

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Quand utiliser la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Comment réaliser la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Temps de prothrombine selon la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Temps de céphaline activée selon la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Temps de thrombine et fibrinogène selon la technique d'inclinaison manuelle du tube
- ✓ Test de fibrinogène dérivé du TP

Le recours à des coagulomètres pour les tests de coagulation présente des avantages, notamment la rapidité, le rendement et l'uniformité de l'analyse, avec des résultats fidèles et exacts en temps opportun. Bien qu'il existe de nombreux instruments différents dans le monde, la technique d'inclinaison manuelle du tube reste valable pour déterminer le temps de coagulation. Elle peut être employée pour tous les échantillons si aucune méthode automatisée appropriée n'est à disposition, ou pour un sous-groupe d'échantillons, soit parce que l'analyse automatisée ne génère pas de résultats sur des échantillons présentant des caractéristiques spécifiques, ce qui entraîne une incompatibilité de l'échantillon avec l'instrument utilisé, soit parce que la méthode du coagulomètre est temporairement indisponible. Les méthodes d'inclinaison du tube conviennent en remplacement des méthodes reposant sur la formation d'un caillot et même les laboratoires des centres d'hémophilie bien équipés devraient disposer de la méthode d'inclinaison manuelle pour les très rares échantillons où l'analyse automatisée échoue, mais où les résultats sont absolument nécessaires pour la prise en charge sûre du patient. Cela peut être le cas en présence de concentrations lipidiques extrêmement élevées dans le plasma ou lorsque le schéma de formation de caillots dans l'échantillon diffère considérablement des échantillons normaux, en particulier lorsque la polymérisation du fibrinogène en fibrine est nettement anormale. En raison des nombreuses variables et des sources de contamination possibles associées aux techniques manuelles, celles-ci peuvent nécessiter de doubler les tests. Si le CV des résultats de CIQ est $> 5\%$ d'un jour à l'autre, il convient d'envisager des tests en double ; les deux résultats doivent alors se situer à $\pm 5\%$ de la moyenne.

Quand utiliser la technique d'inclinaison manuelle du tube : cette technique peut être utilisée pour la détermination du TP, du TCA, du temps de thrombine et du fibrinogène, ainsi que pour les dosages des facteurs de coagulation sur la base du TP et du TCA.

Comment réaliser la technique d'inclinaison manuelle du tube : la méthode a récemment été harmonisée par rapport à l'analyse du TP dans le cadre de l'étalonnage des thromboplastines de référence pour le système d'INR utilisé pour le suivi des médicaments antagonistes de la vitamine K (van den Besselaar et al., 2020). Cette méthode harmonisée a amélioré la concordance des résultats du TP selon la méthode d'inclinaison du tube lorsque les tests sont effectués par différents opérateurs et dans différents centres. Elle peut être employée pour les tests d'inclinaison du tube pour le TCA, le temps de thrombine et l'analyse du fibrinogène, en plus des tests du TP.

Matériel requis :

- 1) Un bainmarie pour maintenir les tubes à essai à une température constante de 37 °C. Les dimensions avoisinant 40 × 30 × 20 cm sont pratiques. Dans la mesure du possible, l'eau du

- bain doit être mise en circulation en continu par une pompe. La température doit être de 37 °C (limites de tolérance : 37 ± 0,5 °C). Elle doit être régulée à l'aide d'un thermomètre étalonné.
- 2) Une source de lumière (lampe articulée p. ex.) placée à 20 cm audessus du niveau de l'eau peut éclairer le tube à essai pendant l'inclinaison, ce qui facilite la détection du point final de la coagulation par l'opérateur. Il est préférable d'avoir recours à des LED plutôt qu'à des ampoules, qui génèrent de la chaleur, ce qui peut éléver la température des tubes à essai à proximité.
 - 3) Les tubes à essai doivent être en verre, non siliconés et non utilisés. Des tubes de culture jetables (référence catalogue 73500-1275, Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, New Jersey) de 75 × 12 mm dont la paroi a une épaisseur de 0,8 mm ont été utilisés dans le cadre des travaux visant à harmoniser les analyses du TP avec inclinaison des tubes (van den Besselaar et al., 2020), mais des tubes de 75 × 10 mm peuvent également convenir. Les tubes à essai doivent être en verre borosilicaté. Ils doivent être jetés après utilisation et ne doivent pas être lavés pour être réutilisés. Il est parfaitement possible d'utiliser des tubes en verre provenant de différentes sources, mais cela est susceptible d'influencer les temps de coagulation obtenus, en particulier dans les tests de dépistage tels que le TCA. Si la source (fabricant ou composition) des tubes est modifiée, il faut tenir compte de la possibilité d'une influence sur les résultats. Celle-ci pourrait être évaluée en comparant un petit nombre de tests avec les deux types de tubes. En présence de différences systématiques, une nouvelle plage normale doit être établie.

