Mesure du pH et des gaz du sang sur des micro-échantillons: effets de la conservation à 4°C pendant une heure. Etude chez le rat

Jean-Henri Gaudy MD, Jean-François Sicard MD,
Marielle Quignon Atos

Les effets de la conservation au réfrigérateur (4°C) pendant une heure de micro-échantillons (150 microlitres) sur la mesure des gaz du sang ont été étudiés dans une large gamme de valeurs (pH: 7,11–7,58; PCO₂: 26–97 mmHg; PO₂: 31–503 mmHg) chez 20 rats chez lesquels un catheter avait été préalablement implanté dans une artère carotide. Les valeurs des gaz du sang ont été modifiées en faisant varier la composition des gaz inspirés: normoxie, hypoxie hypocapnique, hyperoxie, hypercapnie (dans ce cas huit animaux ont été anesthésiés avec de l'halothane à 1,1%). Cent huit couples de micro-échantillons ont été prélevés. Pour chaque couple de prélèvement, un échantillon a été analysé immédiatement (h0) et comparé à l'autre prélevé au même moment mais analysé après une heure de conservation à 4°C (h1). Pour le traitement statistique des résultats, la méthode de Bland et Altman a été appliquée aux couples de mesures. Après une heure de conservation à 4°C la PaCO₂ est légèrement plus élevée qu'à h0 (moyenne des différences $\pm$ écart-type: $+1,08 \pm 1,7$ mmHg) et le pH légèrement diminué ($-0,016 \pm 0,011$ upH). Ces résultats montrent que pour ces deux paramètres, dans la gamme des valeurs étudiées, la

conservation des échantillons à 4°C pendant une heure modifie peu les résultats. Par contre pour la PaO₂, pour l'ensemble des mesures, la moyenne des différences entre h1 et h0 est égale à $-17,0 \pm 25$ mmHg. Si on isole les valeurs de PaO₂ inférieures à 200 mmHg (56 couples de mesures) la moyenne des différences des mesures à h1 et celles à h0 est seulement de $-0,98 \pm 5,3$ mmHg. Pour les valeurs de PaO₂ supérieures à 200 mmHg (52 couples de mesures) la moyenne des différences est égale à $-34,3 \pm 26,3$ mmHg; le manque de reproductibilité des mesures pour les valeurs élevées de PaO₂, qui a été étudié chez six rats supplémentaires (27 couples de mesures) n'explique qu'en partie les différences observées; les effets du métabolisme sont très probablement beaucoup plus importants. Il est permis de conclure que pour une gamme étendue de valeurs de pHa et de PaCO₂, ainsi que pour les valeurs de PaO₂ inférieures à 200 mmHg, la conservation à 4°C pendant une heure modifie peu les résultats; pour les PaO₂ supérieures à 200 mmHg, il demeure recommandé d'effectuer les mesures immédiatement après le prélèvement.

Key words

MEASUREMENT TECHNIQUES: blood gases, micromethods;
TEMPERATURE: effects.

Laboratoire d'Anesthésiologie, Faculté de médecine Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75012 Paris, France.

Ce travail a fait l'objet d'une présentation orale lors du congrès national de la Société Française d'Anesthésie Réanimation en septembre 1991.

Cette étude a été réalisée grâce à une aide de la Fondation pour la Recherche Médicale (France).

Correspondance à adresser à: Professeur Jean-Henri Gaudy, Service d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale, Hôpital Rothschild, 33 Bvd de Picpus, 75012 Paris, France.

Accepted for publication 14th March, 1992.

The effects of one hour storage at 4°C on micro blood gas samples (150 µl) were studied for a wide range of values (pH: 7.11–7.58; PCO₂: 26–97 mmHg; PO₂: 31–503 mmHg) in 20 rats with indwelling carotid artery catheters. Blood gas values were modified by varying the composition of inspired gases: normoxia, hypocapnic hypoxia, hyperoxia, hypercapnia (in this case eight animals were anaesthetized with halothane 1.1%). One hundred and eight double micro-samples were taken. For each double sample, one was analysed immediately (H0) and compared with the second sample after one hr storage at 4°C (H1). The Bland and Altman method was used for the statistical analysis of results. After one hr storage at 4°C, the PCO₂ was slightly higher than at H0 (mean difference $\pm$ SD: $+1.08 \pm 1.7$ mmHg) and arterial pH was slightly lower (mean difference $\pm$ SD: -0.016 ± 0.011 upH). These results show that for these two variables, in the range studied, one hour storage at 4°C had little effect. In contrast, for arterial PO₂ the mean difference between all measurements between H1 and H0 was

