

# EFFET DE L'ANTICOAGULANT ET DE LA CONSERVATION DES ECHANTILLONS SANGUINS SUR LES TESTS D'EXPLORATION DE LA COAGULATION

## EFFECT OF ANTICOAGULANT AND STORAGE OF BLOOD SAMPLES FROM CLOTTING EXPLORATION TESTS

N. LOUATI<sup>1,2\*</sup>, I. BEN AMOR<sup>1,2</sup>, G. DAOUED<sup>1,2</sup>, et J.GARGOURI<sup>1,2</sup>

1 : CRTS de Sfax -Tunisie

2 : Faculté de médecine, université de Sfax-Tunisie

\*Email de l'auteur correspondant : nourlouati@yahoo.fr

### Résumé

La fiabilité des tests de l'hémostase est fortement dépendante du respect des conditions pré-analytiques. Nous avons évalué, sur 10 plasmas, l'impact de la concentration (3,2 % et 3,8 %) et de la proportion du citrate de sodium trisodique (3 rapports volume anticoagulant/sang : 1V/9V, 1V/8V et 1V/10V) ainsi que des conditions de conservation du prélèvement (délais et températures) sur les tests de la coagulation [taux de prothrombine (TP), temps de céphaline + activateur (TCA), dosage du fibrinogène (Fg), facteur V (FV) et facteur VIII coagulant (FVIIIc)]. **Résultats** : influence variable des différentes conditions pré-analytiques sur les tests de coagulation. Le citrate à 0,129 M donne des activités basses du FV. Les valeurs moyennes des TP, TCA, Fg, FV et FVIIIc ont été plus abaissées après conservation des plasmas pendant 28 jours à -20°C que celles obtenues après conservation pendant 28 jours à -70°C. Le choix de la concentration 3,2 % du citrate est préférable en termes de fiabilité des résultats. La conservation des plasmas à -70 °C assure une meilleure stabilité de l'activité des facteurs de la coagulation. Une étude sur une population plus large, plus diversifiée et incluant d'autres tests de l'hémostase permettra de consolider ces résultats et tester d'autres variables pré-analytiques.

**Mots clés** : anticoagulant ; conservation ; hémostase ; variables pré-analytiques.

### Abstract

The reliability of hemostasis testing is highly dependent on respect to pre-analytical variables. We evaluated, on 10 plasmas, the effect of sodium citrate concentration (3,2 % and 3,8 %) and proportion (3 ratios of anticoagulant to blood : 1V/9V, 1V/8V and 1V/10V) as well as sample storage conditions (time and temperatures) on the results of coagulation testing [prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), fibrinogen (Fg) concentration, factor V (FV) and VIII coagulant (FVIIIc) activities]. Results: variable influence of the different pre-analytical conditions on coagulation testing. 0,129 M citrate produced low activities of FV. The average values of PT, aPTT, Fg, FV and FVIIIc were lowered after the storage of plasmas for 28 days at -20°C than those obtained after storage for 28 days at -70°C. The choice of 3.2% citrate concentration is preferable in terms of results's reliability. . Plasmas specimens kept at -70 °C had better stability of the activity of factors of coagulation. A study on a larger and more diversified population and including other hemostasis testing is required to consolidate these results and to test other preanalytical variables

**Key words**: anticoagulant; haemostasis; pre-analytical variables; storage.

### ملخص

موثوقية اختبار الارقاء تعتمد اعتمادا كبيرا على الامتثال لشروط ما قبل التحليل. قمنا بتقييم على 10 عينات بلازما لدراسة تأثير تركيز (3.2%/ و 3.8%) ونسبة سترات ثلاثي الصوديوم (3 إمكانيات حجم مضادة للتخثر / الدم: 1 من 8 و 1 من 9 و 1 من 10)، وكذلك ظروف تخزين العينة (الوقت ودرجة الحرارة) في اختبارات التخثر العامة و فحص الفيبرينوجين و العامل الخامس و الثامن للتخثر. النتائج: تأثير متغير لمختلف الأوضاع ما قبل التحليل في اختبارات التخثر. وسترات 0.129 يعطي انخفاض النشاط للعامل الخامس للتخثر. تم تخفيض متوسط قيم اختبارات التخثر أكثر بعد التخزين لمدة 28 يوما في البلازما عند درجة حرارة 20 درجة مئوية من تلك التي تم الحصول عليها بعد التخزين لمدة 28 يوما في 70 درجة مئوية. اختيار تركيز 3.2% سترات هو الأفضل من حيث الموثوقية. دراسة على عدد أكبر من الأشخاص وأكثر تنوعا تشمل اختبارات إرقاء أخرى تمكن من ترسيخ هذه النتائج واختبار متغيرات أخرى ما قبل التحليل.

**الكلمات المفتاحية:** تخثر ; تخزين العينة ; متغيرات ما قبل التحليل.

## 1. INTRODUCTION

La coagulation plasmatique a pour but la formation d'un thrombus solide qui vient renforcer le clou plaquettaire fragile afin d'arrêter l'hémorragie. L'exploration de la coagulation se fait in vitro par plusieurs méthodes destinées à l'étude, soit d'une phase de la coagulation, soit d'un facteur particulier. Les résultats de ces tests doivent refléter de façon fiable les valeurs in vivo. La fiabilité des résultats obtenus est fortement dépendante du respect des conditions pré-analytiques. Le non-respect ou la négligence de ces dernières serait à l'origine, d'une part, de coûts supplémentaires (en personnel, matériel, temps et énergie) en cas d'échantillon défectueux obligeant à refaire le prélèvement, et, d'autre part, de résultats inadéquats pouvant amener à des examens complémentaires inutiles et même à des conduites thérapeutiques erronées [1].