Technique :

- La température de la pièce dans laquelle l'équipement est installé et où la technique doit être effectuée doit être maintenue à 2022 °C.
- Avant de commencer les tests manuels de TP, TCA, temps de thrombine ou fibrinogène dans le bain-marie, vérifier et consigner la température.
- Les tubes à essai vides doivent être maintenus en position verticale sur un portoir, dans le bain-marie à 37 °C, pendant au moins quatre minutes à une profondeur de 3,5 cm, et ce avant l'ajout de réactifs et de plasma.

Temps de prothrombine selon la technique d'inclinaison manuelle du tube :

- Pour le TP, ajouter 200 µl du réactif thromboplastine/calcium et incuber pendant deux minutes.
- Pipeter ensuite 100 µl de plasma non préchauffé, en le distribuant depuis une hauteur de 1 cm audessus du niveau de thromboplastine, l'embout reposant contre la paroi du tube, et démarrer immédiatement le chronomètre avec l'autre main.
- Agiter doucement le tube pour mélanger le contenu, en immergeant le tube dans l'eau.
- Placer le tube sur le portoir dans le bain-marie.
- Poser la pipette.
- Maintenir manuellement le tube dans l'eau, de manière à immerger les 5 cm inférieurs du tube (figure 1).
- Commencer l'inclinaison manuelle du tube sept secondes après le démarrage du chronomètre.
- Incliner le tube à près de 90°, le sortir de l'eau pendant deux secondes et l'y remettre pendant une seconde (figure 1). À noter qu'une inclinaison à 90° ou plus entraîne généralement le déversement du mélange réactionnel hors du tube.
- Le tube ne doit pas rester immobile pendant ce cycle ; il doit être incliné en continu, la main de l'opérateur étant posée à côté du bain-marie.
- Répéter ce cycle jusqu'à ce que le caillot se forme.
- En position horizontale, le tube est maintenu à 10 cm maximum et 2 cm minimum au-dessus du niveau de l'eau (figure 1).
- Avant que le mélange ne coagule, l'opérateur observe le mélange s'écouler du bas aux trois quarts de la longueur du tube en position presque horizontale et retourner vers le bas.
- Lorsque la coagulation commence, la vitesse d'écoulement est réduite.
- Lorsque l'écoulement s'arrête, l'opérateur stoppe le chronomètre et consigne le temps de coagulation en secondes à une décimale près.

L'opérateur qui procède à l'inclinaison manuelle du tube sort régulièrement le tube de l'eau ; cela entraînera une chute de température du mélange réactionnel. L'immersion entraînera en revanche une hausse de température. La chute de température moyenne observée dans la technique d'inclinaison manuelle décrite ci-dessus est limitée à 0,4 °C (van den Besselaar et al., 2020).

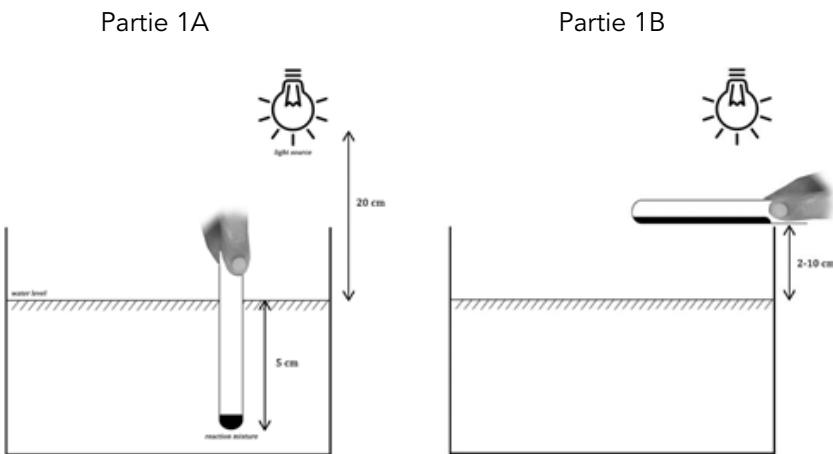


Figure 1. Représentation schématique de la technique d'inclinaison manuelle du tube. Partie 1A : le tube à essai est en position verticale dans le bainmarie. Partie 1B : le tube à essai est en position horizontale hors du bainmarie. La main de l'opérateur repose sur le bord du bainmarie. En raison de la taille variable des mains des opérateurs, la distance entre le tube en position horizontale et la surface de l'eau varie de 2 à 10 cm. L'image n'est pas à l'échelle. (Avec l'aimable autorisation d'Elsevier Publishing, Amsterdam, PaysBas, reproduction de : van den Besselaar et al. J Thromb Haemost. 2020 ; 18 : 1986-1994.)