-17 ± 25 mmHg. If results lower than 200 mmHg (56 double samples) are considered separately, the mean difference between values at H1 and H0 was only -0.98 ± 5.3 mmHg. For PaO_2 greater than 200 mmHg (52 double samples), the mean difference was -34 ± 26.3 mmHg; this may be due to low reproducibility of measurements of elevated PO_2 levels and to the effects of cellular metabolism. The observation that studies performed at higher levels of PaO_2 , in six additional rats (27 double samples), were not reproducible only partially explains the discrepancies; metabolic effects are probably much more important. It can be concluded that for a wide range of pH and $PaCO_2$ values, as well as for PaO_2 lower than 200 mmHg, one hour storage at 4°C , has little effect on results; for PaO_2 greater than 200 mmHg, immediate analysis is still recommended.

Pour des raisons pratiques il est parfois impossible d'effectuer les mesures du pH et des gaz du sang (PCO_2 et PO_2) immédiatement après le prélèvement et les échantillons de sang doivent être conservés pendant un certain temps. La conservation d'échantillons d'un volume de 2 millilitres ou plus a été très étudiée. Un certain nombre de causes d'erreur sont bien connues : la présence de bulles d'air, la qualité des parois du contenant (verre ou plastique), surtout le métabolisme cellulaire qui modifie le pH, la $PaCO_2$ et surtout la PaO_2 (d'autant plus que la PaO_2 est élevée).¹ La conservation des échantillons au froid est recommandée pour freiner le métabolisme. Les prélèvements de micro-échantillons sont très utilisés en recherche expérimentale, pour les petits animaux, et en clinique néonatalogique et pédiatrique. Ils pourraient présenter l'avantage de supprimer deux des trois causes d'erreur citées plus haut (bulles d'air et qualité de la paroi du contenant). A notre connaissance une seule étude rapporte les effets de la conservation au froid sur les mesures de tels échantillons, cela uniquement pour des valeurs physiologiques.² En recherche expérimentale et en clinique humaine la gamme des valeurs du pH et des gaz du sang est très étendue. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier les effets de la conservation à 4°C de micro-échantillons (150 microlitres) pour une large gamme de valeurs.

Méthodes

L'étude a été réalisée chez 20 rats Whistar mâles (Iffa Credo, 69592 L'arbresle, France) d'un poids moyen de 250 g chez lesquels un cathéter avait été préalablement implanté dans une artère carotide, sous anesthésie à l'halothane.³ Douze rats ont été étudiés éveillés; huit autres rats ont été étudiés alors qu'ils étaient anesthésiés avec de l'halothane à 1,1%. Les animaux éveillés ont été placés dans un cylindre afin de limiter leurs mouvements et d'éviter un déplacement du cathéter. Puis les animaux

ont été placés dans une enceinte transparente (volume : 2 litres). Un prolongateur d'une longueur de 15 cm et d'un diamètre interne de 0,58 mm a été raccordé au cathéter carotidien; son extrémité libre a été passée au travers d'un orifice pratiqué dans la paroi de l'enceinte et elle a été clampée. Pour chaque couple de prélèvements, après déclampage du cathéter et écoulement de deux à trois gouttes de sang, deux prélèvements de 150 microlitres chacun ont été effectués sur des tubes capillaires pré-héparinés (tubes capillaires cat N° 82590-10, Instrument Laboratory; concentration approximative d'héparine : 70 UI ml^{-1}); puis le cathéter a été rincé avec une solution physiologique héparinée. Un des tubes a été immédiatement placé à 4°C dans un réfrigérateur. Le pH et les gaz du sang (PO_2 , PCO_2) ont été mesurés immédiatement sur le premier échantillon (h0) et au bout d'une heure de conservation à 4°C pour le second échantillon (h1). Les mesures ont été faites à 37°C sur un analyseur Instrument Laboratory modèle 1302 régulièrement étalonné avec des étalons standards (pH : solutions tampon 7,384 et 6,84 Instrument Laboratory; CO_2 : 4,96% et 10,05%; O_2 : 0 et 12,2% - Compagnie Française des Produits Oxygénés). Les mesures ont été effectuées par la même technicienne.

