être immédiatement remplacée si elle est contaminée.

*Gants jetables* : beaucoup de personnes n'aiment pas se servir de gants, mais il est recommandé de porter des gants jetables en latex ou en polyacrylamide, car chaque échantillon manipulé en laboratoire est potentiellement dangereux. Lors de la manipulation de matières toxiques, il convient de systématiquement porter des gants. Les gants et les blouses n'offrent évidemment aucune protection contre les piqûres accidentelles avec des aiguilles, mais ils éviteront par exemple que du sérum ou du plasma positif pour le VIH entre en contact avec une coupure ou une éraflure sur la peau. Il est obligatoire de systématiquement remplacer les gants dès qu'ils sont déchirés ou troués.

*Lavage des yeux* : se laver immédiatement les yeux sous l'eau courante froide en cas de contact avec une matière potentiellement infectieuse, car de nombreuses infections peuvent être facilement contractées par contact avec les muqueuses des yeux.

*Objets pointus et tranchants* : les objets pointus et tranchants, comme les aiguilles et le verre brisé, présentent un danger important. Utiliser une boîte suffisamment solide pour ces objets. Il existe des cas de contraction d'une infection à la suite de blessures causées par une piqûre d'aiguille.

*Aérosols* : éviter toutes les pratiques à ciel ouvert du laboratoire qui peuvent provoquer des éclaboussures ou libérer des gouttelettes ou de la poussière en suspension dans l'air. Les manipulations qui produisent des aérosols doivent toujours être effectuées dans une hotte fermée adaptée ; des lunettes de sécurité doivent être portées. Tout liquide renversé doit être nettoyé sur-le-champ, en utilisant de l'eau de Javel ou un agent neutralisant si nécessaire.

*Substances toxiques et inflammables* : les substances toxiques et inflammables doivent toujours être maintenues dans une hotte ou une armoire sécurisée appropriée.

*Équipement électrique* : faire particulièrement attention avec tout appareil qui fonctionne avec des liquides, comme les cuves d'électrophorèse et les bains-marie. Confier systématiquement les travaux d'installation, d'entretien et de réparation à du personnel compétent.

*Effets personnels et comportement* : n'apporter jamais d'effets personnels (stylos, sacs, peignes, etc.) dans le laboratoire. Au laboratoire, éviter de se toucher le visage ou les muqueuses (yeux, nez et bouche) avec les mains. Si c'est inévitable, veiller à toujours se laver les mains au préalable. Se laver toujours soigneusement les mains avant de quitter le laboratoire. Ne jamais faire de pipetage à la bouche. La nourriture, les cigarettes et les produits cosmétiques ne doivent jamais entrer dans le laboratoire. Cela implique d'éviter de manger, boire et fumer dans le laboratoire.

*Accidents* : tous les accidents doivent être immédiatement signalés et consignés dans un registre des accidents tenu par le responsable de sécurité de l'unité. Ceci est particulièrement important en ce qui concerne les blessures par piqûre d'aiguille. Dans ces situations, suivre la procédure locale pour consigner et signaler l'accident, ainsi que toute action recommandée ou requise à l'échelle locale.

**Contrôle des substances potentiellement dangereuses pour la santé** : les laboratoires doivent se conformer à la réglementation locale, qui publie souvent des guides utiles pour identifier les risques et les

dangers, tels que le contrôle des substances dangereuses pour la santé (COSHH) dans les laboratoires britanniques.

*Danger et risque* : le danger inhérent à une substance est son potentiel à causer des dommages. Le risque d'une substance est la probabilité qu'elle provoque des dommages à quelqu'un dans des conditions réelles d'utilisation.

*Détermination des dangers* : la détermination des dangers est une condition préalable essentielle de l'évaluation des risques. Le temps nécessaire pour déterminer les dangers variera en fonction de la substance.

*Évaluation des risques*. Tenir compte des faits suivants :

- Dangers
- Conditions d'utilisation
- Quantités à utiliser
- Voies ou sites d'exposition probables (inhalation, ingestion, peau ou yeux)

Le résultat de l'évaluation des risques déterminera :

- Conditions de stockage
- Procédures de manutention
- Procédures d'élimination
- Exigences relatives au contrôle et à la surveillance médicale
- Procédures d'urgence

L'évaluation des risques doit être révisée annuellement et mise à jour s'il y a lieu. Est illustré au tableau 1 un exemple de la manière de consigner les informations pour les évaluations du risque, selon la procédure COSHH utilisée dans les laboratoires britanniques. L'objet de ce formulaire est de déterminer les dangers et les mesures de contrôle associées à l'équipement utilisé dans une procédure particulière. Seul le personnel attesté comme compétent peut effectuer une procédure et il ne peut l'effectuer qu'après avoir étudié la documentation sur la santé et la sécurité liée à cette analyse particulière.