La méthode harmonisée ci-dessus a été développée au cours de deux ateliers de manipulation de liquides évaluant les tests du TP réalisés par un maximum de sept opérateurs provenant de trois centres, où un certain nombre de variables ont été identifiées dans la technique (van den Besselaar et al., 2020). Les ateliers ont en effet confirmé que les temps de coagulation étaient plus longs lorsque le composant final du mélange réactionnel était déposé tout en haut du tube plutôt que près de la surface du mélange réactionnel plus bas dans le tube. Avec la méthode harmonisée décrite, le CV inter-opérateurs sur les mêmes plasmas à tester était de 3 % pour un TP normal et de 1,4 % pour un TP allongé.

Temps de céphaline activée selon la technique d'inclinaison manuelle du tube :

- Ajouter 100 µl de réactif pour la détermination du TCA dans le tube et incuber pendant deux minutes.
- Pipeter ensuite 100 µl de plasma non préchauffé, en le distribuant depuis une hauteur de 1 cm au-dessus du niveau du réactif, l'embout reposant contre la paroi du tube à essai, et démarrer immédiatement un chronomètre avec l'autre main.
- Agiter doucement le tube pour mélanger le contenu, en immergeant le tube dans l'eau.
- Placer le tube sur le portoir dans le bain-marie.
- Après le temps d'activation recommandé par le fabricant du réactif de TCA (généralement trois minutes, mais ce peut être cinq minutes pour d'autres), ajouter 100 µl de chlorure de calcium préchauffé à 37 °C dans un tube séparé dans le bainmarie. Le distribuer depuis une hauteur de 1 cm au-dessus du niveau du mélange réactionnel, l'embout reposant contre la paroi du tube à essai, et démarrer immédiatement un nouveau chronomètre avec l'autre main.
- Agiter doucement le tube pour mélanger le contenu, en immergeant le tube dans l'eau.
- Placer le tube sur le portoir dans le bainmarie.
- Poser la pipette.
- Maintenir manuellement le tube dans l'eau, de manière à immerger les 5 cm inférieurs du tube (figure 1).

- Commencer l'inclinaison manuelle du tube 15 secondes après le démarrage du chronomètre.
- Incliner le tube à près de 90°, le sortir de l'eau pendant deux secondes et l'y remettre pendant une seconde (figure 1). À noter qu'une inclinaison à 90° ou plus entraîne généralement le déversement du mélange réactionnel hors du tube.
- Le tube ne doit pas rester immobile pendant ce cycle ; il doit être incliné en continu, la main de l'opérateur étant posée à côté du bainmarie.
- Répéter ce cycle jusqu'à ce que le caillot se forme.
- En position horizontale, le tube est maintenu à 10 cm maximum et 2 cm minimum audessus du niveau de l'eau (figure 1).
- Avant que le mélange ne coagule, l'opérateur observe le mélange s'écouler du bas aux trois quarts de la longueur du tube en position presque horizontale et retourner vers le bas.
- Lorsque la coagulation commence, la vitesse d'écoulement est réduite.
- Lorsque l'écoulement s'arrête, l'opérateur stoppe le chronomètre et consigne le temps de coagulation en secondes à une décimale près.

Temps de thrombine et fibrinogène selon la technique d'inclinaison manuelle du tube : les méthodes d'inclinaison manuelle doivent utiliser les proportions de réactifs et de plasma ou les dilutions de plasma recommandées par le fabricant du réactif et suivre les principes des méthodes décrites pour le TP/TCA ci-dessus.

Échantillons avec lipidémie : nombre des coagulomètres actuellement utilisés qui font appel à une détection photo-optique du point final supportent très bien des taux de lipides élevés dans les échantillons. Cependant, ce taux peut parfois être tellement élevé que l'analyseur ne parvient pas à détecter la formation d'un caillot. Ces échantillons peuvent être analysés manuellement et produisent généralement un caillot solide observable visuellement pour le TP, le TCA et le temps de thrombine. Il peut être difficile d'observer la formation d'un caillot lors du dosage de l'activité du fibrinogène de Clauss de ces échantillons. Dans ce cas, une autre option consiste à soumettre les échantillons à une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à température ambiante, si disponible (lignes directrices de l'ICSH ; Kitchen et al., 2021). Après cette ultracentrifugation, les lipides sédimentent et l'échantillon peut être analysé sur un coagulomètre automatisé (si disponible) ou selon la technique d'inclinaison manuelle du tube pour le TP, le TCA, le temps de thrombine ou le fibrinogène.

