

3.3

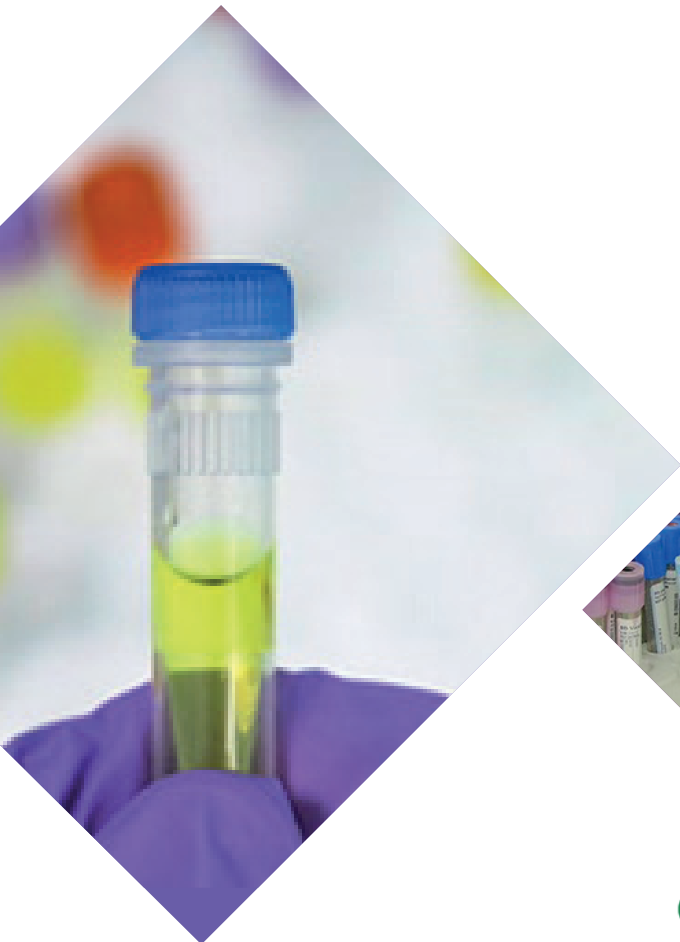
BIOCHIMIE

Réaliser un examen de qualité

La biochimie est surtout affaire d'analyseur. Il est inutile de développer davantage que les règles générales précédemment décrites, chaque système analytique disposant de son propre mode d'emploi.

Un focus sur les prélèvements et sur une discipline particulière, l'endocrinologie, nous a paru plus utile.

- 3.3 A.** Les prélèvements sanguins pour les analyses de biochimie - **JP. Braun , C. Trumel**
- B.** L'évaluation endocrinienne - **L. Jaillardon**



A. LES PRÉLÈVEMENTS SANGUINS POUR LES ANALYSES DE BIOCHIMIE

Jean Pierre Braun et Catherine Trumel



OBJECTIFS

- S'assurer qu'aucune altération du spécimen n'intervienne pendant la phase préanalytique. Les facteurs de variation sont très nombreux et ont des effets variables selon les analytes et les analyseurs.
- Obtenir un prélèvement de qualité en vue d'une analyse de biochimie plasmatique ou sérique.

ESPÈCES CONCERNÉES : TOUTES

1. PRÉPARATION DU PATIENT

Lorsque cela est possible :

- Réaliser les prises de sang sur un animal à jeun pour le chien et le chat. En effet, la prise récente d'un repas peut entraîner, d'une part, l'apparition d'une lipémie postprandiale (qui disparaît 7 à 12 h après le repas), et, d'autre part, une augmentation plus ou moins importante de la concentration de certains analytes sanguins (exemple : urée, ammoniac, glucose, etc).
- Éviter ou limiter au maximum le stress au moment ou dans les minutes précédant la prise de sang : la sécrétion de catécholamines puis de cortisol peut fortement augmenter la glycémie, ainsi que modifier plusieurs variables, en particulier le glucose ou les lactates chez le chat.

2. CHOIX DU TUBE ET DU MATÉRIEL DE PRÉLÈVEMENT

- Un tube adapté à la taille de l'animal et au volume nécessaire pour les analyses prévues pour limiter au maximum le volume prélevé.
- Une aiguille de diamètre assez grand et une dépression (si seringue) assez faible pour éviter l'hémolyse ; en cas de transfert d'une seringue vers un tube, retirer l'aiguille.
- Un tube sans anticoagulant pour la préparation d'un sérum (tube à bouchon rouge brique).

NB :

- Sauf exception, l'anticoagulant préféré est l'héparine et ses sels (tube à bouchon vert).
- Le plus souvent, les résultats sont très voisins entre sérum et plasma mais parfois non interchangeables, par exemple pour l'électrophorèse des protéines sériques ; les accélérateurs de coagulation et les gels séparateurs sont dénués d'effets sur les analyses de routine. Les gels séparateurs ne doivent pas être utilisés pour les dosages médicamenteux.