**Tableau 1.** COSHH pour le temps de prothrombine et les tests de facteurs de coagulation basés sur le TCA

N° RÉF. ÉPREUVES COSHH 1		Dosages en un temps de réf. en laboratoire pour les facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, XI et XII	
Titre de la procédure/l'expérience :			
Substance	Quantité approx.	Danger déterminé	
Tampon glyoxaline (imidazole), contient (voir**)	< 5 ml	Nocif en cas d'ingestion.	
**Imidazole	3,4 g/l	Corrosif : provoque des brûlures. Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion ou d'absorption par la peau. Irritant pour les yeux.	
**Chlorure de sodium	5,85 g/l	Irritant pour les yeux et les poumons. Éviter tout contact avec la peau.	
Plasma déficient en facteurs	1 ml	Risque d'infection.	
Thromboplastine	2 ml	Risque faible.	
Réactif pour la détermination du TCA	2 ml	Risque faible.	
Chlorure de calcium 0,025 M	5 ml	Risque faible.	
Tampon d'Owren	<500 ml	Contient du barbital. Nocif en cas d'ingestion. Peut provoquer une sensibilisation par contact cutané ou par inhalation.	

Solution 1 de lavage de l'analyseur de coagulation	<50 ml	Provoque des brûlures : nocif pour les yeux, la peau, etc. Ne pas mélanger avec d'autres désinfectants. Corrosif. Le contact avec des matières combustibles peut provoquer un incendie. Le contact avec l'acide libère des gaz toxiques. Réagit violemment avec les sels d'ammonium ; solvant organique - risque d'explosion.
Solution 2 de lavage de l'analyseur de coagulation	<50 ml	Contient de l'acide chlorhydrique à 0,16 % et un détergent. Irritant : peut léser les yeux et la peau.
Plasma de référence/de contrôle/du patient	<1000 µl	Risque d'infection.

**Équipement général de laboratoire :** tout laboratoire impliqué dans le diagnostic et le suivi du traitement des troubles de la coagulation utilisant certaines ou toutes les techniques décrites dans le présent manuel nécessitera un minimum d'équipement de base.

*Équipement général.* Les exigences de base en matière d'équipement sont les suivantes :

- 1) Un réfrigérateur à 4 °C pour la conservation des réactifs. Les réactifs doivent normalement être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C, sauf indication contraire du fabricant. Un appareil ménager de bonne qualité peut convenir.
- 2) Un congélateur capable de maintenir une température d'au moins -20 °C (de préférence -35 °C). Une température plus basse, par exemple -70 °C, est utile pour une conservation plus longue, car les facteurs de coagulation sont stables à cette température pendant au moins six mois. Les congélateurs avec cycle de dégivrage automatique ne conviennent absolument pas.
- 3) Bain(s) d'eau régulé(s) capable(s) de maintenir des températures de  $37 \pm 0,5$  °C. La température est normalement mieux maintenue dans un bainmarie que dans des thermoblocs à sec, qui peuvent ou non convenir, selon l'appareil.
- 4) Un pH-mètre.
- 5) Une source de lumière.
- 6) Un ou des chronomètres.
- 7) Pipettes automatiques calibrées capables de délivrer avec précision un volume d'échantillon et de réactif compris entre 0 et 200 µl et jusqu'à 1000 µl. Il est important de vérifier régulièrement l'exactitude de ces pipettes.
- 8) Une pipette étalonnée pour la distribution de volumes de liquide allant jusqu'à 5 ml.
- 9) Une centrifugeuse capable de tourner à au moins 1700 g, et de préférence entre 2200 et 2500 g. Pour la plupart des analyses de coagulation, la centrifugation à température ambiante (20-25 °C) est acceptable, même si la centrifugation à 4 °C est recommandée dans certaines techniques.
- 10) Une balance analytique étalonnée capable de mesurer avec exactitude les grammes jusqu'à la troisième décimale.