Échantillons présentant des anomalies du fibrinogène : la formation de caillots peut être perturbée en présence de certaines anomalies du fibrinogène. Par exemple, le fibrinogène Longmont est associé à un faible caillot translucide lors du dosage du fibrinogène de Clauss. Les systèmes photo-optiques qui surveillent la lumière diffusée à mesure que le caillot se forme (par opposition à la surveillance de la lumière transmise) pourraient ne pas détecter le point final. Il est possible d'analyser ces échantillons selon la méthode de l'inclinaison du tube, mais l'opérateur doit avoir conscience que la formation de caillots peut être difficile à discerner visuellement. Pour certains échantillons de dysfibrinogénémie dont l'analyse automatisée échoue, la technique manuelle doit être effectuée en examinant très attentivement le processus de coagulation, car les caillots peuvent être fragiles et facilement perturbés par un mélange/inclinaison supplémentaire après la formation du caillot initial.

Contrôle qualité : l'utilisation d'un matériau de contrôle qualité, tel que décrit par ailleurs dans ce manuel pour le TP, le TCA, le temps de thrombine et le fibrinogène, convient aux méthodes manuelles. Il est acceptable de tester un seul niveau de CIQ lorsque la technique manuelle est réservée aux échantillons occasionnels dont l'analyse automatisée échoue. Deux niveaux doivent être disponibles et testés selon les critères décrits par ailleurs dans ce manuel lorsque la technique manuelle est la principale procédure analytique du laboratoire.

La plage des résultats de CIQ obtenus par un petit groupe d'opérateurs différents ayant l'expérience de la technique d'inclinaison manuelle devrait être la suivante :

Moyenne \pm 1 seconde pour un CQ avec un TP moyen compris entre 10 et 12 secondes

Moyenne \pm 2,5 secondes pour un CQ avec un TCA moyen compris entre 25 et 30 secondes

Moyenne \pm 2,5 secondes pour un CQ avec un temps de thrombine moyen compris entre 12 et 20 secondes

Moyenne \pm 0,5 g/l pour un CQ avec un fibrinogène moyen de 2,5 à 3 g/l

Plages normales : les résultats des tests manuels sont d'ordinaire différents de ceux générés par les coagulomètres. En règle générale, les temps de coagulation pour le TP et le TCA sont plus courts sur les analyseurs photo-optiques que lors d'analyses manuelles. Le degré de différence n'est pas uniforme entre les différents analyseurs qui peuvent faire appel à de la lumière transmise ou diffusée. Les analyseurs surveillent l'évolution dans le temps de la diffusion/transmission de la lumière après le démarrage de la coagulation et consignent le temps de coagulation comme le temps nécessaire pour dépasser un seuil de changement particulier. Ce seuil peut osciller de 3 à 50 % par rapport à la valeur de référence. Plus la variation en pourcentage utilisée dans l'analyse de la courbe de coagulation est faible, plus le temps de coagulation rapporté est court. Cela signifie que les résultats des tests manuels ne doivent pas être communiqués en regard d'une plage de référence établie pour une technique automatisée, même lorsque les mêmes réactifs sont utilisés. Il y a deux manières d'aborder cette problématique. L'une consiste à établir une plage de référence pour la technique manuelle à l'aide du processus décrit par ailleurs dans le présent manuel, ce qui est nécessaire si tous les tests sont réalisés au moyen de techniques manuelles. Le plus souvent, les tests manuels se limitent à un petit sousgroupe d'échantillons pour lesquels l'analyse automatisée a échoué. Dans ce cas, la plupart des résultats seront communiqués par le laboratoire avec la plage de référence automatisée correspondante. Des résultats de TP ou de TCA occasionnels publiés avec une plage de référence différente ne sont d'aucune utilité pour les usagers. Dans ces circonstances, le laboratoire peut adopter une approche pragmatique et utiliser un tableau de conversion tel que décrit ci-dessous ; la technique d'analyse est manuelle, mais le résultat est converti en un résultat qui aurait été obtenu si l'échantillon avait été analysé par une méthode automatisée.

