

# Stabilité des paramètres de la coagulation

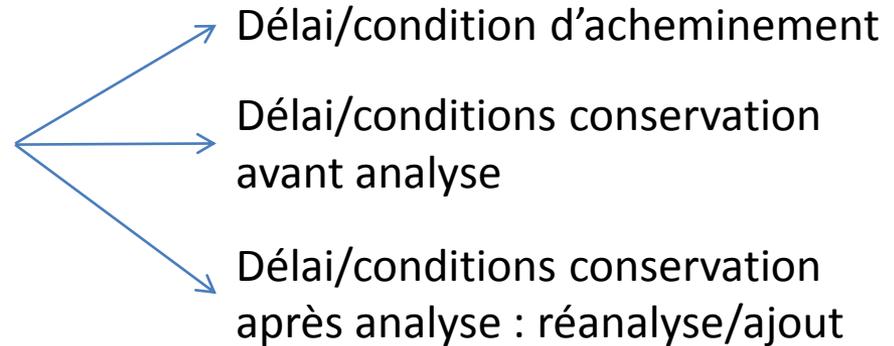


Laetitia Mauge  
AHU Service d'hématologie biologique de l'HEGP  
Groupe de travail pré-analytique du 24 septembre 2014

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Etat des lieux

Stabilité des paramètres de la coagulation



Recommandations du CLSI (2008)



- Données plus récentes avec des délais plus longs?
- Données complémentaires?



Recherche Medline : « coagulation factor & stability & testing » → septembre 2013

Assay	Stored as Whole Blood			Processed and Plasma Aliquoted			
	Room Temp	Refrigerated *	Frozen	Room Temp	Refrigerated	Frozen -20 °C**	Frozen -70 °C or colder**
PT	Up to 24 hr	Unacceptable	Unacceptable	Up to 24 hr	Unacceptable	2 wk	12 mo
APTT	Up to 4 hr	Unknown	Unacceptable	4 hr	4 hr	2 wk	12 mo
APTT-For UFH analysis	1 hr	Unknown	Unacceptable	4 hr	4 hr	*** 2 wk	*** Unknown
APTT-For VWF and VIII Analysis	4 hr	Unacceptable	Unacceptable	4 hr	4 hr	** 2 wk	** 6 mo
Other	4 hr	Unknown	Unacceptable	4 hr	4 hr	Depends on analyte; see Appendix B	

# Stabilité sur sang total à TA

Paramètre	Stabilité sur sang total à TA		
	Type d'échantillon	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
TP	sang total citraté	24h	au moins 24h [4] au moins 48h [6]
TCA	sang total citraté	4h	au moins 6h [7] au moins 8h [6] au moins 24h [4]
TT	sang total citraté	4h	
DD	sang total citraté	4h	au moins 24h [4,7]

Paramètre	Stabilité sur sang total à TA		
	Type d'échantillon	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
Antithrombine	sang total citraté	4h	au moins 48h (4)
Protéine C	sang total citraté	4h	au moins 48h (Ag et Act)(4)
Protéines S	sang total citraté	4h	au moins 8h (PS Ag) (4)
		4h	au moins 48h (PS libre) (4)

Paramètre	Stabilité sur sang total à TA		
	Type d'échantillon	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
TP-INR	sang total citraté	24h	au moins 24h [7] au moins 48h [5]
HNF	sang total citraté	1h	2h [8]
	sang total CTAD	4h	6h [8]
HBPM	sang total citraté	1h	au moins 4-6h [12]

Paramètre	Stabilité sur sang total à TA		
	Type d'échantillon	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
Fibrinogène	sang total citraté	24h	au moins 24h [7] au moins 48h [4]
FII	sang total citraté	4h	au moins 24h [5] au moins 48h [4]
FV	sang total citraté	4h	au moins 8h [4]
FVII	sang total citraté	4h	au moins 24h [4,5]
FX	sang total citraté	4h	au moins 24h [5] au moins 48h [4]
FVIII	sang total citraté	4h	au moins 4h [4]
FIX	sang total citraté	4h	au moins 24 [5] au moins 48h [4]
FXI	sang total citraté	4h	au moins 48h [4]
FXII	sang total citraté	4h	
VWF:Ag et Rco	sang total citraté	4h	au moins 48h [3]