Un équipement supplémentaire est nécessaire pour certaines procédures, notamment :

- 11) Un analyseur de coagulation (coagulomètre).
- 12) Un lecteur de microplaques pour les tests ELISA (test d'immunoabsorption enzymatique).
- 13) Un agrégomètre plaquettaire. Équipement indiqué sur la fiche d'une méthode particulière.

La climatisation dans chaque pièce est un avantage indéniable dans les pays où les températures sont élevées.

Il devrait y avoir une quantité suffisante de matériel jetable. La réutilisation des tubes à essai et des embouts de pipette après nettoyage devrait être évitée, puisque des résidus peuvent compromettre les résultats,

occasionnant ainsi des pertes de réactifs et de temps. Il en va de même pour les tubes de prélèvement, qui sont conçus pour un usage unique et ne doivent pas être réutilisés même après un lavage intensif.

**Métrologie** : afin de faciliter le management de la qualité, l'étalonnage de la balance et du volume des pipettes doit être vérifié tous les trois à six mois. Cesser immédiatement d'utiliser les appareils mal étalonnés jusqu'à ce qu'ils soient réétalonnés. Chaque pipette doit avoir un identifiant unique.

**Méthode pour la vérification de l'étalonnage des pipettes** : les pipettes peuvent être à volume unique, à deux ou trois volumes ou pour une gamme continue de volumes.

- Les pipettes à un ou deux volumes fixes sont vérifiées à chacun des volumes.
- Les pipettes à trois volumes fixes sont vérifiées pour les volumes maximum et minimum.
- Pipettes ayant une gamme continue de réglages de volumes : vérifier le réglage maximum ainsi qu'un volume d'environ 25 % du réglage maximum, à savoir :
  - Pipette de 10 ml – 10 ml et 2,5 ml
  - Pipette de 5 ml – 5 ml et 1,25 ml
  - Pipette de 1 ml – 1 ml (1000 µl) et 0,25 ml (250 µl)
  - Pipette de 0,2 ml – 0,2 ml (200 µl) et 0,05 ml (50 µl)
  - Pipette de 0,1 ml – 0,1 ml (100 µl) et 0,025 ml (25 µl)
  - Pipette de 50 µl – 50 µl et 15 µl

Vérifier l'étalonnage en pesant cinq volumes répétés d'eau distillée (à température ambiante) sur une balance. Chaque mesure de poids est notée en grammes (plus trois décimales). Pour des raisons pratiques, 1,000 ml d'eau distillée pèse 1,000 g.

Les résultats et toute mesure prise doivent être consignés. Il serait préférable que les pipettes soient ajustées avec un écart bien inférieur à 10 % (voir les exemples cidessous). Lorsqu'une pipette s'avère inexacte (le volume pipeté moyen diffère du volume attendu de plus de 10 %), il faut immédiatement cesser de l'utiliser jusqu'à ce qu'elle soit réétalonnée, conformément aux instructions du fabricant.

Remarque : si l'inexactitude dépasse les limites suivantes (poids moyen), il faut immédiatement cesser d'utiliser la pipette.

**Pipette de 10 ml**

10 ml : 9,000 à 11,000 g  
2,5 ml : 2,250 à 2,750 g

**Pipette de 5 ml**

5 ml : 4,500 à 5,500 g  
1,25 ml : 1,125 à 1,375 g

**Pipette de 1 ml**

1 ml : 0,900 à 1,100 g  
0,25 ml : 0,225 à 0,275 g

**Pipette de 0,2 ml**

0,2 ml : 0,180 à 0,220 g  
0,05 ml : 0,045 à 0,055 g

**Pipette de 0,1 ml**

0,1 ml : 0,090 à 0,110 g  
0,25 ml : 0,225 à 0,0275 g

**Pipette de 50 µl**

50 µl : 0,045 à 0,055 g  
15 µl : 0,013 à 0,165 g

Pour plus d'informations, voir le document ISO 8655-2-2002, disponible en différentes langues.

**Méthode pour la vérification des balances** : pour s'assurer de leur exactitude, les poids étalonnés sont pesés tous les six mois et les résultats consignés.

- 1) Remettre la balance à zéro.
- 2) Peser les trois poids étalonnés, un par un. Noter les résultats à trois décimales près (p. ex. 1,003 g).