Les composantes de l'étape pré-analytique sont nombreuses. Il s'agit, notamment, du prélèvement sanguin (anticoagulant utilisé, amorce de coagulation, contamination...), de sa conservation (température, durée...), de son transport et de sa préparation avant son analyse technique (centrifugation, congélation /décongélation éventuelle). En 2007, le GEHT (Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose) a actualisé ses recommandations en précisant notamment que l'anticoagulant de référence est le citrate de sodium trisodique à 3,2% soit 0,109 M avec un rapport anticoagulant / sang de 1 pour 9 (1V/9V). Il recommande également un délai inférieur à 2 heures entre le prélèvement et l'exécution des tests d'hémostase [2].

Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'évaluer l'impact de la concentration et de la proportion du citrate de sodium trisodique ainsi que des conditions de conservation du prélèvement sur les résultats des tests de la coagulation [taux de prothrombine (TP), temps de céphaline avec activateur (TCA), dosage du fibrinogène (Fg), facteur V(FV) et facteur VIII coagulant (FVIIIc)].

## 2. MATERIEL ET METHODES

Notre étude a porté sur 10 donneurs de sang (DDS) volontaires sains âgés de 20 à 25 ans et n'ayant pas, à l'interrogatoire pré-don, d'antécédents personnels ou familiaux de troubles de l'hémostase.

### 2.1. Prélèvements sanguins et traitement des échantillons

Pour chaque DDS, nous avons effectué un prélèvement de sang veineux périphérique sur 4 tubes :

1. un tube avec citrate de sodium 0,109 M (3,2%) à raison de 1V/9V.
2. un tube avec citrate de sodium 0,129 M (3,8%) à raison de 1V/9V.
3. un tube avec citrate de sodium 0,109 M (3,2%) à raison de 1V/8V.
4. un tube avec citrate de sodium 0,109 M (3,2%) à raison de 1 V/10V.

Tous les autres aspects de la phase pré-analytique ont respecté les recommandations du GEHT. Les tubes ont été centrifugés immédiatement après le prélèvement à la vitesse de 3000 tours/mn pendant 15 minutes pour obtenir le plasma pauvre en plaquettes (PPP). Les tests de coagulation ont été réalisés immédiatement pour tous les échantillons plasmatiques. De plus, chaque PPP prélevé sur citrate de sodium 0,109M à raison de 1V/9Va été décanté dans 2 tubes :

-le premier a été conservé à température ambiante puis testé après des délais de 6 heures, 12 heures et 24 heures après le prélèvement.

-le deuxième a été recentrifugé (3000 tours/mn pendant 15 minutes) puis décanté dans des aliquots conservés dans différentes conditions :

- congélation à -20°C puis réalisation des tests après des délais différents (J7, J14, J21, J28).
- congélation à -70°C pendant 28 jours.

### 2.2. Tests de coagulation

Nous avons mesuré le TP (en %), le TCA (en secondes), les taux du Fg et des FV et VIIIc de la coagulation par des techniques chronométriques au moyen du semi-automate ST-Art4 (DIAGNOSTICA STAGO). Les mesures du TP, du TCA et du taux de Fg ont été effectuées en utilisant, respectivement, les réactifs NEOPLASTINE® CI PLUS, CK-PREST®, et FIBRIPREST® (DIAGNOSTICA STAGO). Les facteurs V et VIII ont été dosés au moyen des réactifs STA®-DEFICIENT V et STA®-DEFICIENT VIII (DIAGNOSTICA STAGO) respectivement. Le principe du dosage consiste à mesurer, en présence de néoplastine pour le FV et

de céphaline et activateur pour le FVIIIc, le temps de coagulation d'un système où tous les facteurs sont présents et en excès à l'exception du facteur à doser qui est apporté par le plasma testé dilué au 1/10 en tampon OwrenKoller. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'activité par rapport à un plasma contrôle (UNICALIBRATEUR®) d'après une droite d'étalonnage.

Chaque échantillon a été testé en double au cours de la même réaction selon les recommandations du fabricant. Le taux considéré correspondait à la moyenne des 2 mesures.

### 2.3. Etude Statistique

Nous avons utilisé le test *t* de Student pour la comparaison des moyennes d'une variable quantitative. Le seuil de signification a été fixé à 0,05.

## 3. RÉSULTATS

Les résultats des tests de coagulation effectués chez les DDS, en fonction des divers supports de prélèvement et des différentes conditions de conservation sont résumés dans les tableaux I à V.

### 3.1. Résultats des tests d'hémostase en fonction de la concentration du citrate

Nous n'avons pas trouvé de différence significative des résultats du TP, TCA, Fg et FVIIIc entre les deux concentrations de citrate utilisées. Par contre, le taux du FV a été significativement plus bas avec le citrate 0,129M (Tableau N°I).