3. PRÉPARATION DU SPÉCIMEN

- Identifier clairement les tubes afin d'éviter les erreurs.
- Respecter les volumes prévus par les fabricants, même si cela est peu important pour l'héparine.

- Homogénéiser le spécimen immédiatement en retournant le tube 8 à 10 fois par des mouvements lents et sans agitation excessive de façon à bien répartir la totalité de l'anticoagulant dans l'ensemble du sang collecté. Cette étape d'homogénéisation n'est pas nécessaire si le sang est récolté sur tube sec.
- Centrifuger les tubes pendant 10 à 15 min à environ 2000 g dans l'heure suivant le prélèvement et séparer le sérum ou le plasma dans un tube sec.

NB : le délai avant analyse du spécimen sera aussi court que possible ; la stabilité des analytes est variable en fonction des conditions de conservation; en réfrigération, la plupart des analytes sont stables quelques heures. Quelques exceptions toutefois comme l'ammoniac ou les gaz sanguin qui doivent être analysés IMMEDIATEMENT après le prélèvement.

4. ANALYSE DU SPÉCIMEN

- Avant toute analyse, examiner le spécimen pour détecter (et noter) d'éventuelles anomalies (caillots, couleurs, ...) et éventuellement faire un nouveau prélèvement.
- Pour les spécimens réfrigérés et surtout décongelés, il est nécessaire de les homogénéiser par plusieurs retournements et de les remettre à température ambiante avant analyse.
Attention ! Avec les tubes coniques de type Eppendorf, l'agitation doit être vigoureuse pour atteindre la portion de spécimen située dans la pointe du cône.
- Quelle que soit l'analyse, s'assurer de suivre les modes opératoires de l'ESV* ou ceux du laboratoire auquel le spécimen est adressé.

- ✓ Prélever le sang de préférence chez un sujet préparé, calme.
- ✓ Choisir des tubes d'un volume adapté au volume de sang collecté.
- ✓ Examiner les tubes avant analyse et noter les anomalies éventuelles.

B. L'ÉVALUATION ENDOCRINIENNE

Laetitia Jaillardon



L'endocrinologie est une discipline majeure et complexe de la pathologie clinique. L'auteur apporte dans cette fiche les informations nécessaires à la compréhension des facteurs de qualité des résultats d'analyse.

Le clinicien va recourir le plus souvent aux services d'un laboratoire spécialisé avec lequel il pourra échanger pour interpréter les résultats obtenus. Il est aussi proposé aux ESV une offre technique en analyseurs dont le choix dépendra de la satisfaction à des pré-requis indispensables.

OBJECTIFS

- Réaliser des dosages hormonaux en laboratoires vétérinaires spécialisés et en établissements de soins.
- Etablir le diagnostic des dysendocrinies dues aux lésions ou aux perturbations fonctionnelles des tissus endocriniens.

ESPÈCES CONCERNÉES : CHIEN, CHAT, CHEVAL

1. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

- **Hormone** : c'est une molécule présente en **très faible quantité** dans le sang (10^{-9} à 10^{-12} mole/L, soit 10^4 à 10^7 fois moins que les analytes biochimiques classiques)
- **Principe des dosages hormonaux** : ce sont des **dosages immunologiques** ; on utilise des anticorps pour la reconnaissance d'un épitope d'une molécule antigène qui est l'hormone à doser.
 - ◇ Nécessité du recours à un marqueur puissant pour révéler la liaison anticorps/hormone : radioactivité ou enzymes produisant un signal (coloration, luminescence ou fluorescence).
 - ◇ Mesure du niveau du signal : proportionnel (dosages « sandwich » par fixation à 2 anticorps) ou inversement proportionnel (dosages par compétition/ analogue hormonal) à la concentration de l'hormone dans l'échantillon.

2. PRÉCAUTIONS ET PRINCIPALES CAUSES D'ERREUR

Les principales difficultés techniques sont liées au principe même des dosages immunologiques, à savoir **la qualité de la liaison antigène (hormone)-anticorps**.

- Nécessité de disposer d'un **anticorps capable de reconnaître l'hormone** (l'antigène) et seulement cette hormone (autres molécules apparentées, naturelles ou médicaments), de reconnaître une ou plusieurs parties (épitopes) spécifiques de l'hormone considérée.
- Nécessité de disposer d'un **anticorps qui ait une grande affinité pour l'hormone** pour s'y fixer intensément dans un milieu complexe qui peut varier avec les espèces et/ou les maladies : c'est « **l'effet matrice** », défini par la complexité du milieu dans lequel se situe l'hormone à doser, composé de nombreuses molécules pouvant interférer avec le dosage, à des degrés inconnus. L'affinité de l'anticorps pour l'hormone doit être suffisante par rapport à celle avec d'autres protéines (protéines transporteuses ou inflammatoires ou de la coagulation, auto-anticorps (ex dans l'hypothyroïdie).
- **Le type de marquage n'est en aucun cas le garant de la qualité**, il doit seulement être validé pour la révélation correcte de la ou des liaisons anticorps-antigène mises en jeu.