- 3) Tout poids dont la mesure est hors des limites indiquées (> 2 %) ne doit pas être utilisé tant que le problème n'est pas réglé.

**Méthode pour la vérification de la température des armoires réfrigérées :** la température interne des réfrigérateurs doit être maintenue à +4 °C (généralement entre +2 et +7 °C) à l'aide d'une sonde de température et doit idéalement être enregistrée en permanence, soit à l'aide d'un disque imprimé local, soit par voie électronique. Il en va de même pour les congélateurs, qui doivent se maintenir à des températures de -20 °C ou -35 °C, voire inférieures à -70 °C.

**Évaluation et utilisation des coagulomètres :** l'automatisation est désormais répandue dans les laboratoires d'analyse de la coagulation de la plupart des régions du monde. Elle a contribué à améliorer la standardisation et à faciliter les tests qui exigent une formation et des conditions de travail spécifiques, de sorte que les laboratoires peuvent améliorer leur efficacité et profiter d'un meilleur catalogue de prestations. L'automatisation dans le domaine de l'hémostase est relativement récente. Les méthodes manuelles reposant sur la détection visuelle du caillot de fibrine et faisant appel à des incubateurs à 37 °C étaient autrefois les seules techniques d'étude de la coagulation. Dans les années 1970, sont arrivés de nouveaux appareils semi-automatiques utilisant des principes photométriques ou mécaniques pour détecter la fibrine. Plus récemment, les laboratoires modernes font usage d'instruments entièrement automatisés. Aujourd'hui, de nouveaux appareils connectés aux systèmes d'information de laboratoire, incluant généralement des systèmes de traitement de données spécifiques, peuvent effectuer des tests de coagulation, chromogéniques et immunologiques.

Deux méthodologies, qui reposent sur des systèmes de détection mécaniques et optiques, sont principalement disponibles aujourd'hui. Les systèmes mécaniques ne permettent d'effectuer que des tests de coagulation, tandis que les systèmes optiques permettent de pratiquer des tests chronométriques, chromogéniques et immunologiques reposant sur des principes photo-optiques, néphélométriques, chromogéniques et immunologiques. En outre, il y a sur le marché de plus en plus d'analyseurs à base de fluorescence et de chimiluminescence, ce qui permet d'effectuer des dosages spécifiques avec une large gamme de mesures.

**Principe mécanique :** les méthodes électromagnétiques sont fondées sur la détection d'une augmentation de la viscosité du plasma lors de la formation de fibrine. Deux variantes de ce principe s'appliquent à l'équipement de laboratoire aujourd'hui.

La première utilise un champ électromagnétique appliqué aux cuvettes de test qui détecte le mouvement d'une sphère en acier inoxydable placée dans l'échantillon plasmatique. La sphère d'acier suit un mouvement de pendule, se balançant d'un côté à l'autre d'un mouvement continu dans un mélange de réactif et de plasma. Au fur et à mesure que la fibrine se forme, la viscosité augmente et le mouvement de la sphère est ralenti. Lorsque l'oscillation de la sphère atteint un niveau prédéterminé, le chronomètre s'arrête et indique le temps de coagulation du plasma.

Une deuxième méthode de détection mécanique utilise également une sphère en acier inoxydable, placée cette fois à un endroit précis. Un capteur magnétique détecte la position de la sphère et, alors que la cuvette tourne, la sphère maintient son inclinaison tant que l'échantillon liquide demeure fluide. Lorsque la fibrine est formée, le caillot s'empare de la sphère et la déplace de son emplacement initial. Lorsque la sphère sort de la portée du capteur, le circuit est interrompu et le chronomètre s'arrête.

#### Principes optique ou spectrophotométrique

**Principe photo-optique :** les systèmes optiques s'appuient sur le fait que la formation de caillot provoque un changement dans la densité optique du plasma. Lors de la formation du caillot, les caractéristiques optiques du plasma/des réactifs mesurées initialement se modifient. Ces modifications sont monitorées et utilisées pour déterminer le temps nécessaire pour qu'un certain degré de changement se produise.