### 3.2. Résultats des tests d'hémostase en fonction des différents rapports volume anticoagulant /sang (1V/9V,1V/8Vet 1V/10V) :

La comparaison des résultats obtenus avec les rapports 1V/8V et 1V/10V a été faite par rapport au rapport 1V/9V du citrate 0,109M. Elle n'a pas montré de différence statistiquement significative pour l'ensemble des tests sauf pour les valeurs du TCA qui ont été significativement plus abaissées avec le rapport 1V/10V (Tableau N°II).

### 3.3. Résultats en fonction du délai de réalisation par rapport au prélèvement (immédiat, 6heures, 12heures et 24 heures) :

La comparaison des résultats obtenus après les différents délais de réalisation a été faite par rapport au temps immédiat (Tableau N°III). En gardant les plasmas à température ambiante pendant 24 heures, nous avons objectivé une baisse significative du TP et du FVIIIc au fil du temps

(de l'immédiat à 24 heures), un allongement significatif du TCA au bout de 24 heures de conservation et une absence de modification significative des taux du FV et du Fg.

### 3.4. Résultats des tests d'hémostase après conservation des plasmas à -20°C et à différents délais d'exécution

Après congélation des plasmas à -20°C, les taux du Fg ont été stables au cours du temps. Les valeurs du TP et du FV ont été significativement plus abaissées à J14 et J28 par rapport à l'immédiat alors que celles du FVIIIc ont été plus abaissées à J7 et J14 qu'aux J21 et J28. Il n'y avait pas d'allongement du TCA (Tableau N° IV).

### 3.5. Résultats des tests d'hémostase en fonction de la température de congélation des plasmas (Tableau N°V)

A durée égale de conservation (28 jours), les taux de FV, FVIIIc et du Fg n'ont pas été influencés par la température de conservation (-20 °C ou -70°C). Nous avons par contre constaté une baisse plus importante du TP des plasmas conservés à -20°C par rapport à ceux conservés à -70°C. De surcroît, la moyenne des TP des plasmas conservés à -20°C a été inférieure à la limite inférieure de la normale, soit 70 %.

Pour le FVIIIc, son activité a subi une baisse importante après conservation à -20°C alors qu'elle n'a pas été modifiée après congélation à -70°C pendant 28 j.

## 4. DISCUSSION

Notre étude a démontré la variation des résultats des tests de l'hémostase, aussi bien des tests globaux que des dosages spécifiques (FV et FVIIIc), en fonction de la concentration du citrate trisodique et de la température de conservation entre le prélèvement et la réalisation de l'analyse. L'effet sur les résultats est variable, certains tests étant plus sensibles que d'autres à ces variables pré-analytiques.

### 4.1. Influence de la concentration de l'anticoagulant sur les tests d'hémostase

Le citrate, anticoagulant de référence pour l'hémostase, existe sous différentes concentrations dont la plus recommandée est de 105 - 109 M (3,2 %) [3]. La concentration de citrate à 129 M (3,8 %) est également disponible dans le commerce et est considérée comme acceptable par l'Institut des Standards Cliniques et des Laboratoires (the Clinical Laboratory Standards Institute CLSI)

malgré des inconvénients non négligeables incluant un allongement du temps de Quick (TQ) et du TCA [4] et des discordances dans les valeurs de l'INR (International Normalized Ratio) [5]. En effet, selon les données de la littérature, le citrate 0,129M donne des TQ plus allongés que le citrate 0,109 M et ceci chez des patients sans et sous traitement anticoagulant oral [6]. Mais, cet allongement est plus marqué chez les patients sous traitement anticoagulant oral pouvant ainsi majorer l'INR d'environ 10 % [4, 6, 7]. Cette différence est expliquée par le fait que les ISI (International Sensitivity Index) des thromboplastines utilisés pour calculer l'INR soient déterminés à partir d'échantillons sanguins prélevés sur citrate 3,2 % selon les recommandations de l'OMS et, par conséquent, ne sont pas valides pour les échantillons collectés sur citrate 3,8 % (3) [6,8,9, 10, 11].

Actuellement, le GEHT et les recommandations américaines sont en faveur de l'utilisation de la concentration la plus faible (3,2%) pour laquelle, en plus, l'influence de l'hématocrite serait moindre [12,13,14]. Dans notre étude, il n'existait pas de différence statistiquement significative entre les résultats des TP, TCA, Fg et FVIIIc obtenus avec les deux concentrations de citrate. Pour ce qui est du taux du FV, nous avons obtenu des valeurs significativement plus abaissées (écart de 12,5%) avec la concentration 0,129M. Le risque serait donc de diagnostiquer, par méconnaissance de l'effet du citrate 0,129 M, un déficit en FV.

#### **4.2. Influence du rapport volume (anticoagulant/sang) sur les tests d'hémostase**

Il est impératif de respecter strictement le rapport anticoagulant sur sang total qui doit être de 1 pour 9. En effet, on peut obtenir un allongement artificiel des temps de coagulation soit par excès, soit par insuffisance de calcium. Bien que le rapport anticoagulant sur sang total recommandé soit de 1 pour 9 [1,2,15], nous n'avons pas démontré dans notre étude des différences significatives avec les 2 autres rapports testés (soit 1/8 et 1/10) pour les TP, Fg, FV et FVIIIc. Pour le TCA, bien que la différence entre les valeurs trouvées avec le ratio 1V/10V par rapport à 1V/9V ait été significative, il n'y avait aucune conséquence pratique sur la décision clinique. Cette sensibilité du TCA aux conditions de remplissage par rapport aux autres tests d'hémostase a, également, été signalée par le

GEHT qui a démontré que le TCA est plus sensible que le TP à un mauvais remplissage du tube [2]. De même, l'étude de Adcock et al [16] confirme cette hypothèse en comparant à la fois l'influence du niveau de remplissage du tube d'hémostase (60%,70% et 100%) et de la concentration de citrate (3,2% vs 3,8%) sur les résultats des TCA et TP.

