

Gestion des prélèvements biologiques

Catherine MASSART

Laboratoire CIC INSERM 0203, RENNES

INTRODUCTION

Importance des **conditions pré-analytiques** sur la qualité et la fiabilité des résultats en biologie clinique

Difficultés liées à la préparation du patient, au recueil, à l'étiquetage et au transport d'un échantillon biologique

PLAN

A) Patient

I) Préparation du patient

- 1) Invariables
- 2) Variables

II) Echantillons sanguins

- 1) Antiseptiques cutanés
- 2) Garrot

III) Echantillons urinaires

IV) Echantillons salivaires

V) Liquide céphalo-rachidien

A) Patient

I) Préparation du patient

1) Invariables

Invariables	Paramètres
Age	Hormones, enzymes (PAL)
Sexe	Hormones, enzymes
Race	25 hydroxy vitamine D Ostéocalcine
Grossesse	Protéines, thyroxine

2) Variables

Variables	Paramètres	Recommandations
Stress	Hormones (GH, prolactine..), protéines (transferrine..) enzymes	Sujet au repos
Exercice physique	Hormones, enzymes	Sujet au repos
Alimentation (repas)	Ionogramme (glucose), lipides, protéines, hormones (insuline...)	A jeun (depuis minuit)
Tabac	Hormones (calcitonine, insuline) Enzymes (PAL), ACE, IgE	Ne pas fumer depuis minuit
Alcool	Ferritine, enzymes hépatiques	Absence d'alcool depuis minuit
Posture	Système rénine-angiotensine-aldostérone	2h décubitus 1h déambulation
Examen médical	PSA (toucher rectal), CK (injections IM)	A distance
Horaire	Rythme circadien (cortisol, prolactine..) Pulsatilité (GH, LH)	Le matin sinon en tenir compte
Médicaments	Très nombreux	

Médicaments

Interférence	Mécanisme	Exemple
Interaction directe	Réaction croisée	Corticoïdes et cortisol
Interaction directe	Effet additionnel	Biotine (Vit B9) sur paramètres dosés par immunoanalyse utilisant système avidine-biotine
Interaction indirecte	↗ Synthèse	Psychotropes, anti-émétiques et prolactine
Interaction indirecte	↘ Synthèse par ↗ clearance	Carbamazépine, phénobarbital, Rifampicine et thyroxine (T4)
Interaction indirecte	↗ par inhibition aux protéines porteuses	Héparine et T4
Interaction indirecte	↗ par inhibition de la 5'désiodase	Amiodarone, lithium, propranolol produits iodés et T4
Interaction indirecte	↘ par inhibition de la 5'désiodase	Amiodarone, lithium, propranolol produits iodés et T3

Importance des renseignements cliniques

II) Echantillons sanguins

1) Antiseptiques cutanés

Nature	Interférences	Recommandations
Alcool	1) Hémolyse 2) Surestimation du K	Assécher la peau avant de prélever
Povidone iodée (Betadine®)	1) Surestimation du phosphore, K, acide urique, thyroxine (T4) 2) Faux positifs (certains dosages) - Hémoglobine fécale - Glucose urinaire	A éviter
Chlorure de benzalkonium	Surestimation du sodium	A éviter

III) Echantillons urinaires

En général urines de 24h après avoir écarté la première miction du matin

IV) Echantillons salivaires

Bien imbiber la salivette et éviter tout écrasement du coton

V) Liquide céphalo-rachidien

Ponction lombaire (entre L3 et L4) stérile atraumatique

PLAN (suite)

B) Recueil des échantillons biologiques

I) Echantillons sanguins

1) Matériel de ponction

2) Choix du tube

a) Matière

b) Nature (sec ou anticoagulant)

c) Avec surfactants

d) Avec activateurs de la formation du caillot

e) Avec gels séparateurs

II Echantillons urinaires

III) Echantillons salivaires

IV) LCR

B) Recueil des échantillons biologiques

I) Echantillons sanguins

- 1) Matériel de ponction**
- 2) Choix du tube**
- 3) Règles à respecter**

1) Matériel de ponction

a) Aiguilles

α) Calibre (trop étroit): hémolyse

* Surestimation: transaminases, LDH, P, Mg, K

* Sous-estimation: albumine, phosphatase alcaline

Recommandations:

1) ne les utiliser que pour nouveaux-nés et patients difficiles à prélever

2) Adapter si possible la taille de l'aiguille à la veine du patient

β) Lubrifiants utilisés pour faciliter la pénétration de l'aiguille

Silicones+++

Déplacement de molécules de leurs protéines porteuses

Interférence dans les dosages par immunoanalyse

Recommandations:

1) utiliser aiguilles correctement lubrifiées avec des traitements appropriés évitant toute interférence (lubrifiants polaires, agents gélifiants...)

γ) Métal

Chrome, fer Mn, nickel

Interférence dans les dosages des métaux de même nature

Recommandations:

Utiliser aiguilles appropriées

2) Choix du tube

a) Matière

Verre utilisé pendant des années

Délaissé au profit du plastique (coût et praticabilité)

Faire preuve de vigilance!

*** Certains plastiques**

Adsorption de molécules à doser (médicaments, hormones..)

*** polypropylène ou polyéthylène contenant différentes substances**

(anti-oxydants, antistatiques, lubrifiants, plastifiants....):

Interférences dans le dosage de certains médicaments

*** Phtalates et diéthylphtalate**

Création de pics artéfactuels (chromatographie en phase gazeuse)

Recommandations:

Utiliser les nouveaux matériaux traités pour usage médical

(ex: polyéthylène téréphtalate de grade médical)

b) Nature du tube (Avec ou sans anticoagulants)

Codes et couleurs imposées par ECCLS (European Committee for Clinical Laboratory Standards) et International Standard Organization (ISO)

α) Principaux tubes utilisés



Nature	Couleur
EDTA potassium EDTA sodium	Violet
Héparine (lithium) Héparine (sodium)	Vert Bleu marine
Citrate de sodium	Bleu pâle Noir
Fluorure de sodium	Gris
Aucun (tube sec)	Rouge
Tubes siliconés +EDTA+ aprotinine	Rose

β) Critères de choix

1- Respecter le dictionnaire des analyses de chaque discipline+++

Nature	Couleur	Paramètre
EDTA potassium	Violet	NFS
EDTA sodium		Rénine
Héparine (lithium)	Vert	Biochimie (urgences)
Héparine (sodium)	Bleu marine	Biochimie (métaux)
Citrate de sodium	Bleu pâle	Coagulation
	Noir	VS
Fluorure de sodium	Gris	Glucose, alcool
Aucun (tube sec)	Rouge	Immunoanalyse
Tubes siliconés +EDTA+ aprotinine	Rose	Peptides fragiles (ACTH, glucagon, VIP)

2- Avantages et inconvénients des anticoagulants en Biochimie

- Avantages

Rapidité pour les urgences

Fluidité du plasma sans microparticules de fibrine (alarmes caillot sur automates)

- Inconvénients

*** Héparine**

L'exclure

- pour les techniques avec électrodes à Cl⁻ (Lie certains électrolytes)

- pour les techniques par immunoanalyse (Interfère lors de la réaction antigène-anticorps)

*** EDTA**

A bannir pour les dosages (notamment ELISA et chimiluminescence) utilisant la phosphatase alcaline (complexe les ions divalents utilisés comme cofacteurs)

γ) Règles pratiques à respecter

- Anticoagulant

Bien remplir le tube (volume d'anticoagulant/volume de sang)

Eviter hémolyse

Retourner lentement 5 à 10 fois

Le maintenir vertical

- Tube sec

Attendre 45 minutes à température ambiante (rétraction totale du caillot) avant de le placer à 4°C pour le transport (molécules fragiles à doser)

c) Utilisation de tubes avec surfactants

* But

- augmenter la fluidité de l'échantillon sanguin
- diminuer l'adsorption des protéines, des hématies et des plaquettes sur la surface des parois