- **Les valeurs de référence ne sont pas universelles**, car elles sont relatives à la fixation de l'anticorps sur l'antigène sur des échantillons témoins dont la mesure quantitative exacte est inconnue. Elles peuvent varier sensiblement suivant l'espèce (effet matrice), la nature (voire le lot) de la trousse de dosage utilisée et ses conditions d'utilisation (durée et température d'incubation par exemple). Elles doivent être publiées et tenues à jour par le laboratoire qui effectue les analyses ou produit les analyseurs.
- **La précision** des résultats (pour les raisons précédemment décrites) est faible et peut sensiblement varier en fonction des conditions techniques et de la composition de la matrice (en particulier en cas de maladie) et se situe généralement entre 15% à 20% même si l'affichage des constructeurs d'automates ou les producteurs de trousse affichent souvent de meilleures performances).
- **Sécrétion pulsatile et rythme circadien** : il peut exister des fluctuations majeures des valeurs sanguines. Plusieurs prélèvements répartis dans la journée en fonction des connaissances physiologiques sont idéaux (T4, insuline).
Quand cela est possible éthiquement, on peut avoir recours à des tests dynamiques de freinage ou de stimulation par des facteurs physiologiques ou pharmacologiques connus (administration de glucose pour l'insuline, de tétracosactide d'ACTH ou de dexaméthasone pour le cortisol par exemple).
- **Étape pré-pré-analytique :**
 - ◇ **Effet du stress** : de nombreuses sécrétions hormonales sont déclenchées par le stress (Cortisol, T4, prolactine, catécholamines) et ont des effets sur d'autres facteurs hormonaux. Donc l'intervention vétérinaire peut avoir un effet direct sur les valeurs hormonales mesurées.
 - ◇ **Choix raisonné des analyses dans le contexte du patient** : risque de mettre en évidence un déséquilibre hormonal secondaire à une maladie primaire non diagnostiquée ou de ne pas confirmer une dysendocrinie sur une mesure statique ou un test dynamique inapproprié.
- **Étape pré-analytique :**
 - ◇ Facteurs liés à l'**obtention du spécimen** : choix du tube et préparation du spécimen, identification et stockage.
 - ◇ Facteurs liés à l'**animal** : statut physiologique (statut reproducteur, diète et prise alimentaire) et pathologique, traitements.
 - ◇ **Conditions de transport, de stockage, cycle congélation/recongélation** : risque particulièrement accru de détruire ou d'activer les protéines entraînant une modification de l'effet matrice ou une altération de la quantité d'hormones présentes.
- **Étape analytique :**
 - ◇ En absence de standardisation des mesures, la **validation des trousse par espèce** est indispensable par des équipes scientifiques reconnues et les allégations des fabricants ne peuvent être suffisantes.
 - ◇ La fiabilité d'un test est garantie par son usage dans les conditions optimales d'utilisation. **Contrôle qualité continu** (interne et externe) indispensable.
- **Étape post-analytique** : il n'existe pas toujours de consensus sur les unités.
- **Étape post-post-analytique** : interprétation des résultats dans le contexte anamnestique, clinique et biologique complexe : une collaboration étroite avec un vétérinaire spécialiste en pathologie clinique est souvent nécessaire pour discuter des résultats

LES DOSAGES HORMONAUX EN ESV

- Toutes les propriétés, principes et règles générales énoncées sont transposables aux analyseurs d'endocrinologie de paillasse commercialisés et utilisés dans les ESV.
- Le bon usage de ces analyseurs passe par des règles indispensables qu'il faut discuter en amont de l'achat avec les constructeurs et qu'il est indispensable de suivre en aval.
- Partant du pré requis que les analyseurs commercialisés ont été validés au préalable, 3 grands principes sont indispensables à respecter :
 - ◇ Préalablement à l'achat, s'assurer auprès du fabricant que l'analyseur a été validé pour les variables d'intérêt dans les espèces cibles et demander les documents attestant de cette validation.
 - ◇ Contrôle qualité (interne et externe) continu : s'assurer que le constructeur prévoit ces contrôles et inclure leur coût lors de l'investissement.
 - ◇ La phase pré-analytique est primordiale pour la fiabilité des résultats : les personnes réalisant les prélèvements et les analyses doivent être formées à l'utilisation des analyseurs mais surtout sensibilisées à l'importance de cette phase dans l'interprétation des résultats (importance de la mise à jeun avant les analyses, effet du stress sur les sécrétions hormonales, caractéristiques du prélèvement i.e hémolyse, lipémie, importance de l'homogénéisation et du pipetage des échantillons...)
 - ◇ La réalisation justifiée des analyses et l'interprétation des résultats de ces analyses dans le contexte du patient.

Pour en savoir plus

Fiche 3.3. A. : Les prélèvements sanguins pour les analyses de biochimie