En outre, ce rapport est tributaire non seulement du bon remplissage du tube mais aussi de l'hématocrite (Ht) du patient. Les variations trop importantes de l'Ht (polyglobulies, anémies) constitue une cause d'erreur certaine du fait de la répartition de l'anticoagulant entre volume plasmatique et volume globulaire. En effet, un Ht élevé s'accompagne d'un rapport anticoagulant/volume de plasma plus élevé et inversement. En pratique, il convient d'ajuster la quantité de citrate pour les Ht supérieurs à 55% ou inférieurs à 20% voire 30%. Divers formules et abaques permettent de déterminer le volume nécessaire d'anticoagulant (McGann, Ingram, Koepke) [8,12,17].

#### **4.3. Influence du délai de réalisation après prélèvement sur les tests d'hémostase**

Le délai dans lequel les tests de coagulation doivent être pratiqués après le prélèvement ainsi que la température de conservation, pendant ce délai, constituent des variables pré-analytiques cruciales [18]. Il est parfaitement admis que les tubes d'hémostase doivent être maintenus à température ambiante et acheminés le plus rapidement possible au laboratoire et traités dans les plus brefs délais. D'ailleurs, compte tenu des contraintes de délai des examens d'hémostase, il est préférable de noter l'heure du prélèvement sur le tube ou sur la feuille de demande de l'examen. Toutefois, il est important de noter que les tests d'hémostase n'ont pas la même sensibilité à ces variables pré-analytiques. En effet, si certains tests comme le TP, le dosage des facteurs du complexe prothrombinique et du Fg apparaissent comme robustes, d'autres sont beaucoup plus sensibles (recherche de lupus anticoagulant, dosage du facteur Willebrand, marqueurs d'activation de l'hémostase, surveillance de traitement héparinique [8,15].

Pour la mesure du TP et du TCA, le délai de réalisation ne doit pas excéder 4 heures, les échantillons étant conservés à température ambiante [2,12,13]. Un délai de 6 heures peut être toléré pour le TP [19,20]. Le GEHT signale que le

TP peut rester stable pendant même 12 heures à température ambiante, que l'échantillon soit centrifugé ou non. Toutefois, cette constatation n'a pas été confirmée par notre étude où la baisse du TP a été très significative après 6 heures ( $t=-7,7\%$ ) et hautement significative après 12 heures et 24 heures avec  $t$  respectivement de  $-9,2\%$  et  $-10,9\%$ . Ces résultats pourraient être expliqués par une température ambiante un peu chaude sous nos climats le jour de l'analyse ayant entraîné une activation de l'hémostase dans le tube et, par la suite, un raccourcissement des temps de coagulation.

Le TCA est, à l'opposé, moins stable que le TQ. Ainsi, Khose et al. [21] ont noté que le TQ ne s'est allongé de façon significative ( $+7\%$ ) qu'après 24 heures à température ambiante, l'allongement atteignant  $+25\%$  en 72 heures. Pour le TCA, ces auteurs ont observé, après une première phase de raccourcissement ( $-10\%$ ) liée à l'activation des plaquettes et des facteurs de coagulation dans le prélèvement, un allongement ayant atteint  $+20\%$  au bout de 48 heures. Dans notre étude, le TCA a été inchangé après 6 et même 12 heures du prélèvement et ne s'est allongé de façon significative qu'après 24 heures. Certains auteurs rattachent cet allongement à la perte, temps dépendante, des facteurs labiles V et VIIIc, protéolysés par l'activation spontanée de la protéine C dans le prélèvement [2,8]. Barrowcliffe et al [22], ont rapporté une perte de  $50\%$  de l'activité du FVIIIc en 24 heures à température ambiante. De façon similaire, il y avait dans notre étude une baisse rapide et significative du taux du FVIIIc constatée dès la 6<sup>ème</sup> heure après le prélèvement et s'accroissant au cours du temps. C'est pour cette raison qu'il est recommandé, pour le dosage du FVIIIc, de conserver les échantillons à  $+4^{\circ}\text{C}$  et de réaliser l'analyse dans les 2 heures suivant le prélèvement, ou bien de congeler le plasma [1,23,24]. Ceci évitera la perte en activité du FVIIIc et l'allongement artificiel du TCA.

La baisse du TP au fil du temps (immédiat à 24 heures) constatée dans notre étude, contraste avec une stabilité du taux du Fg et du FV. Le GEHT recommande, pour le dosage du FV, soit un délai de 4 heures suivant le prélèvement après centrifugation rapide et conservation à température voisine de  $18-20^{\circ}\text{C}$ , soit de 6 heures si le tube est conservé à  $+4^{\circ}\text{C}$ [2].