# Stabilité sur plasma citraté à TA

Paramètre	Stabilité sur plasma citraté à TA		
	Type d'échantillon	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
TP	plasma citraté et CTAD	24h	au moins 24h [6,9,10] 8h [Stago]
TCA	plasma citraté et CTAD	4h	au moins 6h [9] au moins 8h [6,10]
TT	plasma citraté rebouché	4h	au moins 24h [10,11]
DD	plasma citraté rebouché	4h	au moins 24h [10,11]

>

>

Paramètre	Stabilité sur plasma citraté à TA		
	Type d'échantillon	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
Antithrombine	plasma citraté et CTAD	4h	au moins 24h (9,11) 8h (Stago)
Protéine C	plasma citraté	4h	8h (Act) (Stago) 6h (Ag) (Biomérieux)
Protéines S	plasma citraté	4h	4h (PS libre) (Stago) 8h (PS totale) (Stago)

>

>

>

Paramètre	Stabilité sur plasma citraté à TA		
	Type d'échantillon	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
HNF	plasma citraté	4h	au moins 6h [6]
HBPM	plasma citraté	4h	au moins 24h [12]

>

>

Paramètre	Stabilité sur plasma citraté à TA		
	Type d'échantillon	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
Fibrinogène	plasma citraté	4h	au moins 24h [9-11]
FII	plasma citraté et CTAD	4h	au moins 24h [9] 3h Siemens 4h Stago
FV	plasma citraté et CTAD	4h	au moins 24h [9] 3h [Siemens] 4h [Stago]
FVII	plasma citraté	4h	3h [Siemens] 4h [Stago]
FX	plasma CTAD	4h	au moins 24h [9] 3h [Siemens] 4h [Stago]
FVIII	plasma citraté	4h	8h [Siemens]
FIX	plasma citraté	4h	8h [Siemens]
FXI	plasma citraté	4h	8h [Siemens]
FXII	plasma citraté	4h	8h [Siemens]
VWF:Ag et Rco	plasma citraté	4h	6h

>

>

>

>

>

>

>

>

# Stabilité sur plasma citraté congelé

Paramètre	Stabilité sur plasma citraté congelé		
	Température de stockage	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
TP	<-20°C	2 semaines	16 mois [13]
	<-70°C	12 mois	au moins 24 mois [13]
TCA	<-20°C	2 semaines	12 mois [13]
	<-70°C	6 à 12 mois	au moins 24 mois [13]
TT	<-20°C	au moins 10 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	
DD	<-20°C	au moins 24 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	

>

>

Paramètre	Stabilité sur plasma citraté congelé		
	Température de stockage	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
Antithrombine	<-20°C	au moins 24 mois [12] 1 mois (Stago)	
	<-70°C	au moins 24 mois [12]	
Protéine C	<-20°C	au moins 24 mois (PC act) [12] 1 mois (Stago et Biomérieux)	
	<-70°C	au moins 24 mois (PC act) [12]	
Protéines S	<-20°C	au moins 12 mois (PS act) [12] 1 mois (PS totale et libre) (Stago)	
	<-70°C	au moins 18 mois [12]	

Paramètre	Stabilité sur plasma citraté congelé		
	Température de stockage	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
HBPM	<-20°C		au moins 24h [12]

