

### SUJETS ABORDÉS

- ✓ Prélèvement de sang
- ✓ Conservation
- ✓ Plasma pauvre en plaquettes (PPP)
- ✓ Décongélation
- ✓ Substances interférentes

Quelques facteurs doivent être pris en compte avant le prélèvement sanguin. Pour la plupart des examens hémorragiques et thrombotiques, il n'est pas nécessaire d'être à jeun avant le prélèvement sanguin, à l'exception cependant du dosage de l'homocystéine. L'activité physique (Venema *et al.*, 2017) et le stress (Austin *et al.*, 2012) peuvent provoquer des hausses transitoires du FVIII et du FW. L'activité physique peut également affecter le dosage des Ddimères (Huskens D *et al.*, 2016). Il est possible qu'une inflammation ait un effet sur les facteurs de coagulation et d'autres paramètres hémostatiques (Hardy *et al.*, 2024). La grossesse influe sur divers paramètres, notamment le FVIII (Castaman, 2013), le VWF (Delbrück *et al.*, 2019) et les Ddimères (Blombäck *et al.*, 2007). De nombreux produits pharmaceutiques et anticoagulants peuvent interférer avec les bilans d'hémostase. Par conséquent, les informations concernant les traitements des patients sont essentielles pour le laboratoire (Gosselin *et al.*, 2019).

**Prélèvement de sang** : plusieurs lignes directrices décrivent les bonnes pratiques de collecte et de traitement des échantillons pour les bilans d'hémostase (CLSI, 2024 ; CLSI, 2017). Le sang doit être prélevé dans un dispositif de prélèvement à vide ou une seringue en plastique de calibre 19 à 21 pour les adultes et de 22 ou 23 pour les enfants (Srivastava *et al.*, 2021). Les tubes ne sont pas tous du même type ; les centres ne doivent utiliser qu'un seul type et générer des intervalles de référence sur cette base (Bowen *et al.*, 2016). Même pour un type de tube, la composition est importante ; les tubes en plastique et en verre ne sont pas interchangeables (Fiebig *et al.*, 2005). Les tubes de prélèvement sanguin doivent contenir du citrate trisodique de 0,105 M à 0,109 M (3,2 %) (CLSI, 2024). La séquence de prélèvement est importante pour prévenir la contamination croisée par l'EDTA (Lima-Oliveira *et al.*, 2015) ou l'héparine (Keppel *et al.*, 2019) ; ainsi, les bonnes pratiques en matière de prélèvement d'échantillons doivent être suivies (OMS, 2010 ; Simundic *et al.*, 2018). Les échantillons nécessitent une anticoagulation immédiate après la ponction veineuse, avec un remplissage à au moins 80 % du volume cible (Kitchen *et al.*, 2021) pour atteindre un ratio sang:anticoagulant de 9:1. Les tubes doivent être retournés délicatement (trois à cinq fois) après la ponction pour une mélange approprié des échantillons. Des changements hémostatiques indésirables se produisent dans les tubes qui ne sont pas suffisamment remplis (Lippi *et al.*, 2012). Pour les échantillons présentant des taux d'hématocrite > 55 %, la solution de citrate doit être ajustée de manière à compenser ces taux et parvenir au ratio 9:1 adéquat. Des variations significatives du TP, du TCA et de l'INR peuvent être observées si ce ratio n'est pas préservé (Marlar *et al.*, 2006). La formule recommandée pour l'ajustement des taux de citrate est indiquée ci-après (Kitchen *et al.*, 2021). Les échantillons doivent être correctement étiquetés immédiatement avant ou après la ponction veineuse, conformément aux politiques réglementaires ou de l'établissement applicables.

$$C = (1,85 \times 10^{-3})(100 - HCT)(V)$$

C = volume de citrate en millilitres (ml) à ajouter à un volume de sang (V)

