



Recommandations préanalytiques en hémostase : Stabilité des paramètres d'hémostase générale et délais de réalisation des examens

Mai 2017

Rédaction : Elodie Boissier, Leyla Calmette, Bénédicte Delahousse, Claire Flaujac, Marie Françoise Hurtaud-Roux, Laetitia Mauge

Le groupe de travail « préanalytique » du Groupe Français d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT) a analysé les données de la littérature (1998-2016) afin d'émettre des recommandations qui précisent, pour les examens d'hémostase générale, **les délais acceptables** entre le prélèvement de l'échantillon sanguin et l'exécution de l'examen **permettant d'assurer l'intégrité de l'analyte** à doser en fonction des conditions de conservation de l'échantillon.

Ces recommandations ont une répercussion non seulement sur les bonnes pratiques du laboratoire d'hémostase mais aussi sur **les recommandations que le laboratoire est tenu de donner à ses correspondants** pour le transport des échantillons en fonction des examens prescrits et **pour les délais d'ajout** d'un examen sur un échantillon déjà présent au laboratoire.

 Dans ce texte, les modalités générales de conservation des échantillons ont été rappelées. Les délais de stabilité en fonction des modalités de conservation ont été définis dans un deuxième temps, paramètre par paramètre. Plusieurs examens d'hémostase étant souvent réalisés sur un même tube, les délais et les températures de transport et de conservation d'un échantillon doivent être ceux du test global ou **de l'analyte à doser le moins stable**. De même, en cas de gestion de prélèvements en urgence, les délais de rendu de résultats doivent être conformes aux organisations localement mises en place et validés entre cliniciens et biologistes, en particulier pour les examens urgents, conformément à l'arrêté du 15 décembre 2016 [1], et/ou à celles proposées par la Société Française de Biologie Clinique [2]. **Ces délais de rendu de résultats en urgence restent conformes aux délais de conservation proposés par le GFHT.**

Les délais sur sang total, correspondent aux délais de réalisation de l'analyse depuis le prélèvement. Les délais sur plasma, correspondent aux délais de réalisation de l'analyse depuis le prélèvement pour des échantillons centrifugés rapidement, et au maximum dans les deux heures suivants le prélèvement.

1. Méthodologie employée

Un premier travail bibliographique a été réalisé en 2014 [3]. Il a été complété par une recherche bibliographique plus étendue, réalisée sur Pub Med-Medline. La base de données Medline a été interrogée avec les mots-clés **pre-analytical, storage, stability, temperature, frozen, freezing, time AND hemostasis parameters**, et les articles pertinents publiés entre 1998 et octobre 2016 ont été sélectionnés. Les communications affichées n'ont pas été retenues. Quarante-trois articles ont été analysés par le groupe de travail. Les critères d'analyses étaient les suivants :

- Type d'échantillon : sang total, plasma frais, plasma congelé
- Type d'anticoagulant : citrate 3,2% ou citrate 3,8% ou Citrate Théophylline Adénosine Dipyridamole (CTAD).
- Nombre d'échantillons testés et population étudiée (donneurs sains ou patients, traitements anticoagulants éventuels)
- Modalités d'acheminement des échantillons : transport, température
- Modalités de centrifugation
- Conditionnement pour la conservation : tube primaire ou plasma décanté, tube bouché ou non
- Température de conservation
- Méthodes d'analyses retenues par les auteurs : tests statistiques, impact clinique...

Ces données ont été analysées pour **6 paramètres d'hémostase générale** : Taux de Prothrombine (TP) et International Normalized Ratio (INR), Temps de Céphaline avec Activateur (TCA) ou TCA dans le cadre d'une surveillance des traitements par Héparine non fractionnée (HNF), fibrinogène, D-dimères, activité anti-Xa Héparine Non Fractionnée (anti-Xa HNF) et activité anti-Xa Héparine de Bas Poids Moléculaire (anti-Xa HBPM).

Le groupe de travail a choisi de présenter une revue des données bibliographiques dans un texte long présentant l'argumentaire des recommandations. Ces dernières sont regroupées dans un tableau de synthèse reprenant les 3 niveaux de recommandations retenues :

- **Recommandé** : données faisant **l'objet d'un consensus** après la lecture des différents articles ou, à défaut, reposant sur au moins un article pour lequel la méthodologie et les **critères d'interprétation sont solides et robustes (avis d'experts)**. Représentent les « règles de l'art ».

- **Acceptable** : données reposant sur une majorité d'articles ayant fait l'objet **d'interprétations variables selon les publications** ou, à défaut, un article pour lequel les critères d'interprétation ne sont pas aussi solides que dans la catégorie recommandée (exemple: effectif plus faible, méthodologie statistique utilisée, ...) (avis d'experts).
- **Non conforme** : données **non recommandées** faisant l'objet d'un consensus après la lecture des différents articles ou, à défaut, reposant sur au moins un article pour lequel la méthodologie et les critères d'interprétation sont solides et robustes (avis d'experts).

Pour la **durée de conservation des plasmas congelés**, les données peuvent être incomplètes ou absentes selon les paramètres ou les conditions. Nous avons donc ajouté une catégorie « **données insuffisantes ou absentes** », permettant ainsi à chaque laboratoire de mettre en place des essais s'il souhaite conserver les échantillons au-delà des délais validés par la littérature.

2. Modalités générales de conservation des échantillons

2.1. Modalités de conservation du sang total

Selon les dernières recommandations américaines (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI) et anglaises (British Committee for Standards in Haematology-BCSH), les échantillons sanguins doivent être idéalement acheminés au laboratoire **dans l'heure qui suit le prélèvement** [4, 5]. Cependant, les données de la littérature semblent en faveur d'une stabilité prolongée des paramètres de la coagulation. Le délai maximal avant analyse dépend de l'analyte dosé et de la température de conservation de l'échantillon.

Concernant la température de conservation du sang total, le CLSI recommande une **température ambiante**, proscrit le transport sur glace, et préconise d'éviter les températures extrêmes [4].

Cependant, un transport d'échantillons intersites peut conduire à une exposition des prélèvements à des températures ne correspondant pas à une définition de température ambiante, lors de périodes de grand froid ou de canicule, malgré les systèmes de transport utilisés actuellement. Comme l'ont montré Lippi et coll., il s'agit d'être attentif au maintien de la température lors du transport des échantillons et cela d'autant plus que les températures extérieures sont extrêmes [6].

Si des températures extrêmes de conservation ne semblent pas pouvoir être recommandées et en particulier les températures réfrigérées en raison d'une activation bien documentée de certains facteurs de la coagulation [7-9], elles sont cependant acceptables au cas par cas pour certains analytes. Ce point sera abordé individuellement dans les paragraphes suivants.

De manière générale, d'après l'ensemble des données consultées pour la rédaction de cette synthèse, **le transport et la conservation des échantillons de sang total destinés à l'hémostase doivent être effectués à température ambiante (entre +15°C et +25°C, selon la définition de la Pharmacopée Européenne [10]). Une température réfrigérée, entre +2°C et +8°C selon la Pharmacopée Européenne [10], ne sera acceptable qu'au cas par cas pour certains analytes.**

Synthèse

Le délai de conservation de l'échantillon de sang total dépend des analytes étudiés et de la température de conservation depuis le prélèvement.

L'échantillon de sang total est conservé dans le tube primaire bouché.

L'échantillon de sang total ne doit pas être congelé.

La température au cours du transport doit être maîtrisée. Le GFHT se positionne pour recommander une température ambiante définie selon la Pharmacopée Européenne entre +15°C et +25°C.

Le transport réfrigéré (entre +2°C et +8°C) des échantillons est de manière générale déconseillé.

2.2.Modalités de conservation du plasma frais

Selon le CLSI, les échantillons doivent être analysés le plus rapidement possible après centrifugation [4]. Dans l'attente de l'analyse, ils sont conservés bouchés. **Le délai maximal recommandé** entre le prélèvement et l'analyse est **de 4h pour la majorité des paramètres, sauf pour le TP et la surveillance des traitements par héparine non fractionnée par la mesure du TCA et/ou l'activité anti Xa.**

Comme nous le détaillerons pour chacun des paramètres, le délai acceptable de conservation du plasma après centrifugation et donc de réalisation de l'examen ou des groupes d'examens pourra être allongé selon les conditions de conservation du prélèvement. **Il est à noter que dans la majorité des études publiées, la stabilité des analytes dans le plasma a été évaluée après une centrifugation effectuée dans des délais courts après le prélèvement, allant de 30 minutes à moins de 2 heures après le prélèvement.**

Synthèse

Le délai de conservation de l'échantillon de plasma après centrifugation (http://site.geht.org/wp-content/uploads/2016/12/tableau-synthèse-GEHT2015_internet-v4.pdf), **dépend du délai depuis le prélèvement. Le délai de conservation indiqué pour le sang total n'est pas cumulable avec celui indiqué pour le plasma.**

De manière générale, le délai de conservation indiqué pour les plasmas doit faire l'objet d'une centrifugation de l'échantillon primaire le plus rapidement possible et d'une conservation du plasma à température ambiante (15-25°C). Certains analytes sont stables sur plasma conservé à des températures <+15°C et >+25 °C.