Paramètre	Stabilité sur plasma citraté congelé		
	Température de stockage	CLSI H25-A5 [2]	Autres références
Fibrinogène	<-20°C	au moins 24 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	
FII	<-20°C	au moins 12 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	
FV	<-20°C	au moins 24 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	
FVII	<-20°C	au moins 6 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	
FX	<-20°C	au moins 4 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	
FVIII	<-20°C	au moins 6 mois [13]	
	<-70°C	au moins 18 mois [13]	
FIX	<-20°C	au moins 8 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	
FXI	<-20°C	au moins 6 mois [13]	
	<-70°C	au moins 18 mois [13]	
FXII	<-20°C	au moins 18 mois [13]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13]	
VWF:Ag et Rco	<-20°C	au moins 24 mois [13] [VWF:Ag]	
	<-70°C	au moins 24 mois [13] [VWF:Ag]	

>

>

1 seule étude !

**INFLUENCE DE LA CONGELATION A -35°C  
SUR LA STABILITE DES PARAMETRES DE LA  
COAGULATION**

# Méthodologie

## 1) Echantillons plasmatiques et contrôles:

- **Pool N** : 15 ml de sang sur tubes citratés 0,109M chez 6 sujets sains
- **Pool AVK** : plasma citraté de 12 patients sous AVK avec un INR entre 2,1 et 4,1
- **Déficients Dx** : plasma citraté de patients ayant présenté un déficit en FV, FVIII, FXI ou FVW (n=12)

### Congélation:

- Double centrifugation 15 min à 2000-2500g entre 18 et 22°C, selon les recommandations de l'ISTH
- Aliquotes de 500 µL
- Dans les 4 heures suivant le prélèvement

### Décongélation:

- 5 minutes à 37°C dans un bain-marie thermostaté
- Contrôles = plasmas humains lyophilisés de chez Asqualab :
  - Niveau haut : CO13 et CO15
  - Niveau bas : CO14 et CO16

# Méthodologie

## 2) Méthodes de dosage

Tests	Appareil de mesure	Principe de mesure	Nom des réactifs	Volume de plasma nécessaire (µl)
TP	STA-R	coagulation	STA néoplastine CI10	50
TCK	STA-R	coagulation	CK Prest 5	50
FIB	STA-R	coagulation	Dade thrombin reagent	5
FII	STA-R	coagulation	déficient Siemens+STA néoplastine CI10	5
FV	STA-R	coagulation	déficient Siemens+STA néoplastine CI10	5
FVII+X	STA-R	coagulation	déficient Hyphen+STA néoplastine CI10	5
FVIII	STA-R	coagulation	déficient Siemens+CK Prest 5	5
FIX	STA-R	coagulation	déficient Siemens+CK Prest 5	5
FXI	STA-R	coagulation	déficient Siemens+CK Prest 5	5
VWF activité	STA-R	immunoturbidimétrie	Von Willebrand Factor activity IL	25
PC activité anti-coagulante	STA-R	coagulation	cryocheck clot C (CLOT C)	5
PS activité anti-coagulante	STA-R	coagulation	Staclot Protein S(PS STA)	5
AT activité cofacteur de l'héparine	STA-R	colorimétrie	Stachrom AT III 6(AT3)	5