#### 4.4 Influence de la température de congélation sur les tests d'hémostase

Si les tests de coagulation ne peuvent être réalisés sur plasma frais, ceux-ci doivent être congelés pour une exploration ultérieure, et ce pour préserver l'activité biologique des facteurs de coagulation. Néanmoins, il est important de noter que la stabilité de ces derniers est fortement dépendante des conditions de congélation. La conservation optimale pour assurer une bonne stabilité est la congélation en azote liquide (congélation rapide). Ce qui n'est pas toujours possible en raison de contraintes matérielles surtout dans les petits laboratoires. A défaut, les plasmas peuvent être congelés dans des congélateurs à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à  $-80^{\circ}\text{C}$ . De façon globale, les valeurs moyennes des TP, TCA, Fg, FV et FVIIIc de notre étude ont été plus abaissées après conservation des plasmas pendant 28 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$  que celles obtenues après conservation pendant 28 jours à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Plumhoff et al [25] indiquent que le TQ et le TCA restent stables pendant 10 jours après congélation du plasma à  $-20^{\circ}\text{C}$  et pendant au moins 21 jours après congélation du plasma à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Dans notre étude, nous avons constaté une baisse significative du TP passant de  $76,4\%$  à  $64,20\%$  au bout de 28 jours de conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ceci contraste avec la modification minimale et non significative du TP après conservation à  $-70^{\circ}\text{C}$ . En ce qui concerne les valeurs TCA, nous n'avons pas constaté de modifications importantes aussi bien après congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  qu'à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Quant à la stabilité des facteurs de la coagulation au cours de la congélation, plusieurs auteurs s'y sont intéressés puisque le dosage de ces facteurs se fait généralement en 2<sup>ème</sup> intention. Pour Plumhoff et al [25], le FV reste stable pendant 6 heures à  $+4^{\circ}\text{C}$ , la perte d'activité atteignant  $20\%$  après une semaine à  $-20^{\circ}\text{C}$  et  $10\%$  à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Le FVIIIc apparaît dans toutes les études comme le plus labile: la perte d'activité atteint  $10\%$  après 4 heures à  $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $40\%$  après 3 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$  et  $20\%$  après 3 jours à  $-70^{\circ}\text{C}$  [2, 8,25].

Dans notre étude, l'activité du FVIIIc a été stable pendant 28 jours à  $-70^{\circ}\text{C}$  alors que la perte d'activité a atteint  $17\%$  après 28 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$ . L'activité du FV a diminué de façon inégale après 28 jours, de  $1,5\%$  à  $-70^{\circ}\text{C}$  et de  $4,5\%$  à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le Fg a conservé des taux stables durant toute la période de congélation que ce soit à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Cela confirme la robustesse connue de ce facteur [8,15]. D'ailleurs, dans l'étude de Khose et al [21], le Fg apparait très stable, son taux initial étant conservé pendant 48 heures et ne diminuant que de 10% après 72 heures. Les conditions de conservation de l'échantillon n'ont pas été cependant précisées dans ce travail. Une autre étude faite chez 38 sujets sains prélevés sur tube citaté 3,8%, a montré que le taux de Fg peut rester stable à +4°C pendant 48h [26] tandis que dans une autre étude, on n'a pas trouvé de différence significative des taux de Fg que ce soit après conservation à -70°C pendant 1 semaine ou à +4°C pendant 30min [27]. Toutefois, il est parfois établi que le Fg congelé /décongelé perd une partie de son activité procoagulante [8].

## 5. CONCLUSION

Dans le domaine de la biologie en général et de l'hémostase en particulier, l'utilisation de méthodes analytiques de plus en plus sophistiquées et performantes met en première ligne les questions d'assurance de qualité des étapes pré-analytiques. Ces étapes ont une influence majeure sur les résultats et peuvent être une source importante d'erreur.

L'anticoagulant utilisé (concentration, proportion), la température de conservation du prélèvement ainsi que le délai d'exécution des tests de coagulation après prélèvement sont autant de variables à considérer. Elles ont fait l'objet de nombreuses recommandations par les groupes d'étude en hémostase (GEHT, CLSI).

Notre étude ne vient que confirmer dans une certaine mesure ces recommandations en démontrant que le choix de la concentration 3,2 % du citrate est préférable en termes de fiabilité des résultats, que la conservation des plasmas à -20 °C est inefficace pour assurer une stabilité satisfaisante des facteurs de coagulation pendant plus de 2 semaines et qu'il

est vivement recommandé de les conserver à -70 °C pour des durées plus longues.

Toutefois, une étude sur une population plus large, plus diversifiée (malades/ témoins) et incluant d'autres tests de l'hémostase est nécessaire pour consolider ces résultats et tester d'autres variables pré-analytiques.

TESTS D'EXPLORATION DE LA COAGULATION

**Tableau N°I : Résultats des tests d'hémostase en fonction de la concentration du citrate (0,109M et 0,129M).**

<i>Test</i>	TP(%)		TCA (sec)		Fg (g/L)		FV (%)		FVIIIc (%)	
	<i>TP<sup>1</sup></i>	<i>TP<sup>2</sup></i>	<i>TCA<sup>1</sup></i>	<i>TCA<sup>2</sup></i>	<i>Fg<sup>1</sup></i>	<i>Fg<sup>2</sup></i>	<i>FV<sup>1</sup></i>	<i>FV<sup>2</sup></i>	<i>FVIIIc<sup>1</sup></i>	<i>FVIIIc<sup>2</sup></i>
<b>Moyenne (ET)</b>	76,4 (5,79)	75,6 (4,64)	33,5 (1,58)	33,4 (1,26)	2,69 (0,26)	2,74 (0,43)	91,5 (12,48)	79 (8,43)	106 (46,71)	108 (45,23)
<b>Test t</b>	t= -0,8 NS		t= -0,1 NS		t= 0,05 NS		t= -12,5 HS		t= 2 NS	