*Principe néphéломétrique* : certains systèmes font appel à ce principe. Dans des tests de coagulation, une source de lumière laser monochromatique est transmise, par exemple, au moyen de fibres optiques. La lecture de la dispersion de la lumière est rendue possible par un capteur qui peut être installé à 90 ou 180 degrés du trajet de la lumière, selon le système employé, qui mesure par la suite la lumière diffusée à un certain angle ou qui enregistre les changements de la transmission de la lumière. Lorsque la lumière atteint des complexes insolubles comme les fibres de fibrine, elle se disperse à des angles de diffusion frontale (180 degrés) et latérale (90 degrés). Le chronomètre s'arrête lorsque la quantité de lumière diffusée ou transmise atteint un certain niveau prédéterminé. La différence entre la lumière diffusée ou transmise avant et après la formation du caillot est habituellement proportionnelle à la quantité de fibrine formée.

*Principe chromogénique* : ce principe se fonde sur l'usage d'une substance générant une couleur spécifique, appelée « chromophore », dont la paranitroaniline (pNA) est la plus courante. Elle a une absorbance maximale à 405 nm. Le principe du test chromogénique est fondé sur la liaison de la pNA aux substrats synthétiques. La pNA est fixée à une suite d'acides aminés qui imitent la séquence cible du facteur de coagulation activé que nous voulons déterminer. La protéine de coagulation clive le substrat chromogénique à un endroit précis dans une séquence définie d'acides aminés et libère la pNA. L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la quantité de pNA libérée. Celleci est mesurée par photodétection à une longueur d'onde de 405 nm. Plus le clivage et la libération de pNA sont importants, plus la capacité d'absorbance de l'échantillon augmente, ce qui entraîne des changements plus importants dans la densité optique de la solution. Les premiers appareils de coagulation ne pouvaient fournir qu'un seul paramètre de définition, tel un paramètre mécanique ou photo-optique. Les outils photo-optiques étaient à l'origine conçus pour faire la lecture d'une seule longueur d'onde (p. ex. 500 ou 600 nm), qui pouvait servir uniquement à la détection de la formation du caillot. Plus récemment, certains coagulomètres peuvent faire la lecture à deux ou plusieurs longueurs d'onde, incluant souvent 405 nm, ce qui augmente la possibilité de réactions plus modernes (méthodes utilisant des substrats chromogéniques). Dans les années 1990, un certain nombre de fabricants ont intégré les méthodes de détection multiples ; ainsi, un même laboratoire peut désormais appliquer des méthodologies multiples avec le même équipement.

*Principe immunologique* : des microparticules de latex enrobées d'un anticorps spécifique contre l'analyte (l'antigène) à mesurer sont habituellement utilisées. Un faisceau de lumière monochromatique traverse une suspension de microparticules de latex. Lorsque la longueur d'onde est supérieure au diamètre des particules en suspension, les particules absorbent une petite quantité de lumière. Cependant, lorsque les microparticules de latex enrobées d'anticorps spécifique entrent en contact avec l'antigène présent dans la solution, elles adhèrent à l'anticorps en créant des liens entre les particules, ce qui produit leur agglutination. Lorsque le diamètre des particules agglutinées s'approche de la longueur d'onde du faisceau de lumière monochromatique, une plus grande quantité de lumière est absorbée. Cette augmentation de l'absorption de la lumière est proportionnelle à l'agglutination, qui, à son tour, est proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. Ce type de technologie est présent dans les analyseurs de coagulation plus sophistiqués introduits sur le marché dans les années 1990. Des tests immunologiques classiques, qui exigent habituellement beaucoup de temps, peuvent être effectués en quelques minutes lorsque l'un de ces outils automatisés est employé.