* Interférences

1) Silicone

Surestimation du Mg ionisé, du lithium

Immunoanalyse

- Interaction avec le système avidine-biotine utilisé en ELISA (prolactine, hCG, TSH)
- Surestimation des taux de T3, vit B12, CA15-3, CRP

2) Organosilane (SST de Beckton Dickinson)

Surestimation des taux de T3, vitamine B12, CA15-3

d) Utilisation de tubes avec activateurs de la formation du caillot

* But

Permettre un rendu des résultats plus rapide (urgence)

Diverses substances (silice, kaolin, thromboplastine, oxyde de polyéthylène...)

* Interférences

- Lithium

- Hormones (testostérone)

- Activation de la pro-MMP-9 (pro-Matrix Métalloprotéinase-9)

e) Utilisation de tubes primaires avec gels séparateurs

* But

- augmentation du volume de sérum ou plasma recueilli
- permet de travailler sur tube primaire sans décantation

* Interférences

- Adsorption de certains médicaments hydrophobes (phénytoïne, phénobarbital, carbamazépine, quinidine...)
- Libération substances toxiques interférant en immunoanalyse (hCG)

RECOMMANDATIONS GENERALES:

Extrême prudence pour le choix des tubes de prélèvement+++

Toute substance introduite dans les tubes (gels, séparateur, activateur...) peut potentiellement générer des interférences selon le lot utilisé

Prélever les tubes dans l'ordre suivant: 1) tubes secs 2) tubes citratés bleus 3) tubes héparinés 3) tubes fluorure de sodium 4) tubes EDTA 5) tubes citratés noirs

Raffick ARB et al. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. Clin Biochem 2010;43:4-25.

Wilde C. Subject preparation, sample collection and handling. In The immunoassay Handboud. Third Edition. Wild D, Eds. Elsevier. 2005; p. 443-455.

II Echantillons urinaires

1) Récipients

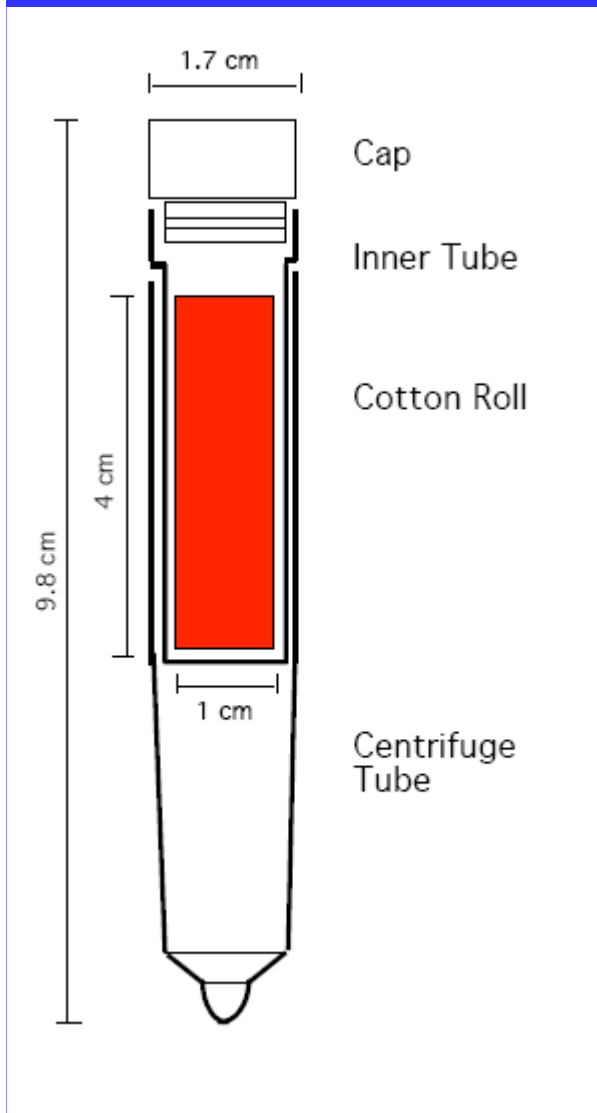
Pour le recueil primaire utiliser un bocal