Les délais présentés pour le plasma dans le tableau de synthèse, correspondent à une centrifugation rapide et au maximum 2 heures après le prélèvement.

Certains analytes ont une durée de stabilité plus longue en plasma qu'en sang total, permettant une augmentation du délai de conservation.

Le plasma doit être conservé dans un tube bouché.

2.3.Modalités de conservation et de transport du plasma congelé

La stabilité des paramètres sur plasma congelé conditionne le délai de réalisation des analyses non urgentes faites en série, ce qui est rarement le cas des paramètres d'hémostase générale.

Le CLSI préconise **une double-centrifugation** de l'échantillon **avant congélation** du plasma [4]. Le GFHT a conservé cette préconisation lors de l'actualisation des recommandations en 2015 (http://site.geht.org/wp-content/uploads/2016/12/tableau-synthèse-GEHT2015_internet-v4.pdf).

Une étude suggère que l'utilisation de micro-tubes (volume < 2mL), avec un faible volume d'air résiduel et un bouchon à pas de vis (afin de limiter l'évaporation), permet une meilleure conservation du plasma à long terme (> 3 mois) [11].

La congélation doit être réalisée à la température à laquelle le plasma sera conservé par la suite. En effet, une température de -80°C uniquement pour la phase de congélation ne semble pas supérieure à une température de -20°C pour une conservation finale de l'échantillon à -20°C [11].

Le CLSI préconise une congélation à une température de -20°C (ou inférieure) pour une durée de conservation inférieure ou égale à 15 jours, et -70°C (ou inférieure) pour une durée de 6 à 12 mois (en fonction de l'analyte) [4]. Cependant, Woodhams et coll. rapportent une

stabilité plus longue pour la majorité des paramètres [11]. **Pour les conservations à long terme, une température inférieure ou égale à -70°C (\leq) permet une meilleure conservation des paramètres qu'une température inférieure ou égale à -20°C (\leq).**

Le congélateur ne doit pas disposer d'un système automatique de dégivrage (les cycles de températures lors des dégivrages génèrent des cycles de congélation-décongélation des échantillons, altérant significativement les facteurs de coagulation) [4].

Si les échantillons congelés sont transportés en carboglace, un passage de dioxyde de carbone (CO₂) peut se faire à l'intérieur du tube de congélation et entraîner une acidification du plasma avec pour conséquence un allongement des temps de coagulation. Ce phénomène s'observe davantage lorsque l'échantillon est ensuite conservé à une T° à -20°C plutôt qu'à -80°C. Un des moyens d'éviter l'acidification du plasma est de décongeler l'échantillon débouché, mais le risque d'une éventuelle contamination de l'aliquote de plasma n'est pas négligeable [9].

Synthèse

Après double-centrifugation (http://site.geht.org/wp-content/uploads/2016/12/tableau-synthèse-GEHT2015_internet-v4.pdf), l'échantillon est congelé directement à la température de conservation dans un tube secondaire. Une congélation rapide (en azote liquide ou à une T° \leq à -70°C) ne semble pas modifier la stabilité de la phase initiale de conservation par rapport à une congélation à -20°C.

En cas de conservation longue (> 3 mois), des tubes adaptés au volume de plasma congelé (permettant un volume d'air résiduel le plus faible possible) et des bouchons à pas de vis seront privilégiés.

Les deux délais maximaux de congélation ne doivent pas être cumulés (par exemple première congélation à T° \leq -20°C puis transfert à T° \leq -70°C).

Après un transport d'un aliquote congelé en carboglace, il est préférable de conserver cet aliquote à une température \leq -70°C, afin d'éviter une acidification du plasma.

2.4. Modalités de décongélation du plasma

Concernant la décongélation, le CLSI, comme d'autres auteurs, **préconise une incubation de l'aliquote en immersion dans un bain marie à eau à 37°C pendant la durée la plus courte possible permettant une décongélation totale de l'échantillon** [4, 12]. Celle-ci doit être adaptée au volume de l'échantillon congelé **mais ne doit pas dépasser 5 à 10 minutes** afin de ne pas altérer son intégrité [9, 13]. Dans tous les cas, il s'agit **uniquement d'une décongélation** du plasma **et non pas d'une remise à température ambiante et encore**

moins d'un réchauffement des plasmas afin de ne pas compromettre la qualité des protéines de la coagulation.

Après décongélation, l'aliquote doit être **agité doucement**, certaines protéines pouvant précipiter lors de la congélation. L'étude de Lima-Oliveira et coll. a montré récemment qu'il fallait probablement préférer une agitation douce **par retournements** à une agitation dans une roue tourne-tube ou un vortex, en particulier pour le fibrinogène [12]. L'absence d'agitation n'est pas recommandée.

Après décongélation, le plasma doit être analysé rapidement [4].

Synthèse

Le temps de décongélation dépend du volume de l'aliquote (exemple 4 minutes pour 1 ml), mais ne doit pas excéder 10 minutes.

Après décongélation, une homogénéisation par retournements doux est préférable à une absence d'homogénéisation ou une agitation par roue-tourne-tube ou vortex.

Après décongélation, l'analyse doit être réalisée rapidement.

Aucun test fonctionnel d'hémostase ne pourra être réalisé sur du plasma recongelé.

3. Délai de conservation des paramètres d'hémostase

La stabilité des paramètres en sang total conditionne les délais optimaux et tolérables d'acheminement des échantillons au laboratoire. Des délais courts sont une limite à la prise en charge des prélèvements provenant de sites extérieurs, voire de prélèvements sur site. Dans les recommandations américaines (CLSI), les délais maximaux de conservation en sang total à température ambiante sont de 4 heures après le prélèvement pour de nombreux tests, exceptés pour la mesure du taux de prothrombine et de l'héparinémie [4].

La stabilité des paramètres en plasma citraté conservé à température ambiante conditionne le délai de réalisation de l'analyse après centrifugation du sang total, ainsi que la possibilité de vérification ou de rajout d'analyse complémentaire. Pour le CLSI, les délais de conservation du plasma à température ambiante sont limités à 4 heures après le prélèvement pour de nombreux paramètres de la coagulation, sauf le TP [4].

La stabilité des paramètres sur plasma congelé conditionne le délai de réalisation des analyses non urgentes faites en série (étude des inhibiteurs de la coagulation, par exemple).

Les recommandations du CLSI sont basées sur un travail réalisé par Woodhams et coll., qui ont testé deux températures de conservation : -20°C et -70°C [11]. Les délais indiqués sont compatibles avec les exigences des laboratoires en termes de délai de rendu de résultats.

3.1. Taux de prothrombine et INR

Pour le **TP/INR**, les recommandations du CLSI préconisent un délai maximal de conservation **de 24 heures sur sang total ou sur plasma**, en tube bouché, **à température ambiante** [4]. Pour cet examen, le délai maximal de conservation du plasma congelé recommandé est de 2 semaines à au moins -20°C et de 12 mois à au moins -70°C.

a. Stabilité en sang total

L'une des indications principales de réalisation du TP/INR étant la surveillance des traitements par AVK, l'analyse de la littérature a tenu compte des études réalisées chez les sujets sains mais aussi de celles réalisées chez les patients sous AVK.

Sur les 7 études publiées après l'année 2000 et portant sur la stabilité du TP/INR sur sang total [14-20], 5 rapportent une stabilité du TP/INR jusqu'à 24 heures pour une conservation du prélèvement en sang total à température ambiante [14-18].

Cinq études se sont intéressées à une population de patients sous AVK [14, 17-20]. Christensen et coll. ont montré, sur un nombre significatif d'échantillons (141) provenant de 24 patients sous AVK, une stabilité des INR après conservation sur sang total à température ambiante (entre +20 et +24°C) jusqu'à 24 heures après le prélèvement, les INR variant de $\pm 0,3$ pour 94% des échantillons [14]. Salvagno et coll. ont montré des résultats comparables sur 26 échantillons de patients traités par AVK : il existait une différence statistiquement significative du TP après conservation des échantillons 24 heures à température ambiante ($p < 0,05$), mais les biais étaient cliniquement non pertinents ($< 2\%$, biais acceptable par Ricos) [19]. Pour ces mêmes échantillons conservés à +4°C, le TP était stable jusqu'à 6 heures après le prélèvement, des différences cliniquement significatives survenaient au-delà de 24 heures (biais $> 2\%$).