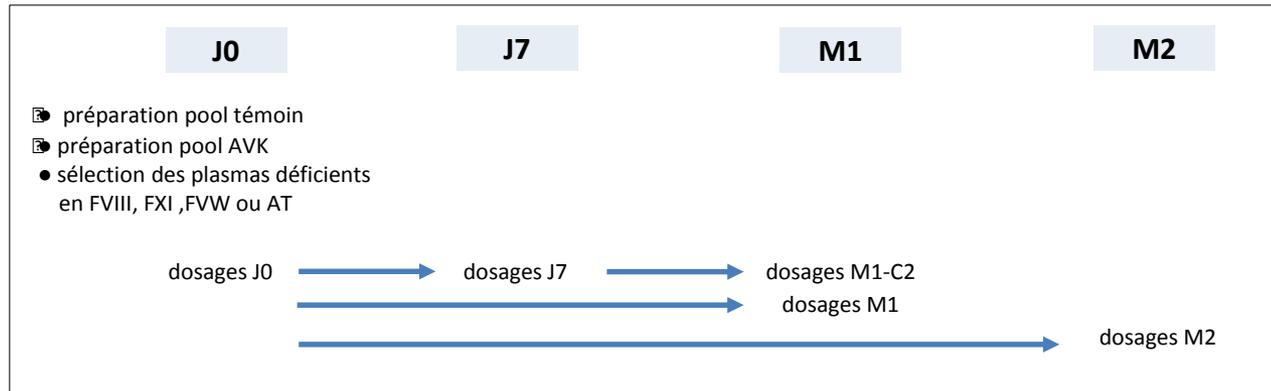
# Méthodologie

## 2) Méthodes de dosage

	Pool N	Pool AVK	Plasmas déficients individuels	Plasmas individuels
TP	x	x		
TCK	x	x		
FIB	x		D2, D11, D13	D4, D5, D6, D9, D10, D12, D14
FII	x	x		
FV	x	x	D4, D5, D12	D2, D10
FVII+X	x	x		
FVIII	x		D3	D1
FIX	x	x		
FXI	x		D10, D11	
VWF Act	x		D1, D3, D6	
PC Act	x	x		
PS Act	x	x		
AT Cof Hep	x		D9, D10, D11, D12, D14	

# Méthodologie

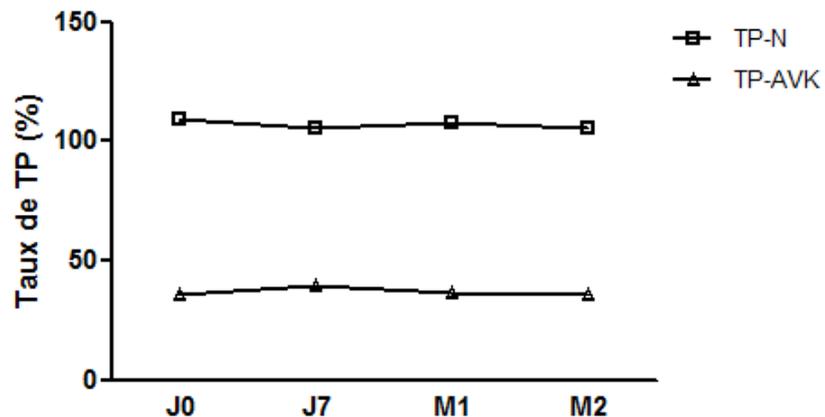
## 3) Schéma de l'étude



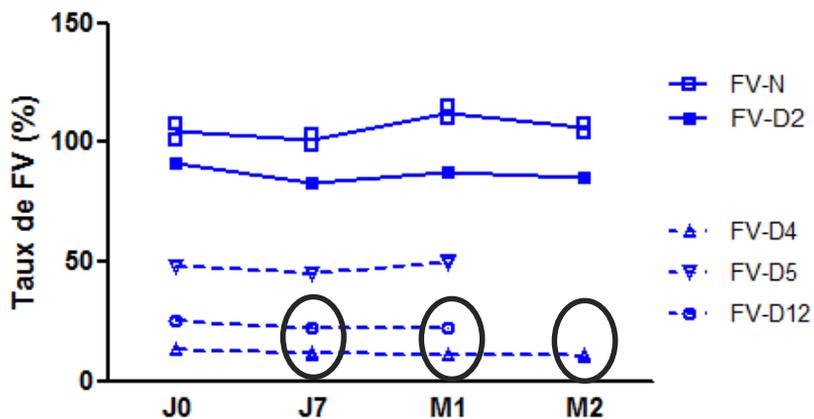
## 4) Analyse

- Observation graphique
- % de variation versus J0 (seuil à 10%)
- Biais versus J0 (seuil à 2,8xsd)
- Test statistique :
  - ANOVA pour le délai de conservation, post test de Dunn
  - Test de Wilcoxon pour le deuxième cycle de congélation/décongélation