**TP** : taux de prothrombine, **TCA** : temps de céphaline avec activateur, **Fg** : fibrinogène, **ET**: écart type ,

<sup>1</sup> : Citrate 0,109M avec un rapport 1V/9V,

<sup>2</sup> : Citrate 0,129M avec un rapport 1V/9V ,

**NS** : non significatif (p > 0,05), **HS** : hautement significatif (p<0,001).

**Tableau N°II : Résultats des tests d'hémostase en fonction du rapport anticoagulant/volume sanguin (1V/8V, 1V/9V et 1V/10V).**

<i>Test</i>	TP(%)			TCA (sec)			Fg (g/L)			FV (%)			FVIIIc (%)		
	<i>TP<sup>1</sup></i>	<i>TP<sup>2</sup></i>	<i>TP<sup>3</sup></i>	<i>TCA<sup>1</sup></i>	<i>TCA<sup>2</sup></i>	<i>TCA<sup>3</sup></i>	<i>Fg<sup>1</sup></i>	<i>Fg<sup>2</sup></i>	<i>Fg<sup>3</sup></i>	<i>FV<sup>1</sup></i>	<i>FV<sup>2</sup></i>	<i>FV<sup>3</sup></i>	<i>FVIIIc<sup>1</sup></i>	<i>FVIIIc<sup>2</sup></i>	<i>FVIIIc<sup>3</sup></i>
<b>Moyenne (ET)</b>	76,40 (5,79)	74,20 (5,67)	78,30 (5,67)	33,50 (1,58)	32,50 (2,79)	32,10 (2,84)	2,69 (0,26)	2,62 (0,38)	2,70 (0,46)	91,50 (12,48)	95,50 (12,12)	95 (7,81)	106 (46,71)	114 (45,26)	104 (57,97)
<b>Test t</b>		t= -2,2 NS	t= 1,9 NS		t= -1 NS	t = -1,4 S		t= -0,07 NS	t= 0,01 NS		t= 4 NS	t= 3,5 NS		t= 8 NS	t= -6,6 NS

**TP** : taux de prothrombine, **TCA** : tems de céphaline avec activateur, **Fg** : fibrinogène, **ET**: écart type ,

<sup>1</sup> : Citrate 0,109M avec un rapport 1V/9V,

<sup>2</sup> : Citrate 0,109M avec un rapport 1V/8V,

<sup>3</sup> : Citrate 0,109M avec un rapport 1V/10V,

**NS** : non significatif (p > 0,05), **S** : significatif (p entre 0,05 et 0,01).



TESTS D'EXPLORATION DE LA COAGULATION

**Tableau N°III: Résultats des tests d'hémostase en fonction du délai de réalisation par rapport au prélèvement (immédiat, 6 heures, 12 heures et 24 heures).**

<i>Test</i>		<b>Moyennes</b>	<b>(ET)</b>	<b>Test t</b>	
<i>TP (%)</i>	<i>TP<sup>1</sup></i>	76,40	(5,79)		
	<i>TP<sup>2</sup></i>	68,70	(5,67)	t= -7,7	TS
	<i>TP<sup>3</sup></i>	67,20	(4,27)	t= -9,2	HS
	<i>TP<sup>4</sup></i>	65,50	(3,53)	t= -10,9	HS
<i>TCA (sec)</i>	<i>TCA<sup>1</sup></i>	33,50	(1,58)		
	<i>TCA<sup>2</sup></i>	33,50	(1,71)	t= 0	NS
	<i>TCA<sup>3</sup></i>	33,70	(2,16)	t= 0,2	NS
	<i>TCA<sup>4</sup></i>	34,95	(2,94)	t= 1,45	S
<i>Fg (g/L)</i>	<i>Fg<sup>1</sup></i>	2,69	(0,26)		
	<i>Fg<sup>2</sup></i>	2,60	(0,28)	t= -0,021	NS
	<i>Fg<sup>3</sup></i>	2,66	(0,23)	t= -0,031	NS
	<i>Fg<sup>4</sup></i>	2,66	(0,23)	t= -0,031	NS
<i>FV (%)</i>	<i>FV<sup>1</sup></i>	91,5	(12,48)		
	<i>FV<sup>2</sup></i>	94	(11,74)	t= 2,5	NS
	<i>FV<sup>3</sup></i>	93	(12,52)	t=1,5	NS
	<i>FV<sup>4</sup></i>	90	(12,47)	t=-1,5	NS
<i>FVIIIc (%)</i>	<i>FVIIIc<sup>1</sup></i>	106	(46,71)		
	<i>FVIIIc<sup>2</sup></i>	89	(35,57)	t= -17	TS
	<i>FVIIIc<sup>3</sup></i>	81,50	(45,52)	t= -24,5	TS
	<i>FVIIIc<sup>4</sup></i>	74,60	(48,69)	t= -31,4	HS