L'enceinte dans laquelle se trouvaient les animaux a été ventilée avec un débit de gaz de trois litres par minute. Afin de modifier les valeurs du pH et des gaz du sang la composition du mélange gazeux inhalé a été modifiée : normoxie (FiO_2 0,21); hypoxie (FiO_2 de 0,21 à 0,10); hyperoxie (FiO_2 de 0,21 à 1,00); hypercapnie ($FiCO_2$ de 0,03 à 0,10). Dans le cas de l'hypercapnie huit animaux ont été anesthésiés avec de l'halothane à 1,1%. Les concentrations d'oxygène, de gaz carbonique et d'halothane dans les gaz inspirés ont été mesurées avec des analyseurs adaptés (Beckman OM11 et LB2, Normac Datex).

Pour le traitement statistique des résultats la méthode de Bland et Altman⁴ a été utilisée; la moyenne des différences entre h1 et h0 et l'écart-type de ces différences ont été calculés; les limites de concordance (moyenne ± 2 SD) ont été rapportées sur les figures.

Résultats

Les modifications de la composition des gaz inspirés a permis d'étudier une large gamme de valeurs. Pour les prélèvements analysés immédiatement (h0) la PaO_2 est comprise entre 31 et 503 mmHg, la $PaCO_2$ entre 26 et 97 mmHg, et le pH entre 7,11 et 7,58. Pour cette gamme de mesures, la moyenne des différences pour le pH est égale à $-0,016$, avec un écart-type de 0,011 (Figure 1); pour la PCO_2 la moyenne des différences est égale à $+1,08$ mmHg, l'écart-type étant égal à 1,7 mmHg (Figure 2); pour la PO_2 , la moyenne des différences est égale à -17 mmHg avec un écart-type de 25 mmHg (Figure 3). Pour les PO_2 supérieures à 200 mmHg (56 couples de mesures)

FIGURE 1 Concordance entre les valeurs initiales de pHa (h0) et les valeurs de pHa au bout d'une heure de conservation à 4° C (h1). Le trait en pointillés représente la moyenne des différences entre les mesures à h1 et les mesures à h0, les traits pleins les limites de concordance.

FIGURE 2 Concordance entre les valeurs initiales de PaCO₂ (h0) et les valeurs de PaCO₂ au bout d'une heure de conservation à 4° C (h1). Le trait en pointillés représente la moyenne des différences entre les mesures à h1 et les mesures à h0, les traits pleins les limites de concordance.

la moyenne des différences est égale à -34,3 mmHg, l'écart-type étant égal à 26,3 mmHg (Figure 4). Pour les PO₂ inférieures à 200 mmHg (52 couples de mesures) la moyenne des différences est égale -0,98 mmHg avec un écart-type de 5,3 mmHg (Figure 5).

Discussion

Dans certaines circonstances les mesures du pH et des gaz du sang ne peuvent être effectuées immédiatement après le prélèvement et les échantillons de sang doivent être

FIGURE 3 Concordance entre les valeurs initiales de PaO₂ (h0) et les valeurs de PaO₂ au bout d'une heure de conservation à 4° C (h1) pour l'ensemble des 108 couples de mesures. Le trait en pointillés représente la moyenne des différences entre les mesures à h1 et les mesures à h0, les traits pleins les limites de concordance.

FIGURE 4 Concordance entre les valeurs initiales de PaO₂ (h0) et les valeurs de PaO₂ au bout d'une heure de conservation à 4° C (h1) pour les valeurs de PaO₂ supérieures à 200 mmHg. Le trait en pointillés représente la moyenne des différences entre les mesures à h1 et les mesures à h0, les traits pleins les limites de concordance.

conservés avant que les mesures soient effectuées. Le fait de conserver le sang peut modifier les résultats des mesures pour diverses raisons : le métabolisme cellulaire (hématies, plaquettes, leucocytes) fait que la PO₂ et le pH diminuent et que la PCO₂ augmente avec la durée de la conservation ; la présence de bulles d'air ou de mousse provoque des modifications inverses de celles du métabolisme ;⁵ la nature du matériau constituant les parois de la seringue, verre ou plastique, peut modifier les résultats ;⁶ la dilution par l'héparine peut être une source d'erreurs