**Tableau 2.** Avantages et inconvénients des méthodes de détection dans la définition de paramètres

Méthode	Avantages	Inconvénients
<b>Mechanical</b>	Aucune interférence de caractéristiques physiques comme la lipémie ou l'ictère Possibilité d'utiliser de petits volumes d'échantillon	Impossibilité d'observer graphiquement la formation d'un caillot Peut poser des problèmes sur le plan de la détection du point final dans certains échantillons contenant un taux de fibrinogène bas
<b>Photo-optique</b>	Possibilité de voir graphiquement la formation de caillots Vérifications optiques pour hémolyse/lipémie/ictère dans certains systèmes optiques Possibilité d'utiliser de petits volumes d'échantillon	Interférences dues à la lipémie, à l'hémolyse, à l'hyperbilirubinémie ou à l'augmentation de protéines dans certains systèmes Sur certains systèmes, difficulté à détecter les caillots lors de l'emploi de réactifs complètement transparents Des temps de coagulation très courts peuvent ne pas être détectés en raison du temps de latence précédent le début du monitorage
<b>Néphéломétrique</b>	Peut mesurer les réactions antigène-anticorps de protéines présentes en très petites quantités	Limite le nombre de tests disponibles Coût des réactifs
<b>Chromogénique</b>	Les tests totalement spécifiques pourraient être plus faciles Possibilité de paramètres additionnels qui ne peuvent pas être mesurés par la détection d'un caillot Augmente le répertoire des tests possibles Améliorations possibles de la fidélité de mesure comparativement aux analyses à base de formation du caillot	Limite par la longueur d'onde de l'instrument Nécessite de grands volumes à tester pour un rapport coût-bénéfice positif Coût de l'instrument et des réactifs
<b>Immunologique</b>	Permet l'automatisation de méthodes manuelles chronophages Augmente le nombre de tests possibles	Nombre limité de tests disponibles Coût des instruments Coût des réactifs

#### Avantages de l'automatisation dans le laboratoire d'analyse de la coagulation :

- 1) Améliore la capacité et la flexibilité du temps passé par les professionnels (Rodak, 1995).
- 2) Améliore la reproductibilité des tests. Par le passé, les tests de coagulation réalisés manuellement étaient inexacts et les coefficients de variation étaient supérieurs à 20 % ; les appareils semi-automatiques ont apporté une plus grande exactitude. Toutefois, en raison du pipetage manuel des échantillons et des réactifs, les tests doivent être faits en double. L'équipement entièrement automatisé améliore l'exactitude, qui atteint des coefficients de variation inférieurs à 5 %, voire 1 % pour certains tests. Ainsi, certains auteurs ont introduit la notion de tests réalisés une seule fois et la possibilité de réduire de moitié les coûts des réactifs et des cuvettes.
- 3) Réduit le coût des échantillons et des réactifs, par l'utilisation de volumes plus faibles de plasma et de réactifs (au moins la moitié).
- 4) Facilite le stockage et la recherche de données au moyen de logiciels informatiques.
- 5) Permet de tester à nouveau les résultats automatiquement lorsque des erreurs sont commises lors de la première analyse.
- 6) Offre la possibilité d'exécuter différents tests sur un même échantillon.

- 7) Permet l'échantillonnage à partir d'un tube fermé, ce qui augmente la sécurité et l'efficacité des tests de coagulation. Cela réduit dans une large mesure le risque d'exposition de l'opérateur à des aérosols ou des éclaboussures de l'échantillon du patient, ou d'erreur d'étiquetage. À titre anecdotique, un fabricant propose un système breveté de dépistage qui sépare automatiquement le plasma des érythrocytes avant d'effectuer les tests sans centrifugation préalable.
- 8) Permet de diluer les échantillons, les étalons et les contrôles. L'équipement peut être programmé pour des dilutions additionnelles si le résultat initial échappe à la linéarité de la méthode. Il peut aussi effectuer automatiquement d'autres tests sans intervention de l'opérateur s'il est cliniquement justifié de procéder ainsi, ou en raison des résultats obtenus au premier essai.
- 9) La plupart des analyseurs comportent des systèmes d'alarme qui avertissent l'opérateur de dépassements de critères préétablis, susceptibles d'indiquer des problèmes au niveau de l'équipement (p. ex. quantité de réactif trop faible, défaillance sur le plan de la température, volume d'échantillon trop petit et erreurs dans le contrôle qualité), ainsi que d'erreurs pré-analytiques (tubes sous-remplis, hémolyse, ictere, lipémie et présence de caillots).

Les types de méthodologies disponibles comportent des avantages et des inconvénients qui doivent être connus et compris afin de garantir la fidélité et la validité des résultats des tests. Il est important de tenir compte du fait que les laboratoires ont la responsabilité de produire des résultats fiables. La préoccupation principale d'un laboratoire est de choisir l'équipement de coagulation qui fournit des résultats appropriés malgré les restrictions budgétaires. De tels instruments exigent un entretien technique régulier, la mise à jour des connaissances et des contrôles du système, puisqu'une erreur ou une défaillance peut influencer de façon décisive un certain nombre de facteurs. Les systèmes de contrôle qui garantissent la fiabilité analytique sont par conséquent obligatoires.