L'étude de Zürcher et coll. est intéressante car elle prend en compte la réalité des conditions pré-analytiques qui existent dans un laboratoire de biologie médicale [17]. Cette étude porte sur 59 patients, dont 12 étaient sous AVK. Le transport des prélèvements était assuré par des pneumatiques, à température ambiante, tenant compte ainsi des variations de température entre l'été et l'hiver. Les prélèvements étaient ensuite conservés à une température ambiante maîtrisée (entre +20°C et +25°C). Aucune variation significative du TP

liée au transport n'était observée que ce soit pendant l'hiver ou pendant l'été. Les échantillons ont été étudiés après différents temps de conservation (<1 heure, 4-6, 8-12, 24-28, 48-52 heures). A partir d'une conservation pendant 24 heures à température ambiante, une diminution statistiquement significative du TP était observée, mais sans impact clinique (<10% de variation par rapport à la valeur initiale). La diminution du TP était liée à une diminution des taux des facteurs V et VII, significative à partir de 24 heures (>10%). Aucune diminution statistiquement significative n'était observée pour les résultats des TP des patients sous AVK, jusqu'à 24-28 heures après le prélèvement.

Les résultats des publications récentes confirment ainsi ceux des publications antérieures [21-23]. Seule l'étude de van Geest-Daalderop et coll. montre une stabilité du TP/INR inférieure, jusqu'à 6 heures après le prélèvement, quelle que soit la température de conservation (ambiante/+4°C) [20]. L'impact est jugé cliniquement significatif à partir de 24 heures, plus de 25% des échantillons ayant des variations de plus de 10% par rapport aux valeurs initiales réalisées entre 0,5 et 1 heure après le prélèvement.

La nature du tube de prélèvement ne semble pas influencer la stabilité du TP, comme l'a démontré l'étude de Toulon et coll. [24]. Le TP est stable au moins jusqu'à 6 heures, à température ambiante, tant sur des tubes pour adultes que sur des tubes à vide partiel.

L'influence de la température de conservation sur la stabilité du TP a été étudiée plus particulièrement par 7 équipes [8, 15, 16, 19-22]. Les résultats sont en faveur d'une stabilité du prélèvement à +4°C, mais limitée dans le temps, <24 heures dans la plupart des études. Une conservation du prélèvement à 37°C est déconseillée. L'équipe de van Geest-Daalderop observe sur des échantillons exposés à 37°C, sur une durée de 3 heures après le prélèvement, des différences significatives, plus de 25% des échantillons ayant des variations de plus de 10% du TP/INR par rapport aux valeurs initiales réalisées entre 0,5 et 1 heure après le prélèvement [20].

Après analyse de ces différentes études, **le GFHT recommande pour le TP une conservation des échantillons sur sang total à température ambiante jusqu'à 24 heures, seulement si un TP/INR est réalisé, sans rajout des facteurs de la voie exogène.** Une exposition du prélèvement pendant une durée inférieure à 4 heures à une température descendant jusqu'à +4°C ou jusqu'à 2 heures pour des températures comprises entre 25°C et 30°C, est acceptable uniquement si seul un TP/INR est mesuré, sans exploration des facteurs de la voie exogène. **Une conservation à des températures extrêmes (<+4°C ou >30°C) est non conforme.**

b. Stabilité en plasma frais après centrifugation

La majorité des travaux rapportés dans la littérature ont été réalisés sur des plasmas décantés après centrifugation [21, 25, 26]. Seule une équipe rapporte des études réalisées à partir de plasmas non décantés, le plasma restant en contact avec le culot cellulaire [23]. Les résultats sur plasmas décantés et non décantés sont comparables.

Seule une étude s'est intéressée à des plasmas pathologiques: patients sous AVK ou cirrhotiques [25]. Les autres études ont été réalisées sur des plasmas dont le TP était normal [21, 23, 27].

Les différentes études rapportent une stabilité du TP jusqu'à 24 heures sur plasma, décanté ou non. Des variations statistiquement significatives sont néanmoins observées ($p < 0.05$), mais elles sont sans impact clinique (moins de 10 à 15% de variation par rapport à la valeur initiale).

L'équipe de Saghir et coll. montre une diminution de la stabilité en fonction de la température de conservation des plasmas [26]. Pour une différence jugée hautement significative ($p < 0.001$), les échantillons sont stables jusqu'à 24 heures à température ambiante et jusqu'à 8 heures à $+4^{\circ}\text{C}$. Une conservation sur une durée de 4 heures à $+4^{\circ}\text{C}$ montre une différence significative mais de moindre importance ($p < 0.05$).

Le GFHT recommande la réalisation du TP sur le plasma, décanté ou non, dans les 24 heures après le prélèvement, en l'absence d'exploration des facteurs de la voie exogène. **Une conservation à température ambiante est recommandée.** Une exposition à une température réfrigérée ($2-8^{\circ}\text{C}$) n'est acceptable que sur un temps court (< 4 heures) sans exploration des facteurs de la voie exogène. Pour des températures entre 25°C et 30°C , la conservation ne doit pas excéder 2 heures. **Une conservation à des températures extrêmes ($< + 2^{\circ}\text{C}$ ou $> 30^{\circ}\text{C}$) est non conforme.**

c. Stabilité en plasma conservé en aliquote congelé

Peu d'études se sont intéressées à l'effet d'une congélation à long terme sur le TP.

Le CLSI recommande une conservation maximale du plasma congelé de 2 semaines à au moins -20°C et de 12 mois à au moins -70°C [4].

Six études ont étudié la stabilité du TP/INR après congélation [11, 28-32]. Seuls Alesci et coll. déconseillent la réalisation d'un TP sur un plasma congelé tant à -20°C qu'à -70°C [28], en raison de variations statistiquement significatives ($p < 0.05$), mais l'impact clinique n'est pas rapporté par les auteurs.

Concernant la congélation à au moins -70°C, une équipe a étudié l'impact sur le TP d'une congélation d'une durée de 9 ans montrant une variation significative des résultats ($p < 0.05$) [29]. Van den Besselaar et coll. montrent une stabilité de l'INR après une congélation à -70°C pendant au moins 3 ans [32].

Concernant la congélation à au moins -20°C, Foshat et coll. ont observé une stabilité du TP d'au moins 2 semaines sur des échantillons normaux et de patients sous AVK [30].

Dans l'étude de Woodhams et coll., la stabilité du TP sur un plasma conservé à -24°C était de 16 mois en micro-tube contre 12 mois en tube classique pour un seuil de variation du TP de 10% [11]. La stabilité du TP sur un plasma conservé à -74°C était d'au moins 24 mois en micro-tube.

Le GFHT recommande de ne pas congeler un plasma pour la réalisation d'un TP, les stabilités sur sang total ou plasma étant longues. Néanmoins, une conservation du plasma congelé sur une durée de 4 semaines à au moins -20°C et de 3 ans à au moins -70°C est acceptable. Au-delà de 3 ans, il n'y a pas suffisamment de données pour apporter une recommandation fiable.

Synthèse

- Sur sang total ou plasma, décanté ou non, conservé à température ambiante, le délai maximal **recommandé** pour réaliser un TP/INR est de 24 heures sans dosage de facteurs de la coagulation.
- Au-delà de 24 heures à température ambiante, l'échantillon est déclaré **non conforme**.
- Une exposition du sang total ou du plasma, décanté ou non, à une température réfrigérée est **acceptable** sur une durée <4 heures, si le TP/INR est réalisé seul, sans rajout de facteurs de la coagulation.
- Une conservation à des températures comprises entre +25 et +30°C est **acceptable** sur une durée ≤ 2 heures, si le TP/INR est réalisé seul, sans rajout de facteurs de la coagulation.
- Une conservation à une température <T° réfrigérée ou >+30°C est **non conforme**.
- Une congélation de l'échantillon pour réalisation du TP/INR est **acceptable** : il peut être congelé à une température $\leq -20^\circ\text{C}$ pendant 4 semaines ou $\leq -70^\circ\text{C}$ pendant au moins 3 ans, si l'échantillon est décanté dans les 4 heures après le prélèvement.

Ces délais maximaux de conservation ne doivent pas être cumulés.

3.2. Temps de céphaline avec activateur (hors surveillance de l'héparine non fractionnée)

Les recommandations du CLSI précisent que le TCA est stable 4 heures après le prélèvement en sang total à température ambiante et que les échantillons de plasmas peuvent être conservés jusqu'à 2 semaines dans un congélateur à au moins -20°C ou 6 à 12 mois à au moins -70°C [4].

a. Stabilité en sang total

Trois études ont observé une stabilité du TCA jusqu'à 18 heures [21] ou 24 heures [16, 17] en sang total à température ambiante. Cinq autres études ont rapporté une stabilité du TCA de 6 à 8 heures dans ces mêmes conditions [19, 22, 24, 33, 34]. Quatre d'entre elles observaient une variation significative du TCA 24 heures après le prélèvement [19, 22, 33, 34]. Ces études n'ont pas utilisé les mêmes critères d'acceptation de la variation du TCA et l'interprétation des résultats ne tenait pas toujours compte de la variation moyenne d'une condition mais aussi des variations maximales observées pour cette même condition. Les études n'ayant pas retenu une stabilité de 24 heures se sont basées sur des tests statistiques type ANOVA [24, 34] ou sur des biais $\leq 5,3\%$ de variation [19, 33] et non sur un seuil de variation de 10% [17] ou 15% [22]. Ceci ne suffit pas à expliquer les différences de stabilité observées puisque l'étude de van Balveren et coll., tout en se basant sur un pourcentage de variation $\leq 4,5\%$ observe une stabilité du TCA pour une conservation de 24 heures après le prélèvement [16]. Le type d'échantillon testé et les réactifs utilisés pour le TCA, connus pour leur hétérogénéité de sensibilité aux déficits en facteurs de la voie endogène, peuvent également contribuer à ces différences de résultats. Par ailleurs, l'étude de Kim et coll. a rapporté une stabilité du TCA de 6 heures sur la base d'un test de Student significatif à 24 heures [34]. Une variation supérieure à 10% sur les prélèvements conservés pendant 24 heures était également rapportée pour 7 échantillons sur 64. L'étude d'Adcock et coll. a conclu à une stabilité du TCA de 8 heures et non de 24 heures car, bien que les variations moyennes étaient acceptables, des variations maximales observées pour certains groupes de sujets étaient $\geq 15\%$ [22]. Il faut noter par ailleurs qu'aucune de ces études n'a testé des délais intermédiaires de conservation entre 8h et 18h pour le sang total.

