



## **Recommandations pré-analytiques en hémostase :**

### **Stabilité des paramètres d'hémostase spécialisée et délais de réalisation des examens (partie 2)**

**2018**

**Rédaction :** Elodie Boissier, Leyla Calmette, Céline Desconclois, Bénédicte Delahousse, Claire Flaujac, Marie-Françoise Hurtaud-Roux, Laetitia Mauge, Pierre Toulon

**Relecture :** Martine Alhenc-Gelas, Nathalie Colard, Odile Crepin, Emmanuel Demaistre, Claire Espanel, Florence Fischer, Jean-Marc Giannoli, Isabelle Guin, Emmanuelle Jeanpierre, Antoine Tournays

**Vérification et Approbation :** Elodie Boissier, Leyla Calmette, Céline Desconclois, Bénédicte Delahousse, Claire Flaujac, Marie-Françoise Hurtaud-Roux, Laetitia Mauge, Pierre Toulon

## Sommaire

<b>1. Introduction</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Antithrombine (dosage fonctionnel)</b> .....	<b>7</b>
a. Stabilité en sang total .....	7
b. Stabilité en plasma frais .....	10
c. Stabilité en plasma congelé .....	12
<b>3. Le facteur V (activité coagulante)</b> .....	<b>14</b>
a. Stabilité en sang total .....	14
b. Stabilité en plasma frais .....	15
c. Stabilité en plasma congelé .....	16
<b>4. Les facteurs du TP à synthèse vitamine K-dépendante (FII, FVII, FX) (activité coagulante)</b> .....	<b>18</b>
a. Stabilité en sang total .....	18
b. Stabilité en plasma frais .....	18
c. Stabilité en plasma congelé .....	19
<b>5. Le facteur IX (activité coagulante)</b> .....	<b>20</b>
a. Stabilité en sang total .....	20
b. Stabilité en plasma frais .....	21
c. Stabilité en plasma congelé .....	21
<b>6. Le facteur VIII (activité coagulante)</b> .....	<b>23</b>
a. Stabilité en sang total .....	23
b. Stabilité en plasma frais .....	27
c. Stabilité en plasma congelé .....	28
<b>7. Le facteur Willebrand (antigène et activité)</b> .....	<b>31</b>
a. Stabilité en sang total .....	31
b. Stabilité en plasma frais .....	35
c. Stabilité en plasma congelé .....	36
<b>8. Les anticoagulants oraux directs</b> .....	<b>38</b>
1) Apixaban (dosage par méthode chromogénique anti-FXa) .....	38
a. Stabilité en sang total .....	38
b. Stabilité en plasma frais .....	38
c. Stabilité en plasma congelé .....	38
2) Edoxaban (dosage par méthode chromogénique anti-FXa) .....	39

3) Rivaroxaban (dosage par méthode chromogénique anti-FXa).....	40
a. Stabilité en sang total.....	40
b. Stabilité en plasma frais .....	40
c. Stabilité en plasma congelé.....	40
4) Dabigatran (dosage fonctionnel).....	41
a. Stabilité en sang total.....	41
b. Stabilité en plasma frais .....	41
c. Stabilité en plasma congelé.....	42
<b>9. Références .....</b>	<b>43</b>

## Abréviations

AVK	Anti-vitamine K
CLSI	<i>Clinical laboratory standards institute</i>
CPD	Citrate phosphate dextrose
CTAD	Citrate théophylline adénosine dipyridamole
FII	Facteur II
FV	facteur V
FVII	Facteur VII
FVIII	Facteur VIII
FIX	Facteur IX
FX	Facteur X
GFHT	Groupe français d'études sur l'hémostase et la thrombose
GP1b	Glycoprotéine 1b
HBPM	Héparine de bas poids moléculaire
HNF	Héparine non fractionnée
ICSH	<i>International Council for Standardization in Haematology</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography - mass spectrometry</i>
TA	Température ambiante
TCA	Temps de céphaline avec activateur
TP	Taux de prothrombine
VWD	<i>Von Willebrand disease</i>
VWF	Facteur Willebrand
VWF:Ag	Facteur Willebrand antigène
VWF:CB	Facteur Willebrand <i>collagen binding activity</i>
VWF:RCO	Facteur Willebrand activité cofacteur de la ristocétine

## 1. Introduction

Le groupe de travail « préanalytique » du Groupe Français d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT) a analysé les données de la littérature (1997-juin 2018) afin d'émettre des recommandations qui précisent, pour les examens d'hémostase, **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 tenir compte de la stabilité de chaque analyte à doser.** 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.**

Ce document complète celui précédemment mis en ligne sur le site du GFHT en 2017 et qui concernait les paramètres d'hémostase usuels (taux de prothrombine (TP), temps de céphaline avec activateur (TCA), fibrinogène, D-dimères, activités anti-Xa héparine non fractionnée (HNF) et héparine de bas poids moléculaire (HBPM)) ([http://site.geht.org/accreditation-hemostase-pre-analytique/recommandations-texte-long-gfht-delai-de-realisation\\_v240517/](http://site.geht.org/accreditation-hemostase-pre-analytique/recommandations-texte-long-gfht-delai-de-realisation_v240517/))

Les modalités générales de conservation des échantillons décrites dans le précédent document s'appliquent également ici et de ce fait ne seront pas à nouveau détaillées.

Le travail proposé par le GFHT en 2016 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 2016 et juin 2018 ont été ajoutés au premier travail pour les paramètres suivants : antithrombine, facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, Willebrand et activité anti-Xa ou anti-IIa des anticoagulants oraux directs. Les communications affichées n'ont pas été retenues. Trente-huit articles ont été analysés par le groupe de travail. Les critères d'analyses ont été 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 populations étudiées (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...

Le groupe de travail a choisi de présenter une revue des données bibliographiques dans un texte long présentant l'argumentaire des recommandations. **La bibliographie est disponible en annexe** (<http://site.geht.org/accreditation-hemostase-pre-analytique/synthese-publis-delai-classement-biblio-decembre-2018/>). 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 du sang total, du plasma frais ou 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. Antithrombine (dosage fonctionnel)*

En ce qui concerne l'activité cofacteur de l'héparine de l'antithrombine, nous avons recherché les données de stabilité en sang total dans différentes conditions de conservation, température ambiante (TA) ou réfrigérée, puis en plasma frais ou congelé à différentes températures.

### *a. Stabilité en sang total*

Le *Clinical laboratory standards institute* (CLSI) recommande que le dosage de l'antithrombine soit effectué dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (3).