# 1- Stabilité des paramètres à -35°C

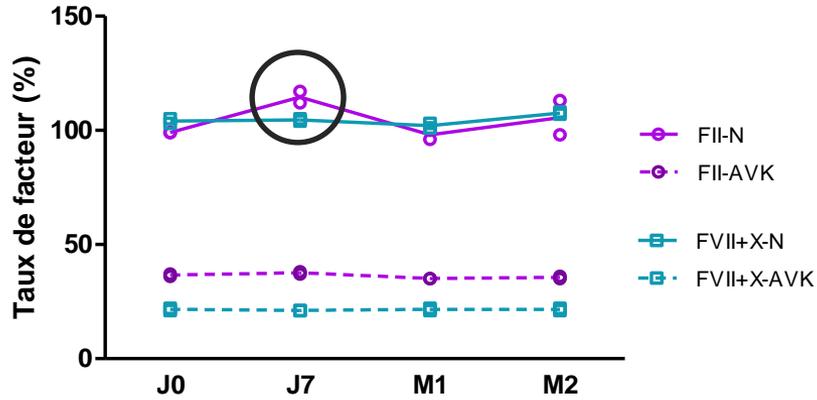


	% déviation versus J0 (* si ↓>10%)	biais versus J0 (* si ↓>2,8sd)	test de Dunn (* si p<0,05)	Conclusion
TP	<10%	<limite	NS	NS

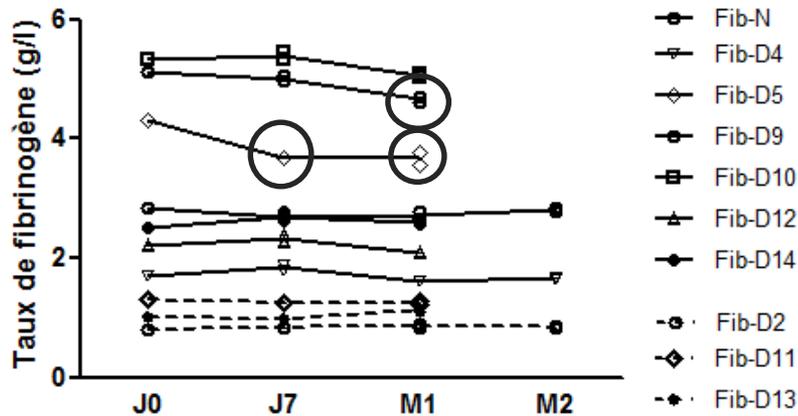


	% déviation versus J0 (* si ↓>10%)	biais versus J0 (* si ↓>2,8sd)	test de Dunn (* si p<0,05)	Conclusion
FV	D4/D12 J7-M1-M2	<limite	NS	NS

# 1- Stabilité des paramètres à -35°C

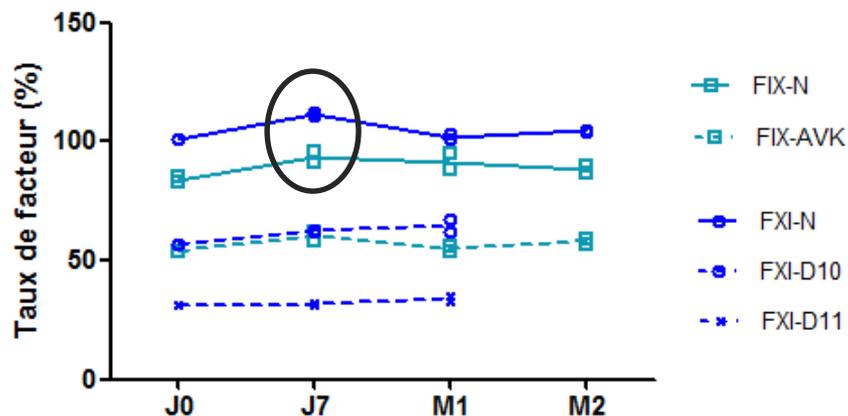


	% déviation versus J0 (* si ↓>10%)	biais versus J0 (* si ↓>2,8sd)	test de Dunn (* si p<0,05)	Conclusion
FII	N J7	N J7 (<7,3)	NS	NS
FVII+X	<10%	<limite	NS	NS