Une conservation du sang total à température réfrigérée ne semble pas altérer la stabilité du TCA. Bien qu'à la différence des prélèvements conservés à température ambiante, le TCA ne soit plus stable après 24h de conservation à +4°C dans l'étude de Van Balveren et coll. [16], les délais de stabilité observés dans les autres études ayant testé la conservation du prélèvement à cette température ne diffèrent pas de ceux observés pour la conservation à température ambiante [17, 19, 21, 22, 33, 34]. Zurcher et coll. se sont intéressés à l'effet de températures extrêmes auxquelles les échantillons peuvent être exposés pendant le

transport en hiver ou en été [17]. Aucune variation significative de la stabilité du TCA n'a été rapportée 24 heures après le prélèvement, que ce soit en hiver (n=49 patients, température : 2°C/-12°C) ou en été (n=10, température +11-+29°C). Van Balveren et coll. ont montré une stabilité du TCA d'au moins 8 heures après une conservation du sang total à +30°C [16]. Cependant, en cas d'allongement du TCA, des examens complémentaires pourront être réalisés tels que le dosage du facteur VIII. Or, le taux de ce facteur diminue significativement en quelques heures lors de la conservation des échantillons à température réfrigérée [7, 8, 35]. A noter que les conditions de centrifugation utilisées dans l'étude de Bohm et coll. (40 minutes de centrifugation à +4°C [7]) étaient différentes des conditions actuellement préconisées [4].

Le GFHT a donc choisi, comme pour les autres paramètres, de recommander le transport à température ambiante pour le TCA afin de limiter les diagnostics erronés d'allongement du TCA résultant d'une conservation de l'échantillon à température réfrigérée.

Comme mentionné dans les recommandations les plus récentes [4, 9, 13], **le GFHT recommande un délai de 4 heures entre le prélèvement, conservé à température ambiante, et la mesure du TCA si une exploration de la voie endogène est envisagée. Une durée de 6 heures est acceptée en l'absence d'exploration des facteurs de la voie endogène.** Compte tenu de la divergence des données pour un délai de 24 heures et du faible nombre d'études pour des délais de conservation intermédiaires, **un délai de conservation de plus de 6 heures et 4 heures si dosages des facteurs de la voie endogène n'est pas recommandé.**

b. Stabilité en plasma frais après centrifugation

Une étude de Saghir et coll. rapporte une stabilité inférieure à 6 heures, mais l'analyse était basée uniquement sur un test de Student pour comparer les résultats entre les mesures faites 1 heure et 6 heures après le prélèvement [26]. L'impact clinique de cette différence statistiquement significative n'a pas été évalué. En revanche, au moins 5 études ont observé une stabilité du TCA après conservation du plasma à température ambiante pendant 6 heures [33], 8 heures [15, 22, 23, 27], voire même 12 heures après le prélèvement [21]. A noter que le délai de 12 heures entre le prélèvement et l'analyse n'avait pas été retenu dans l'étude de Feng et coll. comprenant 72 échantillons, la variation du TCA étant $\geq 10\%$ [27]. Dans les études citées précédemment, c'est principalement un seuil de variation $\leq 10\%$ qui a été appliqué. Le délai de conservation du TCA sur plasma semble donc dans l'ensemble comparable à celui observé en sang total pour ce paramètre. Il faut noter que les délais de conservation du TCA testés sur des plasmas conservés dans le tube primaire bouché [15, 22, 23] ou sur des plasmas décantés conservés en aliquotes [21, 27] sont comparables.

Plusieurs études se sont intéressées à la stabilité du TCA sur du plasma conservé à +4°C [15, 21, 22, 26, 27] et une étude à +6°C, celle de Heil et coll. [23]. Seule l'étude de Saghir et coll., basée sur un test de Student apparié, rapporte une stabilité de 2 heures [26] alors que les autres équipes rapportent une stabilité plus longue du TCA : au moins 8 heures [15, 22, 23], voire même 12 heures pour Rao et Feng [21, 27]. La conservation à 12 heures n'avait pas été testée par les études concluant à une stabilité du TCA de 8 heures à +4°C. Bien que la conservation du plasma à +4°C n'a pas d'effet démontré sur la stabilité du facteur Willebrand et donc du facteur VIII, contrairement au sang total [7], **le GFHT recommande une conservation à température ambiante des échantillons de plasmas destinés à la réalisation d'un TCA.**

Afin de pouvoir explorer un éventuel allongement du TCA, le GFHT recommande un délai de conservation du plasma à température ambiante de 4 heures depuis le prélèvement. En l'absence de données précises sur les délais avant centrifugation des plasmas, **un délai maximum de conservation du plasma à température ambiante de 8 heures est acceptable en l'absence de dosage des facteurs de la voie endogène.** Ces recommandations sont valables pour les plasmas décantés ou non après centrifugation.

c. Stabilité en plasma conservé en aliquote congelé

❖ Influence de la congélation/décongélation sur les dosages :

Dans l'étude de Rao et coll., le TCA sur plasma congelé, même pendant un temps court (6 heures), apparaît significativement différent du TCA réalisé sur plasma frais [21]. **La congélation semble donc en soi impacter le TCA.** Cependant, la méthode statistique utilisée était une analyse de variance par le test Fisher et l'impact clinique de cet allongement du TCA lors de la congélation n'a pas été étudié. De la même manière, l'étude d'Alesci et coll. observe une variation significative du TCA après congélation du plasma pendant 1 mois (premier temps testé de l'étude) en utilisant le test de Wilcoxon [28]. Cependant, les variations observées étaient toutes <10%.

❖ Influence de la durée et de la température de congélation sur les dosages

Cinq études ont été menées sur la stabilité du TCA après congélation [11, 28-31]. L'étude de Woodhams, sur laquelle s'est basée le CLSI pour les recommandations de délai de conservation des plasmas congelés, a été réalisée sur du plasma obtenu par plasmaphérèse en CTAD à partir de 6 donneurs, permettant ainsi de tester chaque condition de congélation sur environ 100 échantillons, soit 5 points par durée de conservation [11]. Les autres études ont été réalisées à partir de prélèvements citratés, avec préparation et congélation des plasmas dans les conditions des laboratoires réalisant les études.

En dehors d'Alesci et coll., pour qui aucune congélation du TCA n'est acceptable [28], d'autres études ont observé que le TCA était stable au moins 2 semaines lorsque le plasma était conservé à une température d'au moins -20°C [30] et jusqu'à 12 mois à -24°C [11]. Ces deux études ont utilisé un seuil de variation de 10% comme seuil de pertinence clinique, contrairement à l'étude d'Alesci et coll. qui s'est basée sur le test statistique de Wilcoxon.

Quand le plasma est conservé à une température d'au moins -70°C, les études ont montré une stabilité d'au moins 1 semaine [31] à au moins 24 mois [11]. De manière générale, il y a peu d'études et aucune évaluation intermédiaire entre 1 semaine et 24 mois. Une étude a évalué la conservation des plasmas jusqu'à 9 ans et a montré un allongement des temps de coagulation par le test de Wilcoxon [29]. L'impact clinique de cette variation n'a pas été évalué et aucune évaluation intermédiaire de la stabilité des plasmas entre T0 et 9 ans de conservation à -80°C n'a été réalisée. Une congélation à une $T^{\circ} \leq -70^{\circ}\text{C}$ et une validation de la stabilité du TCA pour des durées de conservation supérieures à 24 mois sont donc préférables.