- stérile en plastic inerte (polypropylène)
 - contenant un conservateur variable selon l'analyte dosé: acide faible (borique) ou fort (HCL)
- (dictionnaire des analyses +++)

2) Le recueil

- collecter en général les urines de 24h (diurèse contrôlée par la créatinine urinaire) après avoir écarté la première miction du matin.
- bien homogénéiser avant de prélever l'aliquot

III) Echantillons salivaires



1) Récipients

- **Salivette** (tube conique contenant un coton) sans ou avec acide citrique (utilisé pour en augmenter la quantité).

Avantage: absence de viscosité et facilité de recueil après centrifugation)

(Crachat recueilli dans récipient inerte comme le polypropylène puis congélation pour dénaturer la mucine)

2) Le recueil

- Bien imbiber le coton de la salivette (30 à 90 secondes)

3) Délais

Attendre 3h après un brossage des dents

IV) LCR

Recueil dans tube stérile après avoir éliminé les 3 premières gouttes

PLAN (suite)

C) Etiquetage

D) Transport des tubes primaires sur site

E) Traitement du tube primaire

I) Centrifugation pour l'obtention de sérums ou de plasma

II) Décantation du sérum ou plasma dans tube secondaire

III) Température de stockage

IV) Température de transport sur site

F) Transport des échantillons traités

C) Etiquetage

Sur le tube et sur le bon

I) Principales causes d'erreur dues au pré-analytique (CSCQ 2004)

- Mauvaise identification du sujet
- Absence de date et heure de prélèvement
- Absence d'informations sur les interférences possibles (prise de médicaments)

II) Indiquer l'heure de prélèvement et émarger (traçabilité)

III) Consentement éclairé

D) Transport du tube primaire (sur site)



I) Délais

- Rapidité

Pour certaines molécules fragiles en biochimie et facteurs de coagulation (hémostase)

Importance de la traçabilité (heure de prélèvement inscrite sur le bon)

Utilisation de pneumatique si possible

II) Conditions d'acheminement

1) Température

Transport à 4°C (glaçons dans sacs plastic ou blocs réfrigérés) pour préserver l'intégrité (Ammonium, acide pyruvique, acide lactique, galactose, oxalate , hormones peptidiques, certaines vitamines)

2) Abri de la lumière

Vitamines A, B, C, E et pigments biliaires

E) Traitement du tube primaire

I) Centrifugation pour l'obtention de sérums ou de plasma

1) Vitesse

En général centrifugation (rotor sans angle fixe)

- sang: à 2000 x g pendant 10 minutes

- urine: 400 x g

Il existe des nomogrammes permettant de calculer de calculer la vitesse en rpm ou rotation par minute en fonction du rayon de la centrifugeuse



2) Température

Molécules fragiles, utiliser une centrifugeuse réfrigérée

II) Décantation du sérum ou plasma dans tube secondaire

1) Matière

Plastique en général

2) Etiquetage

Attention! Source d'erreur supplémentaire d'identité patient

Codes adoptés

3) Délais

Contrôler les délais (infirmière doit téléphoner avant l'envoi des tubes et exiger la traçabilité par accusé réception du laboratoire qui sous-traite sur site)

Peptides extrêmement fragiles (ACTH, VIP, glucagon):traitement sur place

- prélèvement sur tube aprotinine (bouchon rose)
- placer le tube immédiatement à 4°C
- centrifuger dans les 15 minutes à 4°C
- décanter et congeler le plasma très rapidement

III) Température de stockage

Court terme: à -20°C

Pour des protocoles de recherche: -80°C

Parfois nécessité de congeler dans l'azote liquide

Contrôler la température des congélateurs (système Océasoft par ex)