L'analyse de la littérature met en évidence une stabilité plus longue de l'antithrombine dans les échantillons de sang total. Six études ont évalué la durée de conservation à TA (3–8), deux à +4°C (7,8) et une à +30°C (7). Ces études sont présentées dans le tableau I. Les prélèvements ont été réalisés sur des tubes citratés 3,2%, excepté dans le travail d'Oddeze et coll. qui a utilisé du CTAD. Les conditions de traitement des échantillons avant analyse et les méthodes de dosage utilisées sont hétérogènes.

Dans l'étude de Zürcher et coll. parmi les 8 échantillons ayant des valeurs comprises entre 70 et 90%, une augmentation du taux a été observé à 24h sur 1 échantillon et l'a fait passer du statut de déficitaire à normal (77% à 82%). A noter que la variation était <10% et que l'augmentation du taux d'AT à 24h n'était pas systématique.

Une seule étude a inclus des patients avec des valeurs pathologiques (6). Après 24h de conservation, une variation à la hausse entre 10% et 15% du taux basal a été mise en évidence chez

3 patients et une variation de 15% à 20% a été mise en évidence chez 3 autres patients, sans impact sur leur classification. Les auteurs concluent à une stabilité acceptable de l'antithrombine pendant 24h en sang total à TA mais préconisent une certaine prudence pour les taux limites.

L'étude de Kim et coll. est peu informative car elle s'intéresse à des temps de conservation de 4h maximum (9).

Toutes les autres études ont observé une stabilité de l'antithrombine d'au moins 24h depuis le prélèvement, avec une variation moyenne des taux <10%, que ce soit à TA, +4°C ou +30°C (cf tableau I).

En conclusion, il semble qu'une stabilité de 24h soit démontrée sur la majorité des échantillons testés. Une augmentation des taux >15% n'a été objectivée que dans une des études pour un délai de conservation de 24h. **Le délai de conservation du sang total à TA recommandé par le GFHT pour le dosage de l'antithrombine est de 24h. Le GFHT préconise une interprétation biologique claire, en tenant compte des incertitudes de mesure et du contexte clinique pour les taux limites mesurés à 24h.**

**Il n'est pas possible de conclure pour des temps de conservation au-delà de 24h.**

**L'exposition du prélèvement à une température réfrigérée pendant moins de 24h est acceptable.**



**Tableau I : Résumé des études de stabilité de l'antithrombine sur sang total**

Références	Température de conservation	Population Tube	Pré-analytique Méthode de dosage	Stabilité (analyse)
Zürcher, 2008 (4)	Température ambiante et transport à T°C non contrôlée (été et hiver)	N=59 101% (25-75 <sup>e</sup> p : 94-108)  Citrate 3,2%	<b>&lt;1h (ref); 4-6; 8-12; 24-28; 48-52h</b> Centrifugation (1500g 10 min) x2 à TA Congélation avant dosage, absence d'effet de la congélation) COAMATIC LR Antithrombin (Xa)	<b>Au moins 48-52h</b> (variation moy<10%)
Luddington, 1997 (5)	Température ambiante	N=26 101% (IC95% : 98-104)  Citrate 3,2%	<b>0, 1, 2, 3 jours</b> Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée Essai chromogénique (IIa)	<b>Au moins 24h</b> , pas de recommandations fiables pour une durée de conservation de 48h
Kemkes-Matthes, 2011 (6)	Température ambiante	N=49 (19 pathologiques) 83,5% (ext : 22,4-111,7) Citrate 3,2%	<b>&lt;4h (ref), 8, 24h</b> Centrifugation 1500g 10 min TA Berichrom ATIII (IIa bovine)	<b>Au moins 24h</b> (variation moy<10%)
Van Balveren, 2017 (7)	Température ambiante	N=50 (sains) Moy 115,7% Citrate 3,2%	<b>0, 4, 6, 8, 24h</b> Centrifugation 3000g 10 min TA Stachrom ATIII (IIa bovine)	<b>Au moins 24h</b> (Variation moy <10%)
Kim, 2018 (9)	Température ambiante	N=22 (sains) 111% (sd : 18,5%)  Citrate 3,2%	<b>0, 4h</b> Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Stachrom ATIII (IIa bovine)	<b>Au moins 4h</b> (test statistique)
Oddoze, 2012 (8)	Température ambiante	N=10 (sains)  CTAD	<b>0, 6, 24h</b> Centrifugation 2000g 10 min TA Stachrom ATIII (IIa bovine)	<b>Au moins 24h</b> (<Total Change Limit : tient compte de la variabilité de la technique et interindividuelle)
Van Balveren, 2017 (7)	+ 4°C + 30°C	N=50 (sains) Moy 115,7% Citrate 3,2%	<b>0, 4, 6, 8, 24h</b> Centrifugation 3000g 10 min TA Stachrom ATIII (IIa bovine)	<b>Au moins 24h</b> (Variation moy <10%)
Kim, 2018 (9)	+ 4°C	N=22 (sains) 111% (sd : 18,5%)  Citrate 3,2%	<b>0, 4h</b> Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Stachrom ATIII (IIa bovine)	<b>Au moins 4h</b> (test statistique)
Oddoze, 2012 (8)	+ 4°C	N=10 (sains)  CTAD	<b>0, 6, 24h</b> Centrifugation 2000g 10 min TA Stachrom ATIII (IIa bovine)	<b>Au moins 24h</b> (<Total Change Limit : tient compte de la variabilité de la technique et interindividuelle)

### *b. Stabilité en plasma frais*

L'analyse de la littérature met en évidence une stabilité plus longue que celle rapportée dans les recommandations du CLSI (3).

Trois études ont évalué la conservation du plasma à TA et à +4/+6°C (8,10,11). Elles sont présentées dans le tableau II. Selon les conditions d'étude, des variations de l'ordre de 5 à 10% sont observées en fonction des types de tubes : citraté 3,2% (10,11) ou CTAD (8), des temps de centrifugation et des réactifs. Quelques sujets présentant un taux pathologique d'antithrombine ont été inclus dans l'étude de Rimac et coll.

Dans ces 3 études, la variation moyenne des taux d'antithrombine est <10%, quels que soient les délais de conservation (24h à 7 jours) ou la température de conservation (TA ou +4/+6°C).