Dans un contexte de recherche d'une maladie hémorragique, **il est recommandé de réaliser le TCA sur le plasma frais en première intention.**

Le TCA est également un des tests recommandé pour la recherche d'anticoagulant circulant (ACC) de type lupique. Dans ce contexte, tous les réactifs de TCA n'ont pas la même sensibilité pour la mise en évidence d'un ACC de type lupique et il se peut que le réactif utilisé pour les TCA de « routine » dans le laboratoire ne soit pas le réactif le plus approprié. Pour la recherche d'ACC de type lupique, le TCA peut alors être réalisé sur plasma congelé. **Il conviendra de veiller à ce que les éléments d'interprétation (temps témoin principalement) soient cohérents avec cette pratique, les temps témoin du TCA sur plasma congelé pouvant être différents de ceux obtenus sur plasma frais.**

Compte-tenu des données bibliographiques, **la réalisation d'un TCA sur un plasma congelé est acceptable jusqu'à 12 mois à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ou jusqu'à 24 mois à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$.**

3.3. Temps de céphaline avec activateur pour la surveillance de l'héparine non fractionnée

Le pré-analytique du suivi de l'héparine non fractionnée (HNF) est particulièrement délicat en raison d'une possible neutralisation de l'héparine par le facteur 4 plaquettaire (FP4) relargué par les granules alpha des plaquettes, pouvant induire une sous-estimation de l'activité anticoagulante. Certains réactifs utilisés dans les laboratoires pour la mesure de

l'activité anti-Xa contiennent du dextran. Ce dextran pourrait permettre de dissocier l'héparine liée au PF4 [36]. A notre connaissance, il n'est pas fait mention de présence de dextran dans les notices des réactifs de TCA. De plus, peu de nouvelles études ont été effectuées pour étudier la stabilité du TCA pour le suivi de l'HNF en sang total et en plasma. De ce fait, notre revue bibliographique repose principalement sur des textes de recommandations et d'avis d'experts.

a. Stabilité en sang total et plasma frais après centrifugation

Pour le suivi d'un traitement HNF par le TCA, la plupart des références bibliographiques rapporte une stabilité de l'échantillon d'une heure en sang total en tube citraté et préconise une centrifugation rapide de l'échantillon [4, 9, 13]. Favarolo et coll. déconseillent le transport de l'échantillon en sang total à température réfrigérée [13].

Sur la base des résultats de leur étude sur tube citraté, Adcock et coll. recommandent que l'échantillon soit centrifugé rapidement et analysé dans l'heure qui suit le prélèvement si le plasma est conservé à température ambiante ou dans les 4 heures qui suivent le prélèvement s'il est conservé à température réfrigérée [9]. L'étude de Heil montre une stabilité du plasma non décanté allant jusqu'à 8 heures quand l'échantillon est conservé à température réfrigérée [23]. Le relargage de FP4 (Facteur Plaquettaire 4) semble être réduit quand le plasma est conservé à température réfrigérée [22, 23]. Dans les 2 études, le plasma était conservé dans le tube primaire [22].

Le CLSI ne rapporte pas de différence de stabilité entre une conservation à température ambiante et à température réfrigérée [4]. Il préconise une centrifugation de l'échantillon prélevé sur tube citraté dans l'heure qui suit le prélèvement et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures après le prélèvement si le plasma, décanté ou non, est conservé à température ambiante ou à température réfrigérée [4]. Favarolo et coll. recommandent également une centrifugation de l'échantillon prélevé sur tube citraté dans l'heure qui suit le prélèvement et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures après le prélèvement si le plasma est conservé à température ambiante [13]. Selon Rowan, l'analyse doit être réalisée dans les 2 heures suivant le prélèvement sur tube citraté, sans donner de précisions sur le délai de centrifugation [37]. L'étude de Ray, quant à elle, a comparé des délais de 30 minutes et 110 minutes entre le prélèvement en tube citraté et la centrifugation et retrouve une différence significative (test de Wilcoxon) entre les deux TCA chez 44 patients recevant de l'HNF [38]. Cette différence médiane de l'ordre de -2,7% (-5,7 ; 1,9) était sans impact clinique mais corrélée à des modifications du même ordre de l'activité anti-Xa HNF.

Pour le CSLI, si l'échantillon ne peut être centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement, l'utilisation de tubes CTAD est préconisée permettant ainsi la réalisation de l'analyse dans les 4 à 6 heures après le prélèvement [4, 37]. Le CTAD, en inhibant l'activation plaquettaire, permet de minimiser le relargage de FP4 qui neutralise l'activité de l'héparine non fractionnée en s'y liant. L'étude de Ray, qui a comparé deux délais de centrifugations (30 et 110 minutes), ne retrouve pas de différence significative sur les mesure du TCA ou de l'activité anti-Xa HNF sur tube CTAD, mais ces deux paramètres sont significativement plus bas si on les compare à celles obtenues sur tubes citratés prélevés et centrifugés dans les mêmes conditions [38]. D'après la même étude, le PF4 neutralisant une partie de l'activité de l'héparine est surtout liée à l'activation plaquettaire lors de la réalisation du prélèvement plus qu'au mode de transport.

b. Stabilité en plasma conservé en aliquote congelé

Le CLSI accepte une congélation de l'échantillon à au moins -20°C pendant 2 semaines si l'échantillon est centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement et si le plasma est décanté dans les 4 heures après le prélèvement [4].

Synthèse

TCA sans héparine non fractionnée (HNF):

En cas de dosage des facteurs de la voie endogène, un prélèvement peut être conservé jusqu'à 4 heures après le prélèvement (conservation à température ambiante). En considérant un délai moyen de centrifugation du plasma 2 heures après le prélèvement, le plasma peut alors être conservé 2 heures à température ambiante ou 4 heures en sang total.

En l'absence de dosage des facteurs de la voie endogène, un prélèvement peut être conservé jusqu'à 6 heures après le prélèvement (conservation à température ambiante) en sang total ou 8 heures en plasma.

Il est possible de conserver le plasma à une température ≤ -20 °C jusqu'à 12 mois et ≤ -70 °C jusqu'à 2 ans s'il est décanté et congelé dans les 4 heures après le prélèvement.

Suivi d'un traitement par héparine non fractionnée par le TCA (suivi HNF) :

1) **Tube citraté :** l'échantillon, conservé à température ambiante, doit être centrifugé et l'analyse réalisée dans les deux heures qui suivent le prélèvement.

La centrifugation dans l'heure suivant le prélèvement suivi d'une conservation à température réfrigérée permet la réalisation du TCA de suivi d'une HNF jusqu'à 4 heures après le prélèvement.

L'échantillon peut être congelé à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ pendant 2 semaines si l'échantillon est centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement et si le plasma est décanté dans les 4 heures après le prélèvement.

2) **Tube CTAD** : centrifugation et réalisation de l'analyse recommandées dans les 6 heures après le prélèvement conservé à température ambiante.

Pas de données concernant la stabilité de l'échantillon congelé à une $T^{\circ} \leq -20^{\circ}\text{C}$ ou $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Ces délais maximaux de conservation ne doivent pas être cumulés.

3.4. Fibrinogène

a. Stabilité en sang total

Pour le fibrinogène, le CLSI et le BCSH préconisent un délai maximal de conservation sur sang total de 4 heures, à $18-25^{\circ}\text{C}$ [4, 5]. Plusieurs études récentes (50 à 150 échantillons étudiés) rapportent une stabilité (biais moyen inférieur à 10%, cliniquement non significatif d'après les auteurs) **de 24 heures du fibrinogène sur sang total à température ambiante [16-18, 34] et à des températures extrêmes de $+4^{\circ}\text{C}$ à $+30^{\circ}\text{C}$ [16, 19]**. Une seule étude rapporte une stabilité prolongée jusqu'à 48 à 52 heures [17].

b. Stabilité en plasma frais après centrifugation

Sur plasma, le délai maximum de conservation selon le CLSI est de 4 heures, à $18-25^{\circ}\text{C}$ ou $2-4^{\circ}\text{C}$ [4]. Mais 3 études, portant sur 40 à 80 échantillons, retrouvent une stabilité (biais moyen inférieur à 10%, cliniquement non significatif d'après les auteurs) **de 24 heures du fibrinogène sur plasma conservé à température ambiante [15, 23, 27, 34]**. Dans ces études, l'échantillon était centrifugé « immédiatement » après le prélèvement puis conservé en tube primaire bouché. Trois articles démontrent même l'absence d'impact sur le fibrinogène d'un plasma conservé 24 heures à $4-6^{\circ}\text{C}$ [15, 23, 27]. Aucune étude n'a évalué l'impact d'une conservation du plasma à des températures supérieures à 25°C .

c. Stabilité en plasma conservé en aliquote congelé

Après congélation, la durée maximale de conservation préconisée par le CLSI est de 24 mois, à -24°C et à -74°C [4]. Cependant, cette recommandation repose sur la seule étude de Woodhams et coll. [11], réalisée sur un faible nombre d'échantillons ($n=6$) avec des valeurs physiologiques. Depuis, seulement 3 articles étudiant la stabilité du fibrinogène sur plasma congelé ont été publiés, avec de nombreuses limites : effectifs faibles et/ou échantillons constitués par des pools de plasma et/ou absence de valeur pathologique et/ou durée de

conservation courte [28, 31, 39]. Le seul autre article sur la conservation à -20°C rapporte une stabilité d'au moins 4 mois (durée maximale étudiée) pour 16 échantillons [28]. Pour la conservation à -70°C, Lewis et coll. et Woodhams et coll. s'accordent sur une durée d'au moins 24 mois [11, 39].