Certains laboratoires ont la chance de pouvoir évaluer l'équipement avant d'en faire l'achat. Si cela n'est pas possible, il est très important d'obtenir des renseignements adéquats et des conseils d'un laboratoire de référence, en plus de passer la littérature en revue.

Lors de l'évaluation précédant l'achat d'un nouvel équipement, comparer d'abord les analyseurs en fonction de critères tels que :

- Coût de l'équipement et de l'entretien
- Période d'inactivité et fiabilité
- Délai de réponse aux demandes de réparation
- Facilité d'utilisation
- Disponibilité de services d'entretien adéquats dans un délai approprié
- Processus de validation et temps de traitement
- Coût des consommables
- Flexibilité en ce qui concerne l'usage de réactifs d'autres fabricants
- Possibilité d'ajouter de nouveaux protocoles de tests
- Possibilité et coût de connexion avec le système d'information du laboratoire
- Sessions de formation et promotion de la formation continue

La sensibilité de différents types d'équipement à divers paramètres variera en fonction de la façon dont les machines sont étalonnées et de la manière dont le point final de la réaction est détecté. Les laboratoires ont des besoins différents et il est conseillé d'établir l'ordre des priorités. Pour un exemple, voir le tableau 3.

**Tableau 3.** Caractéristiques des équipements spécialisés (d'après Rodak, 1995)

Caractéristiques	Description
Accès aléatoire	Avec l'échantillon du patient, une gamme de tests différents peut être effectuée en même temps, dans n'importe quel ordre.
Tube d'échantillon primaire	L'échantillon de plasma est directement prélevé par aspiration dans le tube de prélèvement ouvert placé dans l'analyseur.
Système de pénétration d'un tube de prélèvement fermé	L'analyseur aspire l'échantillon de plasma dans le tube de prélèvement avec le bouchon de caoutchouc en place.
Code-barres	Permet l'identification de réactifs, d'échantillons de patients ou des deux au moyen d'un code-barres. Ceci réduit la saisie de données manuelle.
Interphase bidirectionnelle	L'analyseur interroge un ordinateur central afin de déterminer le nombre de tests demandé. L'opérateur n'a pas besoin de programmer manuellement cette information dans l'appareil.
Indicateur d'échantillon	Avertit l'opérateur de problèmes quant à l'intégrité de l'échantillon.
Capteur de niveau des liquides	Avertit l'opérateur en cas de volume insuffisant de l'échantillon ou du réactif pour effectuer une analyse adéquate, ou si l'équipement n'a pas aspiré suffisamment de liquide de l'échantillon pour effectuer le test demandé.
Programmes intégrés de contrôle qualité	Le logiciel de l'instrument mémorise et organise les données du contrôle qualité. Il peut inclure l'application complète des règles de Westgaard pour indiquer les résultats hors limites.
Possibilité d'introduire des échantillons STAT	Permet à l'opérateur de mettre fin à la séquence des tests pour mettre un nouvel échantillon urgent (STAT) dans l'analyseur.
Capacité de réfrigération des échantillons chargés	Préserve l'intégrité des échantillons ou des réactifs ou des deux lors du processus de vérification.
Capacité de conservation des échantillons chargés	Indique la quantité de l'échantillon du patient qui peut être chargé à tout moment dans l'analyseur.
Capacité de test réflexe	Rend possible la programmation de l'équipement pour qu'il répète ou ajoute des essais selon des paramètres particuliers définis par l'opérateur.
Mémorisation des données du patient	Capacité de l'analyseur à stocker les résultats des tests qui peuvent être rappelés à tout moment. Peut stocker des courbes de formation de caillots.
Contrôle du volume de réactif	Avertit l'opérateur de l'insuffisance de réactif pour les tests programmés.
Traitement	Nombre de tests pouvant être traités au cours d'une période donnée (généralement classé en nombre de tests par heure).
Courbe de formation de caillots	Permet à l'opérateur de visualiser la formation d'un caillot dans la cuvette. Aide à détecter certaines conditions anormales ou des états morbides, ou l'origine des résultats anormaux d'un test raté ainsi que leur résolution.
Vérifications pré-analytiques	Détection de tubes sous-remplis, d'une hémolyse, d'un ictere, d'une lipémie ou d'un caillot.