IV) Température de transport sur site

Transfert des tubes congelés sur site dans récipients isothermes

Traçabilité en demandant accusé réception de la qualité des tubes réceptionnés

F) Transport des échantillons secondaires (sériques ou plasmatiques)

« Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses » 2009-2010 (OMS)

Mise en vigueur le 1^{er} janvier 2009

www.who.int/csr/resources/publications/biosafety

I) Règlement international (Recommandations de comités d'experts)

1) **Air:** Organisation de l'Aviation civile internationale (OACI)

Association internationale de transport aérien (IATA) associe règles de l'OACI et autres restrictions

2) **Rail:** Transport international ferroviaire des marchandises dangereuses (RID)

3) **Route:** Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route (ADR)

4) **Mer:** Code maritime international des marchandises dangereuses publié par l'Organisation maritime internationale (OMI)

5) **Poste:** Manuel de la poste aux lettres publié par l'Union postale universelle (UPU)

II) Définitions et classement

www.who.int/csr/resources/publications/biosafety

1) Matières infectieuses

Catégorie A: pouvant provoquer une invalidité permanente ou une maladie mortelle ou potentiellement mortelle chez l'homme ou l'animal en bonne santé (Affectation au n° ONU 2814 si homme et animal concernés; n° ONU 2900 si animal seul concerné)

Catégorie B: qui ne répondent pas aux critères de la catégorie A

Liste: Annexe 2

II) Définitions et classement

www.who.int/csr/resources/publications/biosafety

2) Cultures

« Résultat d'opérations ayant pour but la reproduction d'agents pathogènes »

Catégorie A ou B

3) Echantillons prélevés sur des patients

« Matériaux humains ou animaux y compris les excréta, sécrétions, le sang et ses constituants, les tissus et liquides tissulaires , les organes transportés à des fins de diagnostic, enquête, traitement ou prévention »

II) Définitions et classement

www.who.int/csr/resources/publications/biosafety

4) Exceptions

« Etant donné le faible danger qu'elles présentent, les substances d'origine biologique suivantes ne sont pas soumises..... »

- Substances **ne contenant pas d'agents infectieux ou non susceptibles** de provoquer une maladie pour l'homme ou les animaux
- Substances contenant des **microorganismes non pathogènes** pour l'homme ou les animaux
- Substances sous une forme telle que **tout germe pathogène** éventuellement présent a été **inactivé ou neutralisé** et ne représente donc aucun risque pour la santé
- Le **sang et /ou les composés sanguins** recueillis pour la **transfusion** et/ou la **transplantation**
- Les **gouttes de sang séché** et les **tests de dépistage de sang occulte dans les selles**
- Les **déchets** médicaux ou déchets d'hôpital **décontaminés**

5) Exemptions pour les échantillons humains et animaux

...qui présentent un risque minimal de contenir des agents pathogènes sont exemptés s'ils **sont transportés dans un emballage conçu pour éviter toute fuite** et portant la mention: « **Echantillon humain exempté** » ou « **échantillon animal exempté** »

Jugement par un **spécialiste** fondé sur les antécédents médicaux, symptômes....

Exemple: Analyses de **sang et d'urines** pour **cholestérol, glycémie, hormones, PSA** et examens pour vérifier le fonctionnement du **cœur, foie ou rein** sur des êtres humains ou animaux atteints de maladie non infectieuse

a) L'emballage doit être constitué de trois éléments:

- i) un ou plusieurs récipients primaires étanches
- ii) un emballage secondaire étanche
- iii) un emballage extérieur suffisamment robuste compte-tenu de sa contenance, de sa masse et dont un côté au moins mesure au minimum 100 mm x 100 mm

b) pour les liquides du matériau absorbant....

c) pour les récipients primaires fragiles multiples placés dans un emballage secondaire devront être emballés individuellement ou séparés pour éviter les contacts