FIGURE 5 Concordance entre les valeurs initiales de PaO_2 (h_0) et les valeurs de PaO_2 au bout d'une heure de conservation à 4°C (h_1) pour les valeurs de PaO_2 inférieures à 200 mmHg. Le trait en pointillés représente la moyenne des différences entre les mesures à h_1 et les mesures à h_0 , les traits pleins les limites de concordance.

notables.⁷ Afin de freiner le métabolisme cellulaire, il est recommandé de conserver les échantillons de sang au froid. A notre connaissance une seule étude fait état des effets de la conservation de micro-échantillons. Lors d'une étude visant à valider une technique de prélèvement de micro-échantillons, Cohill et White² ont montré que pour des valeurs physiologiques (pH : $7,334 \pm 0,017$; PCO_2 : $38,2 \pm 0,8$ mmHg; PO_2 : $98,6 \pm 1,2$ mmHg) la conservation des échantillons à 0°C ne modifie pas les résultats. Il nous a paru intéressant de vérifier si ces conclusions s'appliquent à des échantillons de sang dont les PO_2 et les PCO_2 sont très basses ou très élevées.

L'étude a été réalisée chez le rat, animal très utilisé dans les laboratoires et dont la physiologie est bien connue. Chez le rat éveillé, au repos, les valeurs des gaz du sang artériel sont comparables à celles de l'homme normal éveillé⁸ alors que l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène est moins grande chez le rat que chez l'homme.⁹ Les caractéristiques hématologiques du sang de rat sont légèrement différentes de celles de l'homme. Chez le rat âgé de 12 semaines les valeurs mesurées par l'élevage qui nous fournit les animaux sont les suivantes : hématocrite, $57 \pm 4\%$; hématies, $7\,780\,000 \pm 440\,000/\text{mm}^3$; leucocytes $6\,500 \pm 1\,600/\text{mm}^3$; hémoglobine, $108,9 \pm 3,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Un certain nombre de mesures en hypercapnie et en hyperoxie ont été effectuées chez des rats anesthésiés avec de l'halothane (1,1%) ce qui pourrait avoir modifié les valeurs absolues des résultats pour la PaO_2 . Si l'halothane ne modifie pas l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène chez l'homme,^{10,11} Severinghaus *et al.*¹² ont montré que de très fortes concentrations d'halothane (33%) modifient la

réponse des électrodes polarographiques. Mais pour ces auteurs, il est très peu probable que les faibles concentrations d'halothane utilisées en clinique (comme dans la présente étude) interfèrent avec la mesure de la PaO_2 .

Les résultats de la présente étude montrent qu'il est possible de conserver des micro-échantillons de sang pendant une heure au réfrigérateur (4°C) sans modifier notablement les valeurs de la PCO_2 et du pH dans la large gamme de mesures étudiée pour ces deux paramètres. Il n'en va pas de même pour la PO_2 . En effet, pour l'ensemble des 108 couples de mesures, la moyenne des écarts et l'écart-type sont importants. Pour les valeurs de PO_2 inférieures à 200 mmHg les résultats sont beaucoup plus satisfaisants. Par contre pour les valeurs supérieures à 200 mmHg, la différence observée entre les valeurs immédiates et les valeurs à une heure est très grande. Au moins deux facteurs peuvent l'expliquer : le manque de précision et de reproductibilité des mesures et les effets du métabolisme cellulaire. Malley¹ rapporte une précision de ± 3 mmHg pour la PCO_2 , de $\pm 0,01$ upH pour le pH et de ± 10 mmHg pour la PO_2 . L'électrode de PO_2 est la moins précise, cette imprécision pouvant aller jusqu'à 20%, en particulier pour les valeurs élevées de PO_2 .¹³ Afin d'évaluer ce facteur nous avons étudié la reproductibilité des mesures pour des valeurs de PO_2 supérieures à 200 mmHg. Pour cela, chez six autres rats, éveillés, nous avons fait varier la FiO_2 entre 0,40 et 1,00. A chaque niveau de FiO_2 deux micro-échantillons de sang artériel ont été prélevés et analysés immédiatement l'un après l'autre (le second, placé dans de la glace, a été analysé trois à quatre minutes après le premier). Vingt sept couples de mesures ont été effectuées. Les valeurs extrêmes de PO_2 sur le premier échantillon ont été 215 et 565 mmHg (Figure 6). La moyenne des différences a été de $-4,55$ mmHg avec un écart-type de 7,71 mmHg. Ces résultats, en accord avec les données de la littérature,¹ confirment que pour les valeurs élevées de PO_2 la reproductibilité des mesures n'est pas parfaite. Néanmoins les limites de concordance ($\pm 15,43$ mmHg) sont tout à fait satisfaisantes pour l'utilisation clinique des résultats et le manque de reproductibilité ne rend compte que d'une partie des différences observées entre h_1 et h_0 . Le métabolisme cellulaire est probablement le facteur le plus important à incriminer dans la diminution de PO_2 observée au bout d'une heure de conservation. Les hématies, les plaquettes sanguines et les leucocytes consomment de l'oxygène et produisent du gaz carbonique. A 37°C , au bout d'une heure, la PCO_2 augmente de 5 mmHg, le pH diminue de 0,05 upH et la PO_2 diminue de 20 mmHg quand sa valeur initiale est inférieure à 150 mmHg et de 150 mmHg quand sa valeur initiale est supérieure à 250 mmHg.¹ Le fait de placer le prélèvement dans de la glace réduit le métabolisme à 10% de sa valeur à 37°C ce qui limite les variations de la PaO_2 .