Synthèse

Pour le dosage du fibrinogène, le sang total et le plasma peuvent être conservés jusqu'à 24 heures après le prélèvement à température ambiante.

Une conservation à des températures de + 4°C à + 30 °C semble acceptable pour le sang total et entre + 4°C à + 25 °C pour le plasma.

Sur plasma décanté, le fibrinogène est stable jusqu'à 24 mois à une température inférieure ou égale à -20°C.

Sur plasma décanté, le fibrinogène est stable jusqu'à 24 mois à une température inférieure ou égale à -70°C.

Ces délais maximaux de conservation ne doivent pas être cumulés.

3.5.D-dimères

Les recommandations américaines pour le « dosage des D-dimères dans le cadre de l'exclusion de la Maladie Thromboembolique Veineuse », publiées en 2011 précisent que les **D-dimères sont stables 24 heures en sang total à température ambiante ou dans un réfrigérateur et que les échantillons de plasmas peuvent être conservés 2 ans dans un congélateur à -24° ou -74°C** [40]. Elles conseillent d'autre part de suivre les recommandations du fabricant des trousse de dosages pour la réalisation du prélèvement et sa conservation. Ces recommandations sont basées sur des travaux publiés avant 2011 que nous avons revus et auxquels nous ajoutons des publications postérieures dans l'analyse rapportée ci-dessous.

Les recommandations fabricants concernant la conservation des échantillons pour les principales trousse de dosages utilisées en France sont résumées dans le tableau 1.

Tableau -1 :

Recommandations fabricants pour la stabilité des D-dimères dans les échantillons	
Echantillons «frais »	Plasmas congelés

	+15 à +25°C	+2 à +8°C	- 20°C à -30°C	- 70 °C
Biomérieux Vidas D-dimer Exclusion II DEX2®		Plasma séparé du culot 3 jours tubes bouchés	6 mois si congélation immédiate après centrifugation et décantation 2 cycles de congélation/décongélation acceptables	
Stago STA-Liatest DDI ou DDI plus®	Plasma (sans précision si décanté ou non) 8 heures		1 mois	
Werfen D-dimer HS500®	Suivre les recommandations du CLSI ou du GFHT			
Siemens Innovance D-Di®	Plasma (sans précision si décanté ou non) 4 heures	Plasma (sans précision si décanté ou non) 24 heures	4 semaines si échantillons congelés <4h après prélèvement	

a. Stabilité en sang total

Une stabilité des D-dimères de 24 heures en sang total, à température ambiante ou comprise entre +4 et +8°C, est rapportée dans la littérature par de nombreux auteurs.

Luddington R. et coll. en 1997 rapportent une stabilité des D-dimères jusqu'à 24 heures à température ambiante alors qu'une augmentation significative des valeurs dosées 48 heures après le prélèvement est observée témoignant d'une activation de la coagulation et de la fibrinolyse dans les échantillons conservés au-delà de 24 heures [41]. Successivement, Caliezi et coll. en 2000 [42], Zurcher et coll. en 2008 [17], Salvagno et coll. en 2009 [19], Kemkes-Matthes et coll. en 2011 [18] et Zhao et coll. en 2013 [15] confirment la stabilité des D-dimères en sang total pendant 24 heures à température ambiante ou comprise entre +4 et +8°C. Toutes ces études ont la même approche statistique d'analyse des données avec une comparaison entre les valeurs mesurées aux différents temps de conservation et la valeur initiale par une analyse de variance et/ou de biais. A laquelle s'ajoute une analyse d'impact clinique avec un seuil de signification défini pour des différences $\geq 10\%$ ou $\geq 15\%$ pour une seule étude [18].

L'étude de Zurcher et coll. retrouve une augmentation significative des valeurs des D-dimères 48 heures après le prélèvement [17], comme rapportée par Luddington et coll.

[41]. Dans l'étude de Zurcher et coll., une analyse de concordance a été effectuée sur les échantillons ayant une valeur de D-dimères située dans la zone décisionnelle d'exclusion de la MTEV qui retrouve 2% de faux positifs et 9% de faux négatifs (inférieur au seuil de 500 ng/ml) quand le dosage est effectué 2 jours après le prélèvement par rapport au dosage effectué immédiatement après le prélèvement [17].

Van Balveren et coll. ont une approche différente d'analyse des données, basée sur l'erreur total admissible (TEa) qui tient compte de la fidélité intermédiaire et du biais ($TE = \text{biais}\% + 1,96XCV$) de la méthode de dosage des D-dimères (Ricos 2014 28%) [16]. Leur étude met en évidence une TE >28% dès 4 heures après le prélèvement dans les échantillons conservés en sang total à 20°C et ayant des valeurs normales de D-dimères. Cependant, la TEa est inférieure à 28% 6 heures et 8 heures après le prélèvement. Les auteurs concluent que les prélèvements conservés à 20°C peuvent être acceptés jusqu'à 8 heures après le prélèvement ce qui est conforme aux recommandations allemandes [43].

b. Stabilité en plasma frais après centrifugation

Une seule étude s'est intéressée à la stabilité des D-dimères dans le plasma. Les tubes primaires étaient centrifugés 2 heures après le prélèvement et conservés 4 heures dans les tubes primaires après centrifugation à température ambiante puis entre +4°C et +8°C [44]. Aucune variation significative de la valeur des D-dimères n'a été observée après 6 heures à température ambiante, ni après 24 heures supplémentaires entre +4°C et +8°C.

Compte tenu du manque de données, le GFHT ne se prononce pas sur la stabilité de ce paramètre en plasma et conseille de se référer aux recommandations données par le fournisseur.

c. Stabilité en plasma conservé en aliquote congelé

❖ Influence de la congélation/décongélation sur les dosages :

Deux études démontrent qu'il n'existe **aucune influence d'un cycle de congélation/décongélation** sur les dosages de D-dimères lorsque les aliquotes de plasmas sont conservés à des températures égales à -60°C ou plus basses pendant 1 à 2 semaines [41, 44].

❖ Influence de la durée et de la température de congélation sur les dosages

Les études de Woodhams et coll. et de Lewis et coll. publiées en 2001 démontrent une **stabilité des D-dimères dans les plasmas congelés pendant au moins 24 mois à -24°C et à -74°C [11]** et d'au moins 23 mois à -70°C [39].

Peu d'études se sont intéressées à une conservation des échantillons congelés au-delà de 24 mois. Böhm-Weigert et coll. rapportent une stabilité des D-dimères dans les échantillons congelés à **-60°C ou plus bas** pendant toute la durée de leur observation qui a été de **36 mois** [44]. Betsou et coll. en 2009 semblent montrer que les dosages de D-dimères sont stables au moins 9 ans sur des plasmas congelés à -80°C [29]. Mais les données sur ce paramètre sont insuffisantes pour assurer qu'il n'y a pas de variation avec impact clinique, en particulier dans la zone décisionnelle pour la MTEV. Il n'y pas eu de points intermédiaires d'évaluation entre T0 et 9 mois.

Synthèse :

Les D-dimères ont une **stabilité recommandée en sang total** de 24 heures à température ambiante.

Une conservation du sang total 24 heures à température réfrigérée est acceptable.

En l'absence de données bibliographiques, il est conseillé de se référer aux données fournisseurs pour la stabilité sur plasma.

Les D-dimères ont une stabilité en aliquotes de **plasma congelé** d'au moins 24 mois à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et d'au moins 36 mois à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Ces délais maximaux de conservation ne doivent pas être cumulés.

3.6. Activité anti-Xa héparine non fractionnée et héparine de bas poids moléculaire

Le pré-analytique du suivi de l'héparine non fractionnée est particulièrement délicat en raison d'une possible neutralisation de l'héparine par le PF4 (platelet factor 4) relargué par les granules alpha plaquettaires, pouvant induire une sous-estimation de l'activité anticoagulante. Certains réactifs utilisés dans les laboratoires pour la mesure de l'activité anti-Xa contiennent du dextran. Ce dextran pourrait permettre de dissocier l'héparine liée au PF4 et ainsi d'allonger les délais de réalisation, mais il n'existe pas ou peu de publications évaluant cet effet, qui par ailleurs ne semble pas convenir à toutes les situations cliniques comme le suggère les publications de Mouton et coll. et Ignjatovic et coll. [36, 45]. Le dextran pourrait aussi déplacer l'héparine liée à d'autres molécules que le PF4. Par ailleurs, peu d'études récentes ont été effectuées pour étudier la stabilité de l'activité anti-Xa pour le suivi de l'HNF en sang total et en plasma. De ce fait, notre revue bibliographique repose principalement sur des textes de recommandations et des avis d'experts.