**TP** : taux de prothrombine, **TCA** : tems de céphaline avec activateur, **Fg** : fibrinogène, **ET**: écart type

<sup>1</sup> : Citrate 0,109M réalisé immédiatement,

<sup>2</sup> : Citrate 0,109M réalisé à 6 heures,

<sup>3</sup> : Citrate 0,109M réalisé à 12 heures,

<sup>4</sup> : Citrate 0,109M réalisé à 24 heures,

**NS** : non significatif (p > 0,05), **S** : significatif (p entre 0,05 et 0,01),

**TS** : très significatif (p entre 0,01 et 0,001), **HS** : hautement significatif (p<0,001).

**Tableau N°IV : Résultats des tests d'hémostase après conservation à -20°C et à différents temps d'exécution.**

<i>Test</i>		<b>Moyennes</b>	<b>(ET)</b>	<b>Test t</b>	
<i>TP(%)</i>	<i>TP<sup>1</sup></i>	76,40	(5,79)		
	<i>TP<sup>2</sup></i>	72,50	(6,25)	t= -3,9	NS
	<i>TP<sup>3</sup></i>	68,60	(7,51)	t= -7,8	TS
	<i>TP<sup>4</sup></i>	71,80	(5,18)	t= -4,6	NS
	<i>TP<sup>5</sup></i>	64,20	(6,05)	t= -12,2	HS
<i>TCA (sec)</i>	<i>TCA<sup>1</sup></i>	33,50	(1,58)		
	<i>TCA<sup>2</sup></i>	33,75	(2,11)	t= 0,25	NS
	<i>TCA<sup>3</sup></i>	33,25	(1,76)	t= -0,27	NS
	<i>TCA<sup>4</sup></i>	33,05	(2,32)	t= -0,45	NS
	<i>TCA<sup>5</sup></i>	32,65	(2,08)	t= -0,85	S
<i>Fg(g/L)</i>	<i>Fg<sup>1</sup></i>	2,69	(0,26)		
	<i>Fg<sup>2</sup></i>	2,65	(0,27)	t= -0,037	NS
	<i>Fg<sup>3</sup></i>	2,73	(0,30)	t= 0,037	NS
	<i>Fg<sup>4</sup></i>	2,74	(0,33)	t= 0,054	NS
	<i>Fg<sup>5</sup></i>	2,62	(0,19)	t= -0,073	NS
<i>FV(%)</i>	<i>FV<sup>1</sup></i>	91,50	(12,48)		
	<i>FV<sup>2</sup></i>	80	(9,42)	t= -11,5	TS
	<i>FV<sup>3</sup></i>	76	(10,22)	t= -15,5	HS
	<i>FV<sup>4</sup></i>	79	(11,97)	t= -12,5	HS
	<i>FV<sup>5</sup></i>	87	(11,35)	t= -4,5	NS
<i>FVIIIc (%)</i>	<i>FVIIIc<sup>1</sup></i>	106	(46,71)		
	<i>FVIIIc<sup>2</sup></i>	61	(19,69)	t= -45	TS
	<i>FVIIIc<sup>3</sup></i>	52,10	(15,13)	t= -53,9	HS
	<i>FVIIIc<sup>4</sup></i>	107	(18,74)	t= 1	NS
	<i>FVIIIc<sup>5</sup></i>	87,50	(15,68)	t= -18,5	NS

**TP** : taux de prothrombine, **TCA** : tems de céphaline avec activateur, **Fg** : fibrinogène, **ET**: écart type,

<sup>1</sup> : conservation à T° ambiante et réalisation en immédiat,

<sup>2</sup> : congélation à -20°C et réalisation à J7,

<sup>3</sup> : congélation à -20°C et réalisation à J14,

<sup>4</sup> : congélation à -20°C et réalisation à J21,

<sup>5</sup> : congélation à -20°C et réalisation à J28,

**NS** : non significatif (p > 0,05), **S** : significatif (p entre 0,05 et 0,01),

**TS** : très significatif (p entre 0,01 et 0,001), **HS** : hautement significatif (p<0,001).

TESTS D'EXPLORATION DE LA COAGULATION

Tableau N°V : Résultats des tests d'hémostase après conservation à -20°C et -70°C pendant 28 jours.

<i>Test</i>	TP(%)			TCA (sec)			Fg (g/L)			FV (%)			FVIIIc (%)		
	<i>TP<sup>1</sup></i>	<i>TP<sup>2</sup></i>	<i>TP<sup>3</sup></i>	<i>TCA<sup>1</sup></i>	<i>TCA<sup>2</sup></i>	<i>TCA<sup>3</sup></i>	<i>Fg<sup>1</sup></i>	<i>Fg<sup>2</sup></i>	<i>Fg<sup>3</sup></i>	<i>FV<sup>1</sup></i>	<i>FV<sup>2</sup></i>	<i>FV<sup>3</sup></i>	<i>FVIIIc<sub>1</sub></i>	<i>FVIIIc<sub>2</sub></i>	<i>FVIIIc<sub>3</sub></i>
<b>Moyenne</b>	76,40	64,20	73,70	33,50	32,65	32,15	2,69	2,62	2,77	91,50	87	90	106	87,50	106
<b>(ET)</b>	(5,79)	(6,05)	(5,31)	(1,58)	(2,08)	(1,94)	(0,26)	(0,19)	(0,28)	(12,48)	(11,35)	(12,02)	(46,71)	(15,68)	(34,14)
<b>Test t</b>	t= -12,2 HS	t= -2,7 NS		t= -0,85 S	t= -1,35 TS		t= -0,073 NS	t=0,084 NS		t= -4,5 NS	t= -1,5 NS		t= -18,5 NS	t= 0 NS	