**En conclusion, le GFHT recommande de ne pas dépasser 24h de conservation du plasma frais à TA pour le dosage fonctionnel de l'antithrombine. Une conservation jusqu'à 24h à température réfrigérée est acceptable.**

**Tableau II : Résumé des études de stabilité de l'antithrombine sur plasma frais**

Références	Température de conservation	Population Tube	Pré-analytique Méthode de dosage	Stabilité (analyse)
Heil, 1998 (10)	Température ambiante	N=40 dont 20 sous héparine <i>Taux non renseignés</i> Citrate 3,2%	<b>0, 8, 24, 48, 72, 96, 168h</b> Centrifugation 2000g TA, temps non précisé ATIII (Boehringer Mannheim)	<b>7 jours</b> (variation <10%)
Rimac, 2017 (11)	Température ambiante	N=30 <i>89,6% (ext : 50-131)</i> Citrate 3,2%	<b>T&lt;4h (=ref), 24h</b> Centrifugation 2000g 15min TA Berichrom ATIII (IIa)	<b>Au moins 24h</b> (variation <10%)
Oddoze, 2012 (8)	Température ambiante	N=10 (sains) CTAD	<b>T0, 6h, 24h</b> Centrifugation 2000g 10 min TA Stachrom ATIII (IIa bovin)	<b>Au moins 24h</b> (<Total Change Limit : tient compte de la variabilité de la technique et interindividuelle)
Heil, 1998 (10)	+ 6°C	N=40 dont 20 sous héparine <i>Taux non renseignés</i> Citrate 3,2%	<b>0, 8, 24, 48, 72, 96, 168h</b> Centrifugation 2000g TA, temps non précisé ATIII (Boehringer Mannheim)	<b>7 jours</b> (variation <10%)
Rimac, 2017 (11)	+ 4°C	N=30 <i>89,6% (ext : 50-131)</i> Citrate 3,2%	<b>T&lt;4h (=ref), 24h</b> Centrifugation 2000g 15min TA Berichrom ATIII (IIa)	<b>Au moins 24h</b> (variation <10%)
Oddoze, 2012 (8)	+ 4°C	N=10 (sains) CTAD	<b>T0, 6h, 24h</b> Centrifugation 2000g 10 min TA Stachrom ATIII (IIa bovin)	<b>Au moins 24h</b> (<Total Change Limit : tient compte de la variabilité de la technique et interindividuelle)

### *c. Stabilité en plasma congelé*

Le CLSI se réfère à l'étude de Woodhams et coll, qui indique une stabilité de l'antithrombine d'au moins 24 mois, que le plasma soit conservé à -24°C ou à -74°C (12). Cette étude a été réalisée sur des aliquotes de plasma issus de plasmaphérese (citrate 3,8%) de 6 sujets sains permettant de tester plusieurs types d'aliquotage, de conditions de congélation et de durées de conservation.

Nous rapportons dans le tableau III les données de trois autres études (5,13,14) qui ont évalué la stabilité de l'antithrombine sur plasma (citraté 3,2%) congelé à -70°C, avec des délais de conservation allant d'1 semaine (13) à 9 ans (14) (cf tableau III). Ces études sont hétérogènes sur le plan pré-analytique. Seule l'étude de Gosselin et coll. inclut des taux d'antithrombine pathologiques. A J15, les auteurs observent une augmentation des taux moyens, 91,8% à 118,9%, probablement sans impact clinique d'après les auteurs. L'étude de Luddington et coll. est exclue car il n'y a pas de données sur le pourcentage de variation permettant de comparer avec les autres articles (5).

D'après l'étude de Woodhams et coll., réalisée sur de petits effectifs, l'antithrombine est stable au moins 24 mois à une température  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ . L'étude plus récente de Betsou et al qui s'est intéressée à un effectif de patients beaucoup plus important montre une différence significative par le test statistique. Bien que la variation entre les moyenne des valeurs à T0 et à 9 ans présentées graphiquement semble  $<10\%$ , aucune donnée chiffrée n'est disponible dans l'article pour évaluer la proportion d'échantillons qui présenterait une variation  $>10\%$ . Nous ne pouvons donc pas conclure pour ce délai de conservation.

**En conclusion, d'après les informations disponibles à ce jour, le GFHT conclut que la conservation de l'antithrombine à une température  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  est recommandée jusqu'à 24 mois et acceptable jusqu'à 24 mois à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .**

**Tableau III : Résumé des études de stabilité de l'antithrombine sur plasma congelé**

Références	Température de conservation	Population Tube	Pré-analytique Méthode de dosage	Stabilité (analyse)
Woodhams, 2001 (12)	-20°C	N=6 sujets sains Plasmaphérèse sur citrate 3,8%	<b>2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois</b> Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C Stachrom ATIII (IIa)	<b>Au moins 24 mois</b> (variation<5%)
Woodhams, 2001 (12)	-70 °C	N=6 sujets sains Plasmaphérèse sur citrate 3,8%	<b>2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois</b> Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C Stachrom ATIII (IIa)	<b>Au moins 24 mois</b> (variation<5%)
Luddington, 1997 (5)	- 80°C	N=26 101% (IC95% : 98-104) Citrate 3,2%	<b>2 et 4 semaines de congélation</b> Centrifugation (2500g 10 min)x2 T°C non précisée, Décongélation rapide à 37°C Essai chromogénique (IIa)	<b>Non interprétable :</b> augmentation absolue de 12,7%, significative (test statistique). Pas de détails sur le % de variation
Betsou, 2009 (14)	-70 °C	60 patients (>80%)  Citrate 3,2%	<b>T0, 9 ans</b> Centrifugation 1500g 15min 15°C, Décongélation à TA Stachrom ATIII	<b>Diminution significative après 9 ans</b> (test statistique). Pas de détails sur le % de variation mais distribution des valeurs T0/T9 en faveur d'une variation moy<10%
Gosselin, 2015 (13)	-70 °C	N=55 Ext : 17-138%  Citrate 3,2%	1 semaine Conditions de centrifugation non précisées, Décongélation 5min à 37°C Innovance Antithrombin(Xa)	<b>Au moins 1 semaine</b> (test statistique et biais). Augmentation des taux moyen 91.8% à 118.9% à J15, probablement sans impact clinique d'après les auteurs

## Synthèse

- **Stabilité de l'antithrombine conservé en sang total à TA: recommandée jusqu'à 24 heures.**
- **Stabilité de l'antithrombine en plasma sur tube primaire centrifugé et conservé à TA: recommandée jusqu'à 24 heures.**
- La conservation de l'antithrombine en sang total ou en plasma exposé à une température réfrigérée est acceptable jusqu'à 24 heures.
- **Stabilité de l'antithrombine dans les plasmas congelés : recommandée jusqu'à 24 mois à  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  et acceptable jusqu'à 24 mois à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .**

### *3. Le facteur V (activité coagulante)*

#### *a. Stabilité en sang total*

Pour le dosage du facteur V (FV), le CLSI préconise que les tubes citratés soient centrifugés et analysés dans un délai maximum de 4h après leur prélèvement quand ils sont conservés à TA (3).