3.6.1. *Activité anti-Xa héparine non fractionnée (HNF)*

a. Stabilité en sang total et plasma frais après centrifugation

Pour le suivi d'un traitement HNF avec l'activité anti-Xa, Favarolo et Adcock rapportent une stabilité de l'échantillon d'une heure en sang total en tube citraté et préconise une centrifugation rapide de l'échantillon [9, 13].

Pour le suivi d'un traitement HNF par mesure de l'activité anti-Xa, sur la base des résultats de leur étude sur tube citraté, Adcock et coll. recommandent que l'échantillon soit centrifugé rapidement (sans décantation) et analysé dans l'heure qui suit le prélèvement, si le plasma est conservé à température ambiante, **ou dans les 4 heures qui suivent le prélèvement, s'il est conservé à température réfrigérée** [22].

Le relargage de PF4 semble être réduit quand le plasma est conservé à 4°C [22]. Selon Rowan, le résultat doit être **rendu dans les 2 heures** qui suivent le prélèvement sur tube citraté sans précision de température de conservation [37]. Guder et coll. recommandent la réalisation de l'activité anti-Xa HNF dans les 4 heures qui suivent le prélèvement sur tube citraté conservé à température ambiante mais sans détailler s'il s'agit de données obtenues à partir d'un réactif contenant du dextran ou non [43]. L'étude de Ray a comparé des délais de 30 minutes et 110 minutes entre le prélèvement sur des tubes citratés et la centrifugation, et retrouve une différence significative (test de Wilcoxon) entre les deux TCA chez 44 patients [38]. Mais cette différence médiane de l'ordre de -2,7% (-5,7 ; 1,9) était sans impact clinique mais confortée par des modifications du même ordre de l'activité anti-Xa HNF (réactif Rotachrom STAGO ne contenant pas dextran).

Si le prélèvement ne peut être centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement, Rowan **préconise l'utilisation de tubes CTAD** qui permettent de rendre le résultat d'activité anti-Xa HNF **dans les 4 à 6 heures après le prélèvement** [37], le CTAD permettant de minimiser l'activation plaquettaire et le relargage des PF4. En revanche, il n'est pas mentionné de température de conservation la plus appropriée. L'étude de Ray, qui a comparé deux délais de centrifugation (30 et 110 minutes), ne retrouve pas de différence significative sur les mesures du TCA ou de l'anti-Xa HNF sur tube CTAD [38]. Mais ces deux paramètres sont significativement plus hauts si on les compare avec des tubes citratés prélevés et centrifugés dans les mêmes conditions, ce qui confirme bien l'hypothèse d'une préservation de l'intégrité plaquettaire et d'une diminution du PF4 avec l'utilisation des tubes CTAD. D'après la même étude, l'origine du PF4 neutralisant une partie de l'activité de l'héparine est surtout liée à l'activation plaquettaire lors de la réalisation du prélèvement plus qu'au mode de transport.

Le GFHT préconise une réalisation de la mesure de l'activité anti-Xa HNF le plus rapidement possible après le prélèvement s'il s'agit d'un tube citraté (dans les deux heures) et pouvant être étendue à 6 heures pour les tubes CTAD. Si le tube est centrifugé dans l'heure suivant le prélèvement, le délai de réalisation en plasma peut être prolongé jusqu'à 4 heures après le prélèvement (conservé à température ambiante ou réfrigérée). Les données sont insuffisantes pour proposer une stabilité au-delà de 2 heures en sang total citraté ou en plasma préparé plus d'une heure après le prélèvement. L'impact des réactifs avec et sans dextran sur la stabilité de la mesure de l'héparinémie dans le temps reste à évaluer.

b. Stabilité en plasma conservé en aliquote congelé

Les données de la littérature sont peu nombreuses concernant la stabilité de l'activité anti-Xa HNF sur plasma congelé.

L'étude de Gosselin et coll. montre **que l'échantillon peut être congelé à -70°C jusqu'à une semaine s'il a été centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement** [31].

3.6.2. Activité anti-Xa héparine de bas poids moléculaire (HBPM)

a. Stabilité en sang total et plasma frais après centrifugation

Le pré-analytique du suivi des HBPM est moins délicat que celui des HNF puisqu'il existe une moindre liaison au PF4 et donc de ce fait un moindre risque de sous-estimation des concentrations plasmatiques lors des dosages. Cette diminution d'affinité est principalement dépendante de la taille des HBPM et de leurs structures (groupements sulfates) [44].

Les données de la littérature pour évaluer la stabilité des mesures d'anti-Xa HBPM sont peu nombreuses et les recommandations des experts sont également basées sur ces mêmes études.

L'étude de Birri et coll. a observé **un délai maximum de conservation de 6 heures après le prélèvement si l'échantillon de sang total est conservé à température ambiante**, et de 24 heures après le prélèvement si l'échantillon est centrifugé, décanté et aliquoté dans des tubes bouchés et mesuré par un réactif anti-Xa (Biophen héparin 6, Hyphen Biomed contenant du dextran) [46]. C'est principalement cette étude qui est citée dans les recommandations d'Adcock et coll. [9].

L'étude de Rojnuckarin et coll. a étudié l'activité anti-Xa HBPM de 86 échantillons de plasmas centrifugés dans les 4 heures après le prélèvement, non décantés et conservés entre 24°C et 30°C [47]. Cette équipe a retrouvé une augmentation de l'activité anti-Xa HBPM 24h après le

prélèvement dans plus de la moitié des échantillons (68,6%), une stabilité chez 17,4% et une diminution chez 14%. Ces variations sont plus importantes sur les prélèvements pédiatriques par rapport aux prélèvements adultes. La mesure de l'activité anti-Xa était réalisée avec le kit Berichrom (Dade Behring) contenant du dextran et de l'antithrombine et il n'y avait pas de point intermédiaire entre le point T0 et la mesure à 24 heures.

Le GFHT préconise une réalisation de la mesure de l'activité anti-Xa HBPM dans les 6 heures suivant le prélèvement. Les données sont insuffisantes ou contradictoires pour étendre la stabilité à 24 heures. L'impact des réactifs avec et sans dextran reste à évaluer.

b. Stabilité en plasma conservé en aliquote congelé

Les données de la littérature sont également peu nombreuses concernant la stabilité de l'activité anti-Xa HBPM sur plasma congelé.

L'étude de Gosselin et coll. montre que **l'échantillon peut être congelé à -70°C sans modification significative des résultats jusqu'à une semaine** sans préciser le délai de conservation avant centrifugation de l'échantillon [31].

Pour Birri et coll. la congélation du plasma à **-20 °C pendant 24 heures** montre une sous-estimation de l'activité anti-Xa HBPM mais sans relevance clinique [46].

L'étude de Rojnuckarin et coll. montre des variations (à la hausse dans la majorité des cas) et non prévisibles de l'activité anti-Xa HBPM après congélation à -70 °C, sur des aliquotes conservés pendant des durées variables (non précisées dans l'étude) mais pouvant être supérieures à 6 mois [47]. Les dosages ont été effectués avec le réactif Berichrom Heparin contenant du dextran et de l'antithrombine (Dade Behring).

Synthèse

Héparine non fractionnée (activité anti-Xa HNF) :

1) Tube citraté : idéalement, l'échantillon doit être centrifugé et analysé dans l'heure qui suit le prélèvement.

Le délai de réalisation de l'activité anti-Xa HNF reste acceptable jusqu'à 2 heures après le prélèvement si l'échantillon en sang total est conservé à température ambiante.

Le délai de réalisation de l'activité anti-Xa HNF reste acceptable jusqu'à 4 heures après le prélèvement, si l'échantillon est centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement et si le plasma, décanté ou non, est conservé à température ambiante ou à température réfrigérée.

Pas de données bibliographiques concernant la stabilité en plasma si la centrifugation est réalisée au-delà de deux heures après le prélèvement.

Pas de données bibliographiques comparatives concernant la stabilité en fonction de la présence de dextran dans le réactif de mesure de l'activité anti-Xa.

Il est possible de conserver le plasma à une température ≤ -70 °C jusqu'à 1 semaine si le prélèvement est centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement.

2) Tube CTAD : centrifugation et réalisation de l'analyse dans les 6 heures après le prélèvement, si l'échantillon a été conservé à température ambiante.

Pas de données bibliographiques concernant la stabilité en sang total et en plasma à température ambiante au-delà de 6 heures et à température réfrigérée.

Pas de données concernant la stabilité de l'échantillon congelé à des températures ≤ -20 °C ou ≤ -70 °C.

Héparine de bas poids moléculaire (activité anti-Xa HBPM) :

Le délai de réalisation de l'activité anti-Xa HBPM reste acceptable jusqu'à 6 heures après le prélèvement si l'échantillon en sang total ou plasma est conservé à température ambiante.

Données de stabilité insuffisantes au-delà de 6 heures.

Pas de données bibliographiques comparatives concernant la stabilité en fonction de la présence de dextran dans le réactif de mesure de l'activité anti-Xa.

Pas de données concernant la stabilité en tube CTAD.