**TP** : taux de prothrombine, **TCA** : tems de céphaline avec activateur, **Fg** : fibrinogène, **ET**: écart type,

<sup>1</sup> : conservation à T° ambiante et réalisation en immédiat,

<sup>2</sup> : congélation à -20°C et réalisation à J28,

<sup>3</sup> : congélation à -70°C et réalisation à J28,

**NS** : non significatif (p > 0,05), **S** : significatif (p entre 0,05 et 0,01), **TS** : très significatif (p entre 0,01 et 0,001),

**HS** : hautement significatif (p<0,001).

## REFERENCES

- [1] Schved JF, Sarlat C et Gris JC. Recommandations pratiques pour la réalisation des tests d'hémostase : du prélèvement au contrôle de qualité. *Rev Fr Lab*1995; 272:19-25.
- [2] Gris JC. Etapes préanalytiques en hémostase. *EMC. Biologie clinique* 2011; 90-20-0033.
- [3] Clinical and Laboratory Standards institute. Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays. Approved guideline-5<sup>th</sup>ed 2008; document H21-A5.
- [4] Adocock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3,2% vs 3,8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J ClinPathol* 1997; 107: 105-110.
- [5] Chantarangkul V, Tripodi A, Clerici M , Negri B, Mannucci PM. Assessment of the influence of citrate concentration on the international normalized ratio (INR) determined with twelve reagent-instrument combinations. *Thromb Haemost.* 1998;80:258-262.
- [6] Duncan EM, Casey CR, Duncan BM, Lloyd JV. Effect of concentration of trisodium citrate anticoagulant on calculation of the international normalized ratio and international sensitivity index of thromboplastin. *Thromb Haemost* 1994; 72:81-88.
- [7] Horsti J. Preanalytical aspects of routine coagulation measurements. *Scan J Clin Lab Invest* 2001; 61:167-168.
- [8] Gris JC, Mercier E. Les constantes préanalytiques en hémostase. *Rev. Fr .Lab* 1999; 317:63-70.
- [9] Van den Besselaar AMHP, Chantarangkul V, Tripodi A. A comparison of two sodium citrate concentrations in two evacuated blood collection systems for prothrombin time and ISI determination. *Thromb Haemost* 2000 ;84:664-667.
- [10] Rizza, C.R. And Rhymes, I.L., "Coagulation Assay of VIIIc and IXc" In: *The Hemophilias. Methods in Hematology Series*, vol. 5. A. L. Bloom (ed.) New York: Churchill Livingstone, 1982; Chapter 2, pp. 18-38.
- [11] Massignon D. Les limites du bilan standard d'hémostase. *Rev Fr Lab* 2005;370:33-40.
- [12] Groupe d'études sur l'hémostase et la thrombose (GEHT). Les variables préanalytiques en hémostase. *S TV* 1998 ; 1-40.
- [13] Polack B, Schved JF, Boneu B; Groupe d'étude sur l'hémostase et la thrombose (GEHT). Preanalytical recommendations of the "Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT)" for venous blood testing in hemostasis laboratories. *Haemostasis* 2001;31: 61-68.
- [14] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. Approved guideline second edition 1991; document H21-A2, vol 11, n°23.
- [15] Schved JF, 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: 731-733.
- [16] Adocock DM, Kressin DC, Marlar RA. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence on citrate concentration. *Am J Clin Pathol.* 1998 ; 109 : 595-599.
- [17] Duchassaing D, Elalamy I , Michotey O , Piemont Y. Assurance de qualité de la phase préanalytique : les centres de tri. *Rev Fr Lab*1998;299:29-37.
- [18] Thomson JM, Easton AC , Faraghev EB. The use of vacutainer for collection and storage of blood for coagulation testing. *Clin Lab Haematol* 1983; 5:413-421.
- [19] Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993;81: 734-744.
- [20] Van Geest-Daalderop JH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJ, Hoekstra MM, Van den Besselaar AM. Preanalytical variables and off-site blood collection : influences on the results of the prothrombin time /international normalized ratio test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy. *Clin Chem* 2005; 51:561 -568.
- [21] Khose KP, Wisser H. Storage stability of citrate blood samples for coagulation analyses. *ClinChem*1991;37:952.
- [22] Limin F, Ying Z, Hongcan Z, Zhixin S. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep* 2014; 4: 3868.
- [23] Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol.* 2013; 35:1-13.
- [24] Samama MM et collaborateurs. Hémorragie et thromboses : du diagnostic aux traitements. Elsevier Masson 2<sup>ème</sup> édition 2008; 16.
- [25] Plumhoff EA, Thomson CK., Fisher PK, Bowie EJ, Nichols WL. Effects of specimen storage and handling on coagulation. *Thromb Haemost* 1993;69:866.
- [26] RosensonRS, Staffileno BA, Tangney CC. Effects of tourniquet technique, order of draw, and sample storage on plasma fibrinogen. *Clin Chem*1998;44 :688-690.
- [27] Cushman M, Cornell E, Howard PR, Bovill EG . Laboratory methods and quality assurance in the cardiovascular health study. *Clin Chem* 1995; 41: 264 -270.