HCT = hématocrite du patient

V = volume de sang ajouté en ml

Et  $1,85 \times 10^{-3}$  est la constante

Exemple : un HCT à 70 % et 4,5 ml de sang prélevés avant ajout d'anticoagulant donnent le calcul suivant, à savoir 0,25 ml de citrate mélange à 4,5 ml de sang.

$$(1,85 \times 10^{-3})(100 - \text{HCT})(V) = C$$

$$(1,85 \times 0,001)(100 - 70)(4,5 \text{ ml}) = 0,25 \text{ ml de citrate}$$

**Plasma pauvre en plaquettes (PPP)** : la plupart des tests de coagulation peuvent être réalisés avec du PPP après centrifugation à  $> 1700 \text{ g}$  pendant 10 minutes (CLSI, 2024 ; Kitchen et al., 2021). Les centrifugeuses réfrigérées doivent être évitées, car l'activation par le froid du facteur plaquettaire 4 peut affecter la surveillance de l'héparine, ainsi que les tests de la fonction plaquettaire, du FVIII et du FW (Favaloro, 2004). Certains tests, tels que celui de l'héparine non fractionnée (HNF) et de l'anticoagulant de type lupique, nécessitent du plasma sans plaquettes obtenu après une double centrifugation ( $< 10 \times 10^9$ ) si le test est effectué sur des échantillons préalablement congelés. Dans ce cas, le plasma est retiré du tube de sang centrifugé, placé dans un deuxième récipient approprié et à nouveau centrifugé avec des sous-aliquotes retirées pour la congélation. Le test de la fonction plaquettaire nécessite un plasma riche en plaquettes (PRP), préparé après centrifugation à  $170 \text{ g}$  pendant 15 minutes ou  $250 \text{ g}$  pendant 10 minutes (Gomes et al., 2021).

**Substances interférentes** : les échantillons hémolysés ne doivent pas être analysés, car on pourrait observer des changements significatifs, du TCA en particulier (Woolley et al., 2016 ; Lippi et al., 2013), sauf lorsque l'hémolyse est intravasculaire (Arachchillage et al., 2014). Les analyses de routine ne sont généralement pas affectées par la jaunisse/ictère (Woolley et al., 2016) et il est possible de contourner la lipémie par ultracentrifugation (Lippi et al., 2013, Dimeski et Jones, 2011).

**Conservation** : l'analyse des échantillons est sensible au facteur temps. Le traitement et l'analyse doivent être effectués dans la fenêtre de stabilité suivant la ponction veineuse et les échantillons doivent être conservés à température ambiante dans l'intervalle. Les lignes directrices recommandent de procéder à l'analyse dans les quatre heures (CLSI, 2024) pour tous les échantillons, à moins que les données locales ne confirment une stabilité étendue pour une combinaison spécifique de tube/dosage (Kitchen et al., 2021 ; Linskens et al., 2018). Une conservation à température élevée peut entraîner une perte de facteurs de coagulation, le facteur VIII notamment (Omidkhoda et al., 2011). La libération du facteur plaquettaire 4 peut entraîner la neutralisation de l'héparine non fractionnée dans les échantillons. Par conséquent, ces tubes doivent être centrifugés dans l'heure et analysés dans les quatre heures (Baker et al., 2020). Si le plasma est stocké pour analyse ultérieure, les conditions de conservation peuvent affecter certains dosages. Il est acceptable de conserver le plasma à  $-24^\circ\text{C}$  pendant trois mois. Cependant, pour une conservation à plus long terme (six mois environ), les échantillons doivent être conservés à  $70^\circ\text{C}$  (Woodhams et al., 2001 ; Fenclova et al., 2023).

**Décongélation** : les échantillons congelés doivent être décongelés dans un bain-marie à  $37^\circ\text{C}$  pendant trois à cinq minutes et retournés à plusieurs reprises avant l'analyse de manière à homogénéiser l'échantillon (Jo et al., 2020). Il faut éviter de recongeler du plasma décongelé pour d'autres tests.