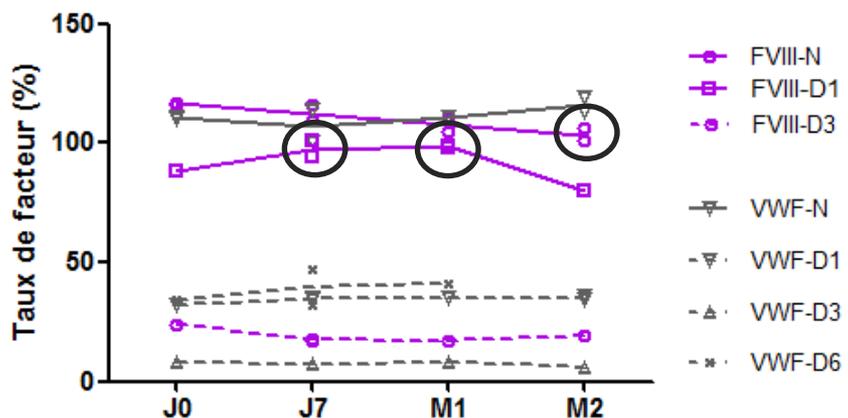


	% déviation versus J0 (* si ↓>10%)	biais versus J0 (* si ↓>2,8sd)	test de Dunn (* si p<0,05)	Conclusion
FIB	D5 J7-M1	D5 J7-M1, D9 M1	NS	NS --> voir à M2

# 1- Stabilité des paramètres à -35°C

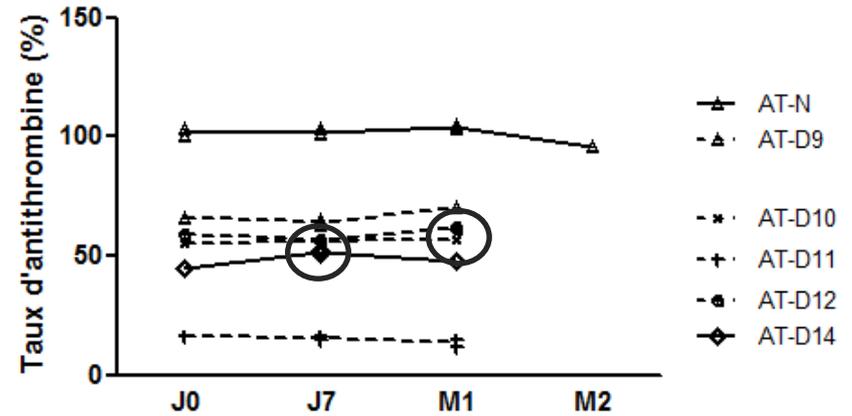
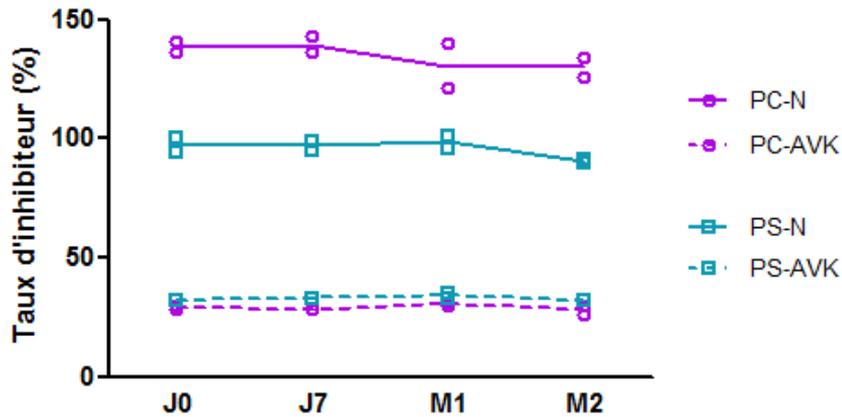