III) Préparation générale des expéditions pour le transport

1) Système de base de triple emballage

Un récipient primaire:

- contient la matière
- doit être étanche
- doit être étiqueté
- doit être enveloppé dans suffisamment de matériau absorbant (si le tube venait à se casser)

2) Catégorie A

a) Emballage

Triple emballage plus

- Normes qui garantissent le passage avec succès des épreuves requises comportant des chutes libres de 9 m de haut, un test de perforation et un test de pression (Instruction Emballage P620 :PI620 pour le mode aérien)

b) Marquage

- Nom et adresse de l'expéditeur
- Numéro de téléphone d'une responsable au courant de l'expédition
- Nom et adresse du signataire
- Numéro de l'ONU : ONU 2814 « matières infectieuses pour l'homme » ou ONU 2900 « matières infectieuses pour l'animal »
- si neige carbonique ou azote liquide: nom scientifique du réfrigérant, le numéro de l'ONU qui convient, la quantité nette

c) Etiquetage

Deux types d'étiquettes

- de risque: sous forme d'un losange
- de manutention: diverses formes possibles

(voir www.who.int/csr/resources/publications/biosafety)

3) Catégorie B

a) Emballage

Triple emballage (Instruction d'emballage P650) (Annexe 4)

b) Marquage

- Pour le transport aérien: Nom et adresse de l'expéditeur
- Pour le transport aérien: Numéro de téléphone d'une responsable au courant de l'expédition
- Nom et adresse du signataire
- Désignation officielle de transport « **BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B** » à côté du losange (Fig 1)
- Prescriptions relatives à la température de stockage: facultatif



Fig 1

Dimensions minimale de chaque côté formant le losange:

- au moins 2 mm
- au moins 50 mm pour transport aérien

Hauteur des chiffres et lettres: au moins 6 mm

Couleur: aucune imposée mais contrastant avec le fond et facile à lire

« **BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B** » au moins 6 mm à côté de la marque

Pour le transport aérien

-si utilisation de la neige carbonique solide (Figure 2 apposée)
ou liquides cryogéniques (Figures 3 et 4 apposées)

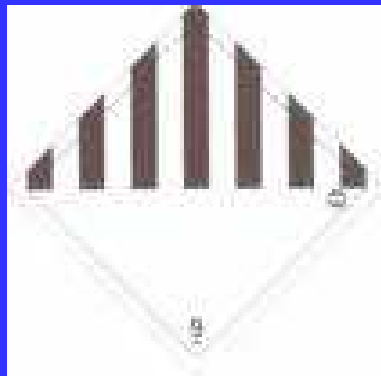


Fig 2



Fig 3



Fig 4

c) Documentation

A préparer et à signer par le transporteur

- envois internationaux: liste de colisage/facture pro-forma avec
 - Adresse de l'expéditeur et destinataire
 - Nombre de colis
 - Contenu détaillé
 - Poids
 - Valeur
- permis et /ou déclaration d'importation et/ou d'exportation
- lettre de transport aérien (ou mer, route, rail...)

Toutes ces recommandations doivent être respectées pour les pays ayant adopté le système de l' ONU que l'OMS incite à respecter

Dans le cas contraire (Arabie Séoudite, Croatie....), le règlement de l'IATA relatif aux substances dangereuses impose toute une liste de restrictions concernant

- l'expéditeur**
- le transporteur**
- le destinataire**

www.iata.org mise à jour 2011

CONCLUSION

Difficultés liées à la préparation du patient, au recueil,
à l'étiquetage et au transport d'un échantillon biologique
Nécessité de respecter toutes les consignes

www.who.int/csr/resources/publications/biosafety

Air OACI: http://www.icao.int/cgi/goto_m.pl

Rail RID: <http://www.otif.org/>

Route ADR: <http://www.unece.org/home.asp>

Mer OMI: <http://www.imo.org/home.asp>

Poste UPU: <http://www.upu.int/>

www.iata.org mise à jour 2011