FIGURE 6 Concordance entre les valeurs initiales de PaO_2 (h_1) et les valeurs de PaO_2 au bout de trois à quatre minutes de conservation dans de la glace (h_2) pour des valeurs de PaO_2 supérieures à 200 mmHg. Le trait en pointillés représente la moyenne des différences entre les mesures à h_2 et les mesures à h_1 , les traits pleins les limites de concordance.

Les valeurs observées dans la présente étude sont compatibles avec ces observations.

En conclusion, pour le pH et la PCO_2 et pour les PO_2 inférieures à 200 mmHg (ce qui est le cas le plus fréquent en clinique), la conservation de micro-échantillons à 4°C peut être utilisée. Si les valeurs attendues par le clinicien ou par le chercheur sont supérieures à 200 mmHg, la conservation des échantillons est à proscrire et les mesures doivent être faites immédiatement après le prélèvement (en sachant que pour ces valeurs précision et reproductibilité sont imparfaites).

References

- 1 Malley WJ. Clinical blood gases. Application and noninvasive alternatives. Philadelphia: WB Saunders Company, 1990.
- 2 Cohill JD, White FK. Validation of a new arterial micro-sample device. *Respiratory Care* 1982; 27: 1210-4.
- 3 Popovic V, Popovic P. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels. *J. Appl Physiol* 1960; 15: 727-8.
- 4 Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 307-10.
- 5 Biswas CK, Ramos JM, Agroyannis B, Kerr DNS. Blood gas analysis: effect of air bubbles in syringe and delay in estimation. *Br Med J* 1982; 284: 923-7.
- 6 Scott PV, Horton JN, Mapleson WW. Leakage of oxygen from blood and water samples stored in plastic and glass syringes. *Br Med J* 1971; 3: 512-6.
- 7 Hutchinson AS, Ralston SH, Dryburgh FJ, Small M, Fogelman I. Too much heparine: possible source of error in blood gas analysis. *Br Med J* 1983; 287: 1131-2.
- 8 Brun-Pascaud M, Gaudebout C, Blayo MC, Pocidal JJ. Arterial blood gases and acid-base status in awake rats. *Resp Physiol* 1982; 48: 45-57.
- 9 Gray LH, Steadman JM. Determination of the oxyhaemoglobin curves for mouse and rat blood. *J Physiol* 1964; 175: 161-71.
- 10 Millar RA, Beard DJ, Hulands GH. Oxyhaemoglobin dissociation curves in vitro with and without the anaesthetics halothane and cyclopropane. *Br J Anaesth* 1971; 43: 1003-12.
- 11 Lanza V, Mercadante S, Pignatoro A. Effects of halothane, enflurane, and nitrous oxide on oxyhemoglobin affinity. *Anesthesiology* 1988; 68: 591-4.
- 12 Severinghaus JW, Weiskopf RB, Nisaimura M, Bradley F. Oxygen electrode errors due to polarographic reduction of halothane. *J Appl Physiol* 1971; 31: 640-2.
- 13 Brinklov MM, Anderson PK, Stoke DB, Hole P. Inaccuracy of oxygen electrode systems (letter). *Anesthesiology* 1979; 51: 368-9.