	% déviation versus J0 (* si ↓>10%)	biais versus J0 (* si ↓>2,8sd)	test de Dunn (* si p<0,05)	Conclusion
FIX	N J7, AVK J7	<limite	J7*	NS
FXI	N J7, D10 M1	<limite	NS	NS



	% déviation versus J0 (* si ↓>10%)	biais versus J0 (* si ↓>2,8sd)	test de Dunn (* si p<0,05)	Conclusion
FVIII	N M2, D3 J7-M1-M2 D1 J7-M1 ↑	N M2	NS	M2*--> voir à M3
VWF activité	D3 J7-M2 D6 J7-M1 ↑	<limite	NS	NS

# 1- Stabilité des paramètres à -35°C



	% déviation versus J0 (* si $\downarrow > 10\%$ )	biais versus J0 (* si $\downarrow > 2,8sd$ )	test de Dunn (* si $p < 0,05$ )	Conclusion
PC activité anti-coagulante	<10%	<limite	NS	NS
PS activité anti-coagulante	<10%	<limite	NS	NS
AT activité cofacteur de l'héparine	D11 M1 D14 J7 $\uparrow$	<limite	NS	NS

# 1- Stabilité des paramètres à -35°C

	% déviation versus J0 (* si ↓>10%)	biais versus J0 (* si ↓>2,8sd)	test de Dunn (* si p<0,05)	Conclusion
TP	<10%	<limite	NS	NS
TCK	<10%	N J7-M2 : 1,8 (<1,7)	NS	NS
FIB	D5 J7-M1	D5 J7-M1, D9 M1	NS	NS --> voir à M2
FII	N J7	N J7 (<7,3)	NS	NS
FV	D4/D12 J7-M1-M2	<limite	NS	NS
FVII+X	<10%	<limite	NS	NS
FVIII	N M2, D3 J7-M1-M2 D1 J7-M1	N M2	NS	M2*--> voir à M3
FIX	N J7, AVK J7	<limite	J7*	NS
FXI	N J7, D10 M1	<limite	NS	NS
VWF activité	D3 J7-M2 D6 J7-M1	<limite	NS	NS
PC activité anti-coagulante	<10%	<limite	NS	NS
PS activité anti-coagulante	<10%	<limite	NS	NS
AT activité cofacteur de l'héparine	D11 M1 D14 J7	<limite	NS	NS

## 2- Effet d'un deuxième cycle de congélation/décongélation

		Résultats des dosages			versus M1-C1		
		J0	M1	M1-C2	% de déviation	biais	test de Wilcoxon
TP	Pool N	107	107	102	-5,6	-6,0	NS
		112	109	102			
	Pool AVK	38	34	38	4,3	1,5	
		34	36	35			
TCK	Pool N	29,3	29,8	30,9	2,5	0,8	-
		29,3	30,7	31,1			
FIB	Pool N	2,83	2,78	2,77	-0,4	0,0	p=0,0228
		2,83	2,65	2,64			
	D4	1,7	1,62	1,62	0,0	0,0	
		-	1,62	1,62			
	D5	4,3	3,78	3,7	-0,1	0,0	
		-	3,57	3,64			
	D9	5,11	4,61	4,47	-4,1	-0,2	
		-	4,71	4,47			
	D10	5,34	5,03	5,03	-2,3	-0,1	
		-	5,09	4,86			
	D12	2,2	2,08	2,09	0,0	0,0	
		-	-	2,07			
	D14	2,5	2,57	2,57	-0,8	0,0	
		-	2,6	2,56			
D2	0,8	0,9	0,87	-1,2	0,0		
	0,8	0,83	0,84				
D11	1,3	1,22	1,25	2,8	0,0		
	-	1,27	1,31				
D13	1	1,15	1,08	-8,4	-0,1		
	-	1,11	0,99				
FII	Pool N	99	100	116	8,7	8,5	NS
		99	96	97			
	Pool AVK	36	35	35	0,0	0,0	
		37	35	35			
FV	Pool N	101	110	106	-4,0	-4,5	NS
		108	115	110			
	D2	91	90	90	2,9	2,5	
		-	85	90			
	D4	13	11	10	-9,1	-1,0	
		13	11	10			
D5	48	50	48	-4,0	-2,0		
	48	49	47				