Il est possible de conserver le plasma jusqu'à 24 heures à une température ≤ -20 °C si le prélèvement est centrifugé, décanté et congelé moins de 4 heures après le prélèvement ou au moins 1 semaine à une température ≤ -70 °C.

Ces délais maximaux de conservation ne doivent pas être cumulés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arrêté du 15 décembre 2016 déterminant la liste des examens réputés urgents ainsi que les conditions de réalisation et de rendu des résultats de ces examens. Journal Officiel de la République Française; NOR : AFSP1637323A; 2016. p. 1.
2. Vaubourdolle M, Alvarez JC, Barbe F, Beaudeau JL, Boissier E, Caillon H, et al. [SFBC guidelines on critical care testing]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2016;**74**:130-55.
3. Mauge L, Alhenc-Gelas M. [Stability of coagulation parameters: review of available data]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2014;**72**:141-5.
4. Clinical and laboratory standards institute. Collection t, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays ; approved guideline. 5e édition. CLSI Document H21-A5. ed. Wayne : PCaLSI, 2008.
5. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol* 2011;**155**:30-44.
6. Lippi G, Lima-Oliveira G, Nazer SC, Moreira ML, Souza RF, Salvagno GL, et al. Suitability of a transport box for blood sample shipment over a long period. *Clin Biochem* 2011;**44**:1028-9.
7. Bohm M, Taschner S, Kretzschmar E, Gerlach R, Favalaro EJ, Scharrer I. Cold storage of citrated whole blood induces drastic time-dependent losses in factor VIII and von Willebrand factor: potential for misdiagnosis of haemophilia and von Willebrand disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006;**17**:39-45.
8. Refaai MA, Van Cott EM, Lukoszyk M, Hughes J, Eby CS. Loss of factor VIII and von Willebrand factor activities during cold storage of whole blood is reversed by rewarming. *Lab Hematol* 2006;**12**:99-102.
9. Adcock DM, Favalaro EJ, Lippi G. Critical pre-examination variables in the hemostasis laboratory and their quality indicators. *Clin Biochem* 2016.
10. Pharmacopée européenne, Edition 8.0 (en ligne).
11. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;**12**:229-36.
12. Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, Favalaro EJ, Lippi G. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: Is any technique better than another? *Clin Biochem* 2016.
13. Favalaro EJ, Adcock, D. M., Lippi, G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Labmedicine* 2012;**43**:1-10.
14. Christensen TD, Jensen C, Larsen TB, Maegaard M, Christiansen K, Sorensen B. International Normalized Ratio (INR), coagulation factor activities and calibrated automated thrombin generation - influence of 24 h storage at ambient temperature. *Int J Lab Hematol* 2010;**32**:206-14.
15. Zhao Y, Lv G. Influence of temperature and storage duration on measurement of activated partial thromboplastin time, D-dimers, fibrinogen, prothrombin time and thrombin time, in citrate-anticoagulated whole blood specimens. *Int J Lab Hematol* 2013;**35**:566-70.
16. van Balveren JA, Huijskens MJ, Gemen EF, Pequeriaux NC, Kusters R. Effects of time and temperature on 48 routine chemistry, haematology and coagulation analytes in whole blood samples. *Ann Clin Biochem* 2016.
17. Zurcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lammle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 2008;**99**:416-26.
18. Kemkes-Matthes B, Fischer R, Peetz D. Influence of 8 and 24-h storage of whole blood at ambient temperature on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, thrombin time, antithrombin and D-dimer. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011;**22**:215-20.
19. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2009;**31**:462-7.

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**:561-8.
21. Rao LV, Okorodudu AO, Petersen JR, Elghetany MT. Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time tests under different storage conditions. *Clin Chim Acta* 2000;**300**:13-21.
22. Adcock D, Kressin D, Marlar RA. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;**9**:463-70.
23. Heil W, Grunewald R, Amend M, Heins M. Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma. *Clin Chem Lab Med* 1998;**36**:459-62.
24. Toulon P, Abecassis L, Smahi M, Ternisien C. Monitoring treatments with unfractionated heparin: CTAD must be used instead of citrate as the anticoagulant solution when using partial-draw collection tubes. Results of a multicenter evaluation. *Thromb Res* 2010;**126**:536-42.
25. Awad MA, Selim TE, Al-Sabbagh FA. Influence of storage time and temperature on international normalized ratio (INR) levels and plasma activities of vitamin K dependent clotting factors. *Hematology* 2004;**9**:333-7.
26. Mohammed Saghir SA, Al-Hassan FM, Alsalahi OS, Abdul Manaf FS, Baqir HS. Optimization of the storage conditions for coagulation screening tests. *J Coll Physicians Surg Pak* 2012;**22**:294-7.
27. Feng L, Zhao Y, Zhao H, Shao Z. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep* 2014;**4**:3868.
28. Alesci S, Borggrefe M, Dempfle CE. Effect of freezing method and storage at -20 degrees C and -70 degrees C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. *Thromb Res* 2009;**124**:121-6.
29. Betsou F, Roussel B, Guillaume N, Lefrere JJ. Long-term stability of coagulation variables: Protein S as a biomarker for preanalytical storage-related variations in human plasma. *Thromb Haemost* 2009;**101**:1172-5.
30. Foshat M, Bates S, Russo W, Huerta A, Albright K, Giddings K, et al. Effect of freezing plasma at -20 degrees C for 2 weeks on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, dilute Russell viper venom time, activated protein C resistance, and D-dimer levels. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015;**21**:41-7.
31. Gosselin RC, Dwyre DW. Determining the effect of freezing on coagulation testing: comparison of results between fresh and once frozen-thawed plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015;**26**:69-74.
32. van den Besselaar AM, Witteveen E, van der Meer FJ. Long-term stability of frozen pooled plasmas stored at -70 degrees C, -40 degrees C, and -20 degrees C for prothrombin time and International Normalized Ratio (INR) assessment. *Thromb Res* 2013;**131**:349-51.
33. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem* 2012;**45**:464-9.
34. Kim H, Kim Y, Lee HK. Influence of Preanalytical Variables on Prothrombin Time, Activated Partial Thromboplastin Time, and Fibrinogen. *Clin Lab* 2015;**61**:1337-40.
35. Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Potential laboratory misdiagnosis of hemophilia and von Willebrand disorder owing to cold activation of blood samples for testing. *Am J Clin Pathol* 2004;**122**:686-92.
36. Mouton C, Calderon J, Janvier G, Vergnes MC. Dextran sulfate included in factor Xa assay reagent overestimates heparin activity in patients after heparin reversal by protamine. *Thromb Res* 2003;**111**:273-9.
37. Martin Rowan R, van Assendelft, O. W., Eric Preston F. *Advanced Laboratory Methods In Haematology*. 1st ed. London: Edward Arnold 2001.
38. Ray M. Stability of the activated partial thromboplastin time used to monitor unfractionated heparin. *J Thromb Haemost* 2008;**6**:1817-9.
39. Lewis MR, Callas PW, Jenny NS, Tracy RP. Longitudinal stability of coagulation, fibrinolysis, and inflammation factors in stored plasma samples. *Thromb Haemost* 2001;**86**:1495-500.

40. Clinical and laboratory standards institute. Quantitative D-dimer for the exclusion of venous thromboembolic disease ; approved guideline. 1^e édition. CLSI Document H59-A. ed. Wayne : PCaLSI.
41. Luddington R, Peters J, Baker P, Baglin T. The effect of delayed analysis or freeze-thawing on the measurement of natural anticoagulants, resistance to activated protein C and markers of activation of the haemostatic system. *Thromb Res* 1997;**87**:577-81.
42. Caliezi C, Reber G, Lammle B, de Moerloose P, Wuillemin WA. Agreement of D-dimer results measured by a rapid ELISA (VIDAS) before and after storage during 24h or transportation of the original whole blood samples. *Thromb Haemost* 2000;**83**:177-8.
43. Guder WG FG dF-WF, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zwata B. Recommendations of the working group on Extraanalytical Quality assurance of the German United Society for clinical chemistry and Laboratory medicine : Quality of diagnostic samples. *Beckton and Dickinson* 2015:3-78.
44. Bohm-Weigert M, Wissel T, Muth H, Kemkes-Matthes B, Peetz D. Long- and short-term in vitro D-dimer stability measured with INNOVANCE D-Dimer. *Thromb Haemost* 2010;**103**:461-5.
45. Ignjatovic V, Summerhayes R, Gan A, Than J, Chan A, Cochrane A, et al. Monitoring Unfractionated Heparin (UFH) therapy: which Anti-Factor Xa assay is appropriate? *Thromb Res* 2007;**120**:347-51.
46. Birri N, Baumgartner D, Conte T, Huynh A, Weller K, Pavicic M, et al. Stability of low molecular weight heparin anti-factor Xa activity in citrated whole blood and plasma. *Br J Haematol* 2011;**155**:629-31.
47. Rojnuckarin P, Akkawat B, Juntiang J. Stability of plasma anti-Xa activity in low-molecular-weight heparin monitoring. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010;**16**:313-7.