Conversion des résultats manuels de temps de prothrombine, temps de céphaline activée et temps de thrombine en équivalents automatisés : une série de 20 à 30 échantillons couvrant une gamme de résultats normaux et anormaux doit être analysée à l'aide de méthodes à la fois manuelles et automatisées. Il convient de procéder à une analyse de régression pour établir la relation entre les résultats obtenus selon les deux méthodes. La corrélation entre les résultats doit être significative, avec un coefficient de corrélation $> 0,8$. Si tel est le cas, la relation de régression peut ensuite servir à créer un tableau qui présente le résultat manuel et le résultat équivalent qui aurait été obtenu sur le système automatisé. Ainsi, le résultat manuel est converti en résultat automatisé, qui est ensuite communiqué en regard de la plage de référence de la méthode automatisée habituelle. Cela signifie que les usagers ne verront qu'une seule plage de référence pour le TP, le TCA ou le temps de thrombine. C'est un point important, car ces plages de référence sont susceptibles d'être intégrées dans les protocoles cliniques pour la prise en charge des patients. Le tableau 5 présente les résultats manuels et automatisés obtenus en analysant les mêmes 21 échantillons à l'aide des deux méthodes.

Tableau 5. TCA manuels et automatisés sur les mêmes échantillons

N° de l'échantillon	TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)	N° de l'échantillon	TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)
1	31,7	27,0	12	31,7	30,1
2	51,1	46,9	13	31,9	28,9
3	27,2	26,5	14	36,2	33,2
4	42,2	39,4	15	33,1	28,5
5	34,5	30,4	16	40,0	36,4
6	44,2	43,2	17	37,1	30,7
7	33,0	30,5	18	29,2	25,6
8	31,9	30,0	19	35,2	28,1
9	22,2	19,6	20	37,1	34,7
10	34,0	27,8	21	36,5	31,4
11	32,5	31,3			

La relation de régression linéaire entre les deux jeux de données est calculée à l'aide d'un ensemble de statistiques. Dans cet exemple, le coefficient de corrélation (r) est de 0,96 et la relation de régression est calculée comme suit :

$$y = 0,9551x - 1,887$$

où

y est le TCA automatisé

x est le TCA manuel

0,9551 est la pente de la droite de régression linéaire

-1,887 est l'ordonnée à l'origine.

Cette équation est utilisée pour dériver le TCA automatisé du TCA déterminé manuellement de tout échantillon. Il est pratique de préparer un tableau reliant le TCA manuel au résultat équivalent automatisé. Le tableau 6 a été établi à l'aide de l'équation de régression cidessus.

Tableau 6. Tableau de conversion : TCA manuel en TCA équivalent automatisé

TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)	TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)	TCA manuel (s)	TCA automatisé (s)
19	16,3	40	36,3	61	56,4
20	17,2	41	37,3	62	57,3
21	18,2	42	38,2	63	58,3
22	19,1	43	39,2	64	29,2
23	20,1	44	40,1	65	60,2
24	21,0	45	41,1	66	61,2
25	22,0	46	42,0	67	52,1
26	22,9	47	43,0	68	63,1
27	23,9	48	44,0	69	64,0
28	24,9	49	44,9	70	65,0
29	25,8	50	45,9	71	65,9
30	26,8	51	46,8	72	66,9
31	27,8	52	47,8	73	67,8
32	28,7	53	48,7	74	68,8
33	29,6	54	49,7	75	69,8
34	30,6	55	50,7	76	70,7
35	31,5	56	51,6	77	81,7
36	32,5	57	52,6	78	82,6
37	33,4	58	53,5	79	73,6
38	34,4	59	54,5	80	74,5
39	35,4	60	55,4		

Dosage manuel du fibrinogène par la méthode de Clauss : les réactifs et les méthodes utilisés ici sont les mêmes que pour la version automatisée (à savoir les mêmes tampon, thrombine et dilution de l'échantillon à tester). Le temps de coagulation des tests manuels est converti en concentration de fibrinogène à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Celleci doit être construite à l'aide du même étalon et des mêmes dilutions de l'étalon que ceux qui seraient utilisés pour l'analyse automatisée ; voir la section Fibrinogène (dosage de Clauss modifié) plus loin dans le présent manuel. Cependant, les temps de coagulation de chaque dilution de l'étalon utilisée pour construire la courbe d'étalonnage sont déterminés manuellement. Les résultats sont ainsi convertis en concentration de fibrinogène et le résultat est rapporté au même format que la version automatisée (g/l ou mg/dl) à l'aide de la même plage de référence que pour la méthode de Clauss automatisée dans le même centre.

Références

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

van den Besselaar A, van Rijn CJJ, Abdoel CF, Chantarangkul V, Scalambino E, Kitchen S, Tripodi A, Woolley AM, Padovan L, Cobbaert CM. Paving the way for establishing a reference measurement system for standardization of plasma prothrombin time: Harmonizing the manual tilt tube method. *J Thromb Haemost* 2020; 18(8): 1986-1994.