## 2- Effet d'un deuxième cycle de congélation/décongélation

		Résultats des dosages			versus M1-C1			versus J0		
		J0	M1	M1-C2	% de déviation	biais	test de Wilcoxon	% de déviation	biais	test de Wilcoxon
FVII+X	Pool N	103	101	104	0,5	0,5	-			
		105	103	101						
	Pool AVK	22	21	21	-2,3	-0,5				
		21	22	21						
FVIII	Pool N	116	105	102	-3,7	-4,0	NS	-11,2	-13,0	p=0,0355
		117	110	105						
	D1	88	99	87	-16,2	-16,0				
	88	98	78							
	D3	24	17	18	5,9	1,0				
24	17	18								
FIX	Pool N	83	95	93	-0,5	-0,5	-			
		85	88	89						
	Pool AVK	54	54	53	-2,7	-1,5				
		54	56	54						
FXI	Pool N	101	103	104	-1,5	-1,5	NS			
		101	101	97						
	D10	57	67	60	-5,4	-3,5				
	57	62	62							
	D11	31	33	34	-2,9	-1,0				
31	35	32								
FW	Pool N	110	111	107	-3,6	-4,0	NS			
		111	x	x						
	D1	32	35	37	5,7	2,0				
	32	x	x							
	D3	8	8	11	37,5	3,0				
		8	x	x						
D6	34	41	39	-4,9	-2,0					
34	x	x								
PC	Pool N	141	140	123	-7,3	-9,5	-			
		136	121	119						
	Pool AVK	30	31	26	-8,2	-2,5				
		28	30	30						
PS	Pool N	94	101	96	-2,5	-2,5	-			
		100	96	96						
	Pool AVK	32	33	34	-1,5	-0,5				
		32	35	33						
AT	Pool N	103	105	105	0,5	0,5	p=0,0291			
		100	103	104						
	D9	66	70	71	0,0	0,0				
		66	70	69						
	D10	55	57	59	5,3	3,0				
		55	57	61						
	D11	16	15	14	0,0	0,0				
		16	12	13						
	D12	59	61	62	1,6	1,0				
59		62	63							
D14	45	48	49	4,2	2,0					
-	-	48	51							

# Conclusion

Peu de données sur l'influence de la congélation sur la stabilité des paramètres d'hémostase :

- Woodhams et coll. :
  - 18 paramètres
  - 2 ans à -24°C et -74°C
  - Plasmas issus de plasmaphérèse, sur citrate 0,129M
  - Centrifugation : 30 min, 1500g, 18°C
  - Décongélation : 15 min à 37°C
- Betsou et coll. :
  - Paramètres?
  - Plasmas de BTV à -80°C
  - Informations après 9 ans de conservation

## Etude de stabilité à l'HEGP :

- Bonne stabilité de la plupart des paramètres : FVIII? Point M3
- Pas d'influence d'une deuxième cycle de congélation/décongélation
- Étude des valeurs pathologiques
- Conditions de travail du laboratoire
- Congélation à -35°C



Poursuite sur 2 ans pour les pools