Trois études ont analysé le potentiel impact de différentes durées de stockage des tubes primaires à TA sans noter de variation pertinente du taux de FV (biais moyen inférieur à 10%, ou cliniquement non significatif selon les auteurs) jusqu'à une durée maximale évaluée de 3,5h (15), 4h (9), 6h (16) ou 8h (17). Concernant l'étude de Toulon et coll., il existe des variations statistiquement significatives dès 4h mais sans impact clinique (17).

Plusieurs études ont évalué des durées de stabilité plus longues (4,18,19). Dans l'étude de Zürcher et coll. publiée en 2008 le transport des échantillons était assuré par pneumatique pour le tube de référence, par une personne pour 4 tubes servant à l'étude des délais tenant compte ainsi des variations de température entre l'été et l'hiver (4). Aucune variation significative liée au transport n'était observée que ce soit pendant l'hiver ou pendant l'été. Les prélèvements étaient ensuite conservés non centrifugés, à une TA maîtrisée (entre  $+20^{\circ}\text{C}$  et  $+25^{\circ}\text{C}$ ) et la double centrifugation était réalisée après différents temps de conservation (<1h=initial, 4-6h, 8-12h, 24-28h, 48-52h). Les plasmas étaient ensuite congelés rapidement

à -80°C avant analyse. Les auteurs rapportent une stabilité du FV jusqu'à 8-12h, pour une durée maximale évaluée de 48-52h. La diminution observée des taux de FV était statistiquement et cliniquement significative (>10% par rapport à la valeur initiale) à partir d'une conservation de 24h des plasmas (-12,4% à partir de 24h et -27% à partir de 48h). Elle est en grande partie responsable de la diminution du TP sur les échantillons de sang total conservés jusqu'à 24h. Cependant, un effet de la congélation sur la stabilité du FV ayant été mis en évidence, un second essai a été réalisé sur plasma frais. Les plasmas ne subissaient pas de cycle de congélation/décongélation. Le FV était alors stable 24h après le prélèvement à TA en sang total par rapport à la référence centrifugée et dosée moins d'1h après le prélèvement (n=10 échantillons normaux, FV médian 121%) (4).

Deux autres études, avec des conditions pré-analytiques plus standardisées, ont confirmé la stabilité à 24h pour le FV mesuré sur sang total conservé à TA sur des échantillons de patients sous AVK. Leeming et coll. ont observé une stabilité de 24h (avec un biais moyen de 1.8%), voire de 48h (avec un biais moyen de 8.4%), qui était la durée maximale évaluée (18). Baglin et coll. dans une étude portant sur 10 échantillons de patients sous AVK, ont quant à eux observé une réduction de seulement 4,8% du taux de FV à 48h (valeurs extrêmes non présentées) mais de 20,5% pour la durée maximale évaluée de 96h, (19).

Peu de données sont disponibles concernant la stabilité du FV dans le sang total citraté conservé à +4°C. Seul Favalaro et coll. l'ont évalué sans noter de différences après un stockage de 3,5h, qui était la durée maximale de conservation de l'étude (15).

Par ailleurs, une étude a rapporté une stabilité de 24h (durée maximale évaluée) du FV dosé sur du sang prélevé dans des tubes contenant une autre solution anticoagulante, le CTAD, que le sang soit stocké à TA ou à +4°C (8).

**En conclusion, le GFHT recommande une conservation jusqu'à 24h du sang total à TA pour le dosage du FV.**

#### *b. Stabilité en plasma frais*

Après centrifugation, le délai maximum de conservation du plasma selon le CLSI paraît être de 4h, à TA, même si ce n'est pas spécifiquement indiqué (3). En effet, peu d'études sont disponibles à ce jour et elles montrent des résultats divergents.

Heil et coll. ont étudié la stabilité jusqu'à 168h du FV sur le plasma citraté de 20 sujets sains et de 20 patients sous héparine non-fractionnée (HNF), stocké à TA ou à +6°C (10). Les tubes de sang étaient centrifugés immédiatement après le prélèvement. Ils ont conclu à une stabilité du FV de 48h chez les sujets non traités, que leur plasma soit stocké à TA ou à +6°C, et de seulement 8h pour le plasma de patients sous HNF conservé à TA, et <8h si la conservation a lieu à +6°C.

Liskens et coll. ont montré une différence significative (soit plus de 10% de variation moyenne à la baisse des taux par rapport à ceux de référence) sur des plasmas normaux de sujets sains (n=20), centrifugés rapidement après le prélèvement, congelés à -20°C avant analyse (pour tous les plasmas, incluant celui de référence), dès un délai de 12h pour des dosages de FV en couple automate/réactifs STAGO et entre 4-8h pour un couple automate/réactifs WERFEN (20).

Une stabilité de 24h a été rapportée pour des prélèvements effectués sur des tubes contenant d'autres solutions anticoagulantes que le citrate comme le CTAD pour des plasmas stockés à TA ou à +4°C (8) ou le CPD (citrate/phosphore/dextrose), pour des plasmas stockés à TA ou à +4°C (21).

**En conclusion, le GFHT recommande une conservation à TA jusqu'à 24h du plasma frais non hépariné pour le dosage du FV. En cas de plasma hépariné (HNF), le GFHT recommande une conservation à TA jusqu'à 8h.**

### *c. Stabilité en plasma congelé*

La durée maximale de conservation préconisée par le CLSI est de 24 mois pour le plasma conservé congelé à -74°C dans des micro-tubes en polypropylène ou dans des tubes à hémolyse en polystyrène, pour un seuil de variation de 10% (3). La stabilité du FV sur un plasma conservé à -24°C était d'au moins 24 mois en micro-tubes mais de seulement 6 mois en tubes classiques en polystyrène. Ces recommandations sont fondées sur les résultats de l'étude de Woodhams et coll., qui a étudié la stabilité de divers analytes sur des plasmas normaux issus de plasmaphérèse (n=6) conservés dans ces deux types de tubes à ces deux températures (12). La seule autre étude publiée est moins informative car elle n'évalue l'impact de la conservation que sur une semaine. Dans cette étude de 2015, Gosselin et coll. ont montré qu'il y avait une variation statistiquement significative (test de Student) mais non



cliniquement significative des valeurs mesurées 1 semaine (temps maximum évalué) après congélation à  $-70^{\circ}\text{C}$  (type de tubes non précisé) par rapport aux valeurs basales (extrêmes des taux 20-154%) mesurées <4h après le prélèvement (citrate 3,2%) (13).

**En conclusion, pour le dosage du facteur V, une conservation des plasmas congelés est possible jusqu'à 24 mois à une température  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ , quel que soit le type de tube utilisé. Il en est de même pour le plasma stocké à une température  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  dans des micro-tubes en polypropylène. En revanche, la durée de stabilité n'est que de 6 mois à une température  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  en cas de stockage dans des tubes en polystyrène.**

Cependant, ces recommandations ne reposent que sur une étude portant sur un faible nombre d'échantillons (n=6) provenant de sujets sains.

### **Synthèse**

- **Stabilité du facteur V en sang total conservé à TA: recommandée jusqu'à 24 heures.**
- **Stabilité du facteur V en plasma sur tube primaire centrifugé, conservé à TA: recommandée jusqu'à 24 heures pour les plasmas non hépariné (HNF) et jusqu'à 8 heures pour les plasmas héparinés.**
- **La conservation en sang total ou plasma à une température de  $+ 4^{\circ}\text{C}$  n'est pas recommandée pour le dosage du facteur V.**
- **Stabilité du facteur V dans les plasmas congelés : recommandée jusqu'à 24 mois à une température  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ , quel que soit le type de tube utilisé. Il en est de même pour le plasma stocké à une température de  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  dans des micro-tubes en polypropylène. En revanche, la durée de stabilité n'est que de 6 mois à une température  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  en cas de stockage dans des tubes en polystyrène.**

#### *4. Les facteurs du TP à synthèse vitamine K-dépendante (FII, FVII, FX) (activité coagulante)*

##### *a. Stabilité en sang total*

Pour le dosage des facteurs du TP à synthèse vitamine K (VK)-dépendante (FII, FVII et FX) sur sang total citraté conservé à TA, le CLSI recommande un délai maximum comparable à celui décrit pour le FV, c'est-à-dire de 4h (3). Ce délai est le même pour des conditions de stockage à +4°C ou +22°C sur une durée de 3,5h si l'on se réfère aux résultats d'une étude qui n'a pas noté de variation significative des taux de ces facteurs à ces T°C de conservation (15).

Plusieurs études évaluant des durées de conservation plus longues ont conclu à une stabilité d'au moins 24h pour le dosage de ces facteurs sur du sang total conservé à TA (4,19,22). Zürcher et coll. ne rapportent pas de modification statistiquement significative pour les FII et FX jusqu'à 48h (4). En revanche, pour le FVII, la diminution est statistiquement significative à partir de 24h et cliniquement significative à partir de 48h (-12,8%). Christensen et coll. rapportent également une stabilité des 3 facteurs du TP à synthèse VK-dépendante évaluée jusqu'à 24h chez des patients sous AVK (22). Baglin et coll. quant à eux considèrent que leur taux est stable jusqu'à 96h à TA, dans des prélèvements de patients sous AVK (19).

Peu de données sont disponibles concernant la stabilité des FII, FVII et FX dans le sang total conservé à +4°C, même si Favalaro et coll. rapportent une stabilité de leur taux jusqu'à 3,5h, la durée maximale étudiée (15). Kim et coll. (9) retrouvent des variations statistiquement significatives de taux de FVII à 4h sur des prélèvements de témoins sains conservés sur de la glace (+14% à 4h vs T0) (9). Néanmoins, l'activation du FVII par le froid rend son dosage non recommandé dans ces conditions (23).

Une étude a rapporté une stabilité de 24h des FII et FX sur du sang prélevé sur une autre solution anticoagulante, le CTAD, que le stockage ait lieu à TA ou à +4°C (8).

**En conclusion, le GFHT recommande une conservation à TA jusqu'à 24h du sang total pour les dosages des FII, FVII et FX.**

##### *b. Stabilité en plasma frais*

Sur plasma frais, le délai maximum de conservation suggéré par le CLSI est de 4h que ce soit à TA (18-25°C) ou à +2-+4°C, avec une restriction pour cette dernière température concernant le FVII (voir plus haut) (3).

Sur des plasmas normaux de sujets sains (n=20), centrifugés rapidement après le prélèvement, Liskens et coll. ont montré une stabilité jusqu'à 24h, mais une différence significative (soit plus de 10% d'écart à la valeur moyenne de référence) à partir de 48h (20).

Deux études ont rapporté une stabilité des facteurs du TP à synthèse VK-dépendante d'au moins 24h en utilisant du sang prélevé sur d'autres solutions anticoagulantes sans retrouver de variation significative, mais seuls les FII et FX ont été étudiés sur des tubes contenant du CTAD (8) et seuls les FVII et FX ont été étudiés sur des tubes contenant du CPD (21).

**En conclusion, le GFHT recommande une conservation à TA jusqu'à 24h du plasma sur tube primaire centrifugé pour le dosage des FII, FVII et FX.**

### *c. Stabilité en plasma congelé*

Après congélation, les durées maximales de conservation à -24°C et à -74°C préconisées par le CLSI (3), fondées sur les travaux de Woodhams et coll. (12), sont variables selon l'analyte et la température de conservation. La stabilité des FII, FVII et FX dans le plasma conservé à -74°C dans des micro-tubes en polypropylène ou dans des tubes à hémolyse classiques en polystyrène était d'au moins 24 mois (variations <10%). En cas de stockage à -24°C, la durée maximale, avec la même variabilité, n'est que de 12 mois pour le FII, de 6 mois pour le FVII et de 4 mois pour le FX, quel que soit le type de tube utilisé pour la congélation (12). Cependant, ces recommandations ne reposent que sur une étude portant sur un faible nombre d'échantillons (n=6) provenant de sujets sains.

**En conclusion, le GFHT recommande une conservation des plasmas congelés à  $\leq -70^\circ\text{C}$  jusqu'à 24 mois pour le dosage des FII, FVII et FX. Une conservation à une température  $\leq -20^\circ\text{C}$  est acceptable, la durée de conservation est fonction du facteur à doser.**

## Synthèse

- **Stabilité des facteurs II, VII et X conservés en sang total à TA: recommandée jusqu'à 24 heures**
- **Stabilité des facteurs II, VII et X conservés en plasma sur tube primaire centrifugé et conservé à TA: recommandée jusqu'à 24 heures**
- **La conservation des facteurs II, VII et X en sang total ou plasma à une température réfrigérée n'est pas recommandée.**
- **Stabilité des facteurs II, VII et X dans les plasmas congelés : recommandée jusqu'à 24 mois à une température  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ , quel que soit le type de tube utilisé. Si la conservation a lieu à une température  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ , la durée maximale de stockage n'est que de 12 mois pour le FII, de 6 mois pour le FVII et de 4 mois pour le FX quel que soit le type de tube utilisé pour la conservation.**

## *5. Le facteur IX (activité coagulante)*

Dans les différentes études, aucune information n'est disponible sur la possibilité qu'il s'agisse ou non de plasmas de patients substitués par des concentrés de facteur IX (FIX) (classique ou à durée de vie longue).

### *a. Stabilité en sang total*

Pour le FIX, le CLSI préconise un délai maximal de conservation sur sang total citraté de 4h, à TA (3), ce qui est cohérent avec l'étude de Favaloro et coll. qui a évalué un délai maximum de 3,5h (durée maximale de l'étude) sans noter de variation pertinente (15). Plusieurs études récentes ont évalué des durées de conservation plus longues et ont conclu à une stabilité d'au moins 24h pour le dosage du FIX sur sang total conservé à TA (biais moyen inférieur à 10%, ou cliniquement non significatif selon les auteurs) (4,18,22). Leeming et coll. ne notent pas de variation jusqu'à 24h voire 48h, selon le biais moyen accepté (au maximum 10%) (18). Christensen et coll. rapportent également une stabilité du FIX évalué chez des patients sous AVK au moins jusqu'à 24h (22). Zürcher et coll. quant à eux concluent à une stabilité du FIX de 48-52h, sans différence statistiquement ou cliniquement significative (4).

Peu de données existent sur la stabilité du FIX dans le sang total citraté conservé à +4°C, à l'exception des travaux de Favaloro et coll. qui ne rapportent pas de variations du taux mesuré jusqu'à 3,5h, le maximum évalué (15) et de ceux de Kim et coll. (9) retrouvant aussi une stabilité des taux de facteur IX à 4h sur des prélèvements de témoins sains conservés sur de la glace.

**En conclusion, le GFHT recommande une conservation à TA jusqu'à 24h du sang total pour le dosage du FIX.**

#### *b. Stabilité en plasma frais*

Sur plasma frais, le délai maximum de conservation recommandé par le CLSI est de 4h, que ce soit à TA ou +2-+4°C (3). Néanmoins, Liskens et coll. n'ont pas montré de variation significative (soit une variation moyenne des taux par rapport aux taux de référence > 10%) sur des plasmas de sujets sains (n=20), centrifugés rapidement après le prélèvement, jusqu'à au moins 48h (20).

L'étude récente de Feng et coll. a évalué la stabilité du FIX jusqu'à 24h et note, que ce soit à TA ou à +4°C, une variation significative >10% pour plus de 25% des échantillons à partir de 6h de stockage mais une variation moyenne <10% (n=72 témoins sains). A 8h, la variation reste <10% en moyenne à +4°C mais >10 % (11.08%) à TA. Les variations statistiques (test t) sont significatives dès 4h à TA ou à 4°C. Les auteurs recommandent cependant un dosage dans les 4h suivant le prélèvement (24).

**En conclusion, le GFHT recommande une conservation à TA jusqu'à 6h du plasma sur tube primaire centrifugé pour le dosage du FIX. La conservation est acceptable jusqu'à 8h dans ces mêmes conditions.**

#### *c. Stabilité en plasma congelé*

Les durées maximales de conservation des plasmas congelés préconisées par le CLSI (3), qui sont fondées sur l'étude de Woodhams et coll. (12), sont variables selon la température de conservation. Le FIX est stable jusqu'à 24 mois à une température de -74°C, quel que soit le type de tube utilisé pour la congélation (micro-tube en polypropylène ou tube à hémolyse en polystyrène). Si la conservation a lieu à une température de -24°C, la durée maximale de stockage n'est que de 6 mois pour un biais moyen accepté de 5% ou de 8 mois pour un biais

moyen accepté de 10%, quel que soit le type de tube (12). Cependant, ces recommandations ne reposent que sur une étude portant sur un faible nombre d'échantillons (n=6) provenant de sujets sains.

Seule l'étude de Zhao et coll. publiée en 2017 qui repose sur des données issues de 144 sujets sains adultes (36 patients par condition de stockage), a montré des variations statistiquement significatives (diminution des taux, test de Wilcoxon) dès un mois quelle que soit la température de conservation, -80°C ou à -20°C (25). Si l'on considère, un seuil de 10% de variation par rapport au taux de FIX de référence, alors la variation est significative dès 3 mois de conservation quelle que soit la température (variation moyenne -12.37% à -80°C, -18.46% à -20°C). Ces variations sont également retrouvées sur les points à 6 mois et 1 an.

**Les données sur la conservation du FIX en plasma congelé étant discordantes et peu nombreuses, le GFHT choisit de recommander une conservation maximale de 3 mois à une température  $\leq -70^{\circ}\text{C}$  car les données de l'étude de Zhao et coll. ont été faites à partir de 144 plasmas versus 6 pour l'étude de Woodhams et coll. et d'accepter une conservation maximale de 3 mois à une température  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .**

### Synthèse

- **Stabilité du facteur IX en sang total et conservé à TA: recommandée jusqu'à 24 heures**
- **Stabilité du facteur IX en plasma sur tube primaire centrifugé et conservé à TA: recommandée jusqu'à 6 heures, acceptable jusqu'à 8 heures**
- **La conservation du facteur IX en sang total ou plasma à une température réfrigérée n'est pas recommandée.**
- **Stabilité du facteur IX dans les plasmas congelés : recommandée 3 mois à  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ , acceptable 3 mois à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ , quel que soit le type de tube utilisé pour la conservation.**
- En l'absence de données, le GFHT ne se prononce pas quand à la stabilité du FIX dans des échantillons issus de patients substitués par concentrés de FIX

## 6. Le facteur VIII (activité coagulante)

Dans les différentes études, aucune information n'est disponible sur la possibilité qu'il s'agisse ou non de plasmas de patients substitués par des concentrés de facteur VIII (FVIII) (classique ou à durée de vie longue).

### a. Stabilité en sang total

Pour le FVIII, le CLSI (H21-A5) (3) recommande un délai maximal de conservation de 4h après le prélèvement en sang total citraté sur des échantillons transportés et conservés à TA, ce qui est cohérent avec ce que préconise Adcock et coll. en 2016 (26). D'après ces mêmes références, la conservation du prélèvement à température réfrigérée ou dans la glace est non conforme en raison d'un risque de diminution du taux de FVIII.

Plusieurs études vont dans le sens de ces recommandations.

L'étude de Zürcher et coll., a évalué la stabilité du FVIII en sang total citraté (3,2%). Les échantillons issus de 59 patients de consultation de thrombophilie (12 sous traitement AVK, aucun sous héparine), sont transportés par une personne à température extérieure (-12°C à +10°C en hiver et +11°C à +29°C en été) puis conservés à TA (+20 à +25°C) sur des périodes de 4-6h, 8-12h, 24-28h et 48-52h, avant double centrifugation (1500g, 2 fois 10 min, +20°C) et congélation à -80°C pendant une durée non spécifiée (4). Aucune variation significative liée au transport n'était observée entre l'hiver et l'été. Les échantillons sont décongelés à +37°C pendant 5 min, brièvement vortexés et analysés immédiatement. Les résultats de FVIII sont comparés avec un échantillon de référence, transporté par pneumatique, centrifugé dans l'heure suivant le prélèvement, congelé et analysé immédiatement après décongélation. Aucun impact clinique (i.e différence < 10% de la valeur du tube référence) n'a été constaté jusqu'à 4-6h de conservation en sang total (variation moyenne -7.3%) et aucune différence statistique significative n'a été observée jusqu'à 8-12h de conservation en sang total (variation moyenne -11.6% mais  $p > 0.05$ ).

L'étude de Toulon et coll. a évalué la stabilité du FVIII en sang total citraté (3,2%) sur 139 patients ambulatoires dont 39 sous AVK. Les échantillons sont transportés et conservés à TA sur des périodes de moins de 2h, 4h, 6h et 8h puis analysés dans les 10 min après centrifugation (2250g, 15 min à +20°C) (17). Une analyse statistique et un calcul des biais

sont effectués entre les échantillons conservés 4h, 6h et 8h versus l'échantillon de référence conservé moins de 2h.

Pour des taux de FVIII supérieurs à 100% (n=128 ; médiane = 156,9% [100,1 ; 299,3]) :

- une différence statistique significative est observée à partir de 4h de conservation en sang total avec une diminution progressive des taux de FVIII.
- les biais obtenus sont inférieurs aux biais RICOS jusqu'à 4h et au biais recommandé par le GFHT jusqu'à 8h.

Pour des taux de FVIII inférieurs à 100% (n=11 ; médiane = 88,6 % [61,9 ; 99,7]) :

- il n'y a pas de différence statistique significative observée jusqu'à 8h
- les biais obtenus sont inférieurs aux biais du RICOS et au biais recommandé par le GFHT jusqu'à 8h

Les auteurs concluent que le FVIII est stable pendant 6h en sang total à TA.

L'étude de Favaloro et coll. a évalué la stabilité du FVIII en sang total citraté (3,2%) chez 39 volontaires sains. Les prélèvements sont conservés pendant 3,5h à TA et à +4°C avant centrifugation (2500g, 15 min, température non précisée), congelés à -80°C pendant une période non précisée et analysés immédiatement après décongélation (15). Les taux de FVIII obtenus sur les prélèvements conservés à TA pendant 3,5h ne sont pas statistiquement différents des taux obtenus sur les échantillons de référence centrifugés immédiatement après le prélèvement. Une diminution statistiquement significative du FVIII est constatée sur les échantillons conservés à +4°C pendant 3,5h avant centrifugation. Ces résultats sont confirmés par l'étude de Refaai et coll (27) qui suggère que dans des conditions réfrigérées, le FVIII et le facteur Willebrand forment un cryoprécipité qui est réversible après réchauffage du sang total à +37°C.

L'étude de Kim et coll. évalue la stabilité du FVIII en sang total citraté (3,2%) chez 22 volontaires sains, à TA et dans la glace (0°C) pendant 4h avant centrifugation (obtention de plasma pauvre en plaquettes sans précision) et congélation immédiatement à -70°C sans durée précisée (9). Les échantillons sont analysés immédiatement après décongélation à +37°C pendant 5 minutes et mélange/homogénéisation. Une analyse statistique et clinique est réalisée *versus* échantillons de référence immédiatement centrifugés après le



prélèvement (variation clinique significative quand > 6% de l'échantillon de référence). Les résultats montrent une diminution statistiquement significative du FVIII à 4h à TA et dans la glace. Une variation clinique significative du FVIII d'après les critères des auteurs est également observée à TA (-9,4%) sans dépasser la valeur de 10% communément utilisée et dans la glace (-19,2%) après 4h de conservation.

L'étude de Böhm et coll. a évalué la stabilité du FVIII en sang total citraté (3,2%, non tamponné) à TA et sur glace pilée pendant 3h et 6h, sur un groupe de 25 sujets (10 témoins sains, 10 patients connus pour une maladie de Willebrand de type 1 (VWD1) et 5 patients connus pour une maladie de Willebrand de type 2 (VWD2)), avant centrifugation (2500g, 40 min à +4°C) et congélation à -20°C pour une durée non précisée (28). Les auteurs concluent que la stabilité du FVIII est de moins de 6h pour des taux normaux, de moins de 3h pour des taux diminués et que les prélèvements ne doivent pas être acheminés et conservés dans la glace avant centrifugation. Cependant, les résultats de cette étude sont à interpréter avec réserves, les conditions de centrifugation des tubes primaires à +4°C n'étant pas en conformité avec les recommandations actuelles. Mais cette publication reste la seule à avoir inclus des plasmas de patients avec une maladie hémorragique et le plasma de référence a été traité dans les mêmes conditions.

Les différents articles sont présentés sous forme résumé dans le tableau IV.

**En conclusion, le GFHT recommande de ne pas dépasser 4h de conservation du sang total à TA. Une conservation en sang total est acceptable jusqu'à 6h. La conservation sur glace ou à température réfrigérée est non conforme.**

**Tableau IV : Résumé des études de stabilité du FVIII sur sang total**

Références	Température de conservation	Population Tube	Pré-analytique Méthode de dosage	Stabilité (analyse)
Zürcher, 2008 (4)	Température ambiante et transport à T°C non contrôlée (été et hiver)	N=59 165% (25-75 <sup>e</sup> p : 130-172) Citrate 3,2%	<1h (ref); 4-6; 8-12; 24-28; 48-52h Centrifugation (1500g 10 min) x2 à TA Congélation avant dosage -80°C	<b>Au moins 8-12h</b> (variation moy<10%)
Toulon, 2017 (17)	Température ambiante	N=139 (dont 39 patients sous AVK) Citrate 3,2%	<2h, 4h, 6h et 8h Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée	<b>Au moins 6h pour les taux normaux</b> (tests statistique Wilcoxon et biais comparé à RICOS et GFHT)
Favaloro, 2004 (15)	Température ambiante et 4°C	N=39 (sains) Citrate 3,2%	<b>0 et 3,5h</b> Centrifugation 2500g 15 minutes (T° non précisée) Congélation avant dosage à -80°C	<b>Au moins 3,5h</b> (test statistique)
Kim, 2018 (9)	Température ambiante ou glace	N=22 (sains) 108.3% (sd : 20%) Citrate 3,2%	<b>0, 4h</b> Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage à -70°C	<b>Diminution à 4h</b> (biais considéré comme cliniquement significative par les auteurs si >6% mais ne dépassant pas 10%) <b>Diminution significative à 4h dans la glace</b>
Böhm, 2006 (28)	Température ambiante ou glace pilée	N 10 témoins sains; 10 patients Willebrand type 1 et 5 type 2 Citrate 3,2%	<b>3 et 6h</b> Centrifugation 2500g, 40 min à 4°C congélation avant dosage à -20°C pour tous les points y compris « référence »	<b>6h pour les taux normaux et 3h pour les taux bas à TA</b> (biais par rapport à la référence conservée dans les mêmes conditions + test de Wilcoxon) <b>Diminution significative à 3.5h dans la glace</b>
Refaai, 2006 (27)	Glace	N 10 témoins sains Citrate 3,2%	<b>0 et 3,5h</b> Centrifugation 5000 g 3 min congélation avant dosage à -20°C pour tous les points y compris « référence »	<b>Diminution significative à 3.5h dans la glace</b> (test statistique)

### *b. Stabilité en plasma frais*

D'après le CLSI (H21-A5), le délai de conservation maximal du plasma après centrifugation est de 4h après le prélèvement sur tube citraté, conservé et transporté à TA (3). Quatre études décrites ci-après évaluent la stabilité du FVIII activité coagulante sur plasma frais. Aucune information n'est disponible pour des plasmas de patients substitués par des concentrés de FVIII (classique ou durée de vie augmentée).

L'étude de Heil et coll réalisée en 1998 sur 20 sujets sains et 20 sujets sous héparinothérapie, prélevés sur tube citraté 3.2% a comparé la conservation du plasma frais obtenu par centrifugation immédiate (2000 g +18°C) au réfrigérateur (+6°C) *versus* TA (21°C) jusqu'à 7 jours (10). Les temps étudiés étaient 0h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h et 168h. Cette étude montre une diminution significative (>10%) des taux de FVIII à 8h quels que soient la température et le groupe de sujets : chez les volontaires sains, diminution de 19% et 18% respectivement à +6°C et à TA, chez les patients sous héparinothérapie, diminution de 20% et 18% respectivement à +6°C et à TA. Les auteurs concluent qu'ils supportent les recommandations de réaliser les dosages dans les 4h après le prélèvement.

En 2014, Feng et coll ont évalué la stabilité du FVIII jusqu'à 24h, sur des échantillons centrifugés, décantés et conservés à +4 et +25°C (24). Comparés aux résultats du T0h, une diminution significative des taux de FVIII (> 10% pour plus de 25% des échantillons, n=72 patients asymptomatiques) a été observée dès 4h que ce soit à +4°C ou +25°C (respectivement diminution en moyenne -14.72% et -14.63%), à 2h les variations étaient respectivement en moyenne de -6.98% à +4°C et de -6.09% à +25°C. L'équipe conclut que le FVIII doit être mesuré dans les 2h.

Dans une étude plus récente Linskens et coll. ont étudié la stabilité du FVIII chez 20 volontaires sains dont les prélèvements ont été double centrifugés, aliquotés, conservés de 2h à 48h à TA puis congelés à -20°C pour une durée non précisée (20). L'intérêt de l'étude repose également sur le fait que deux systèmes analytiques ont été étudiés (viscosimétrie avec réactifs Stago® sur STAR Max® et turbidimétrie avec réactifs Werfen® sur ACL-TOP® 350). Une diminution cliniquement significative a été observée à partir de 4h (critère > 10% de différence par rapport à la mesure à T0) pour les deux configurations analytiques : -14.9% (IC -30.2 à +0.4%) pour Stago®, -10.7% (IC -18.4 à 2.9%) pour Werfen®. A 2h, une différence

potentiellement significative a été observée avec le système Stago® avec une moyenne de diminution à -2.1% mais un IC entre -10.9 à 6.7%, avec Werfen®: moyenne -1.8 (IC-8.7 à 5.7%). Les auteurs concluent que le délai de conservation acceptable pour le FVIII sur plasma frais à TA est de 2h, voire strictement inférieur à 2h en fonction des techniques utilisées.

Dans l'étude de Böhm et coll., les auteurs ont étudié la stabilité du FVIII en plasma frais citraté non tamponné (3,2%) conservé après centrifugation (2500g, 40 min à +4°C) et décantation, à TA et sur glace pilée pendant 3h et 6h puis congelé à -20°C pour une durée non précisée et analysé immédiatement après décongélation (28). Ils ont étudiés un groupe de 25 sujets (10 témoins sains, 10 patients connus pour une maladie de Willebrand de type 1 (VWD1) et 5 patients connus pour une maladie de Willebrand de type 2 (VWD2)). Le FVIII diminue significativement en moins de 3h à TA et sur glace pilée chez les témoins sains et les patients avec une maladie de Willebrand. Il n'est pas observé de diminution plus importante quand le plasma est conservé sur glace, contrairement à ce qui est observé avec le sang total, ce qui serait en faveur d'un effet dépendant des plaquettes et de la présence des multimères de haut poids moléculaire du VWF. Les auteurs concluent que les prélèvements ne doivent pas être acheminés et conservés dans la glace avant centrifugation. Cependant, les résultats de cette étude sont à interpréter avec réserves, les conditions de centrifugation des tubes primaires à +4°C n'étant pas en conformité avec les recommandations actuelles.

En résumé, pour la conservation du FVIII en plasma frais, les résultats publiés dans les quatre papiers analysés sont en faveur d'une stabilité strictement inférieure à 4h voire 2h après centrifugation dans certaines circonstances analytiques.

**Le GFHT recommande la réalisation du FVIII dans le plasma sur tube primaire strictement dans les 4h après centrifugation. De principe, une conservation à TA est recommandée après centrifugation.**

### *c. Stabilité en plasma congelé*

Les durées maximales de conservation des plasmas congelés préconisées par le CLSI (H21-A5) (3) s'appuient principalement sur l'étude de Woodhams et coll. et reposent sur l'étude du