La technologie est en plein essor et les demandes quotidiennes croissantes créent le besoin d'avoir des instruments de ce type dans un laboratoire. Ceux-ci représenteront un grand pas en avant dans le domaine de la biologie, étant donné la possibilité d'effectuer des tests de manière fiable, exacte et fidèle et d'obtenir des résultats dans un délai plus rapide et de meilleures conditions de contrôle. Les avantages de l'automatisation sont nombreux. La technologie progresse constamment pour se conformer aux nouveautés dans ce domaine et pour réduire les délais de traitement, ce qui permet aux tests d'être fiables, exacts et fidèles, tout en maintenant le degré de qualité.

**Réactifs :** en plus des réactifs spécifiques destinés à des dosages spécifiques, qui seront détaillés dans les parties correspondantes, certains réactifs sont largement utilisés dans le laboratoire d'hémostase (solution de chlorure de calcium, divers tampons, etc.). Ils peuvent être achetés auprès de fabricants de réactifs ou préparés en local à partir de réactifs en vrac ou de solutions concentrées.

**Solution de chlorure de calcium 25 mM** : par exemple, si une solution molaire est achetée, pour obtenir une solution 25 mM, diluer 25 ml de solution à 1 M à un litre dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée.

Tampons :

- Tampon barbiturique d'Owren pH 7,35

Peser 5,875 g de diéthylbarbiturate de sodium (barbitone sodium) et 7,335 g de chlorure de sodium.

Placer dans une fiole jaugée et dissoudre dans approximativement 780 ml d'eau distillée.

Ajouter 215 ml d'acide chlorhydrique 0,1 M.

Ajuster le volume à un litre avec de l'eau distillée.

Vérifier le pH et ajuster à 7,35, au besoin.

- Solution saline tamponnée d'Owren

200 ml de tampon barbiturique d'Owren (voir ci-dessus).

Ajouter 800 ml de solution saline normale (chlorure de sodium 0,9 %).

- Tampon glyoxaline (imidazole)

Peser 2,72 g de glyoxaline (imidazole) et 4,68 g de chlorure de sodium.

Placer dans une fiole jaugée et dissoudre dans approximativement 650 ml d'eau distillée.

Ajouter 148,8 ml d'HCl 0,1 M et ajuster le pH à 7,3.

Ajuster le volume à un litre avec de l'eau distillée, au besoin.

**Réactifs pour les tests de dépistage de la coagulation** : dans les premiers stades de l'investigation et du diagnostic des troubles de la coagulation, le choix et l'application de réactifs appropriés pour les tests de dépistage, surtout pour le temps de prothrombine (TP) et le temps de céphaline activée (TCA), sont d'une grande importance. Sont commercialisés dans le monde beaucoup de réactifs différents. Lorsqu'un large éventail est proposé, le choix effectué doit tenir compte des variations sur le plan de la sensibilité. Dans le dépistage des troubles de la coagulation par le TP et le TCA, les sources de renseignements suivantes, qui ont trait à la performance probable d'un réactif donné, peuvent être considérées :

- Données comparatives par rapport à d'autres réactifs provenant de programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ), comme le programme international d'EEQ
- Données publiées
- Tests locaux du plasma de patients ayant des anomalies connues
- Fiches techniques des fabricants

La production locale de réactifs de TP et de TCA peut sembler intéressante sur le plan financier, mais peut être source de problèmes de standardisation et doit donc être évitée. À noter que certains fabricants proposent plusieurs réactifs. De plus, la composition des réactifs portant le même nom peut être modifiée de temps à autre. Cela signifie qu'il est impossible de recommander une source en particulier.

## Références

- Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Robotic automation of coagulation analysis. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278: 269-279.
- Kitchen S, Olson JD, Preston FE (eds). Quality in laboratory hemostasis and thrombosis 2nd ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2013.
- Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Technological advances in the hemostasis laboratory. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 178-185.
- Qari MH. High throughput coagulation analyzers review. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005; 8: 353-360.
- Rodak BF (ed). Diagnostic hematology. Philadelphia: WB Saunders, 1995.
- Sasaki M, Kageoka T, Ogura K, Kataoka H, Ueta T, Sugihara S. Total laboratory automation in Japan: Past, present and the future. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278: 217-227.
- Walenga JM, Fareed J. Automation and quality control in the coagulation laboratory. *Clin Lab Med* 1994; 14: 709-728.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 229-236.