## Références

- Arachchillage DJ, Platton S, Hickey K, Chu J, Pickering M, Sommerville P, MacCallum P, Breen K. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2024; 205(3): 855-880.
- Austin AW, Wirtz PH, Patterson SM, Stutz M, von Känel R. Stress-induced alterations in coagulation: Assessment of a new hemoconcentration correction technique. *Psychosom Med* 2012; 74(3): 288-295.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Blombäck M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4): 855-858.
- Bowen RA, Adcock DM. Blood collection tubes as medical devices: The potential to affect assays and proposed verification and validation processes for the clinical laboratory. *Clin Biochem* 2016; 49(18): 1321-1330.
- Castaman G. Changes of von Willebrand factor during pregnancy in women with and without von Willebrand disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5(1): e2013052.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays, 6th edition. CLSI standard H21. 2024. [https://clsi.org/media/bp2jr13r/h21ed6e\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/bp2jr13r/h21ed6e_sample.pdf).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection of diagnostic venous blood specimens, 7th edition. CLSI standard GP41. 2017. [https://clsi.org/media/1372/gp41ed7\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1372/gp41ed7_sample.pdf).
- Delbrück C, Miesbach W. The course of von Willebrand factor and factor viii activity in patients with von Willebrand disease during pregnancy. *Acta Haematol* 2019; 142(2): 71-78.
- Dimeski G, Jones BW. Lipaemic samples: Effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21(1): 86-92.
- Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Potential laboratory misdiagnosis of hemophilia and von Willebrand disorder owing to cold activation of blood samples for testing. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(5): 686-692.
- Fenclova T, Marecek F, Hrachovinova I. Effects of frozen storage conditions and freezing rate on the stability of coagulation proteins in human plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2023; 34(6): 377-384.
- Fiebig EW, Etzell JE, Ng VL. Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. *Am J Clin Pathol* 2005; 124(6): 902-909.
- Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.
- Gosselin RC, Marlar RA. Preanalytical variables in coagulation testing: Setting the stage for accurate results. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(5): 433-448.
- Hardy M, Catry E, Pouplard M, Lecompte T, Mullier F. Is lupus anticoagulant testing with dilute Russell's viper venom clotting times reliable in the presence of inflammation? *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(6): 102536.
- Huskens D, Roest M, Remijn JA, Konings J, Kremers RM, Bloemen S, Schurgers E, Selmeczi A, Kelchtermans H, van Meel R, Meex SJ, Kleinegris MC, de Groot PG, Urbanus RT, Ninivaggi M, de Laat B. Strenuous exercise induces a hyper-reactive rebalanced haemostatic state that is more pronounced in men. *Thromb Haemost* 2016 Jun 2;115(6):1109-19.
- Keppel MH, Auer S, Lippi G, von Meyer A, Cornes M, Felder TK, Oberkofler H, Mrazek C, Haschke-Becher E, Cadamuro J. Heparin and citrate additive carryover during blood collection. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1888-1896.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICHS) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICHS) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

- Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Danese E, Favaloro EJ, Guidi GC, Lippi G. Sodium citrate blood contamination by K2-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): Impact on routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(3): 403-409.
- Linskens EA, Devreese KMJ. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(3): 292-303.
- Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: Focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(3): 258-266.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6): 565-575.
- Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(3): 400-405.
- Omidkhoda A, Tabatabaei MR, Atarodi K, Karimi K, Froushani AR, Pourfathollah AA. A comparative study of the effects of temperature, time and factor VIII assay type on factor VIII activity in cryoprecipitate in Iran. *Blood Transfus* 2011; 9(4): 394-399.
- Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC et al. Joint EFLM-COLABIOCLI recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(12): 2015-2038.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.
- Venema CL, Schutgens REG, Fischer K. Pathophysiological mechanisms of endogenous FVIII release following strenuous exercise in non-severe haemophilia: A review. *Thromb Haemost* 2017; 117(12): 2237-2242.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.
- Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 375-388.
- World Health Organisation. WHO guidelines on drawing blood: Best practices in phlebotomy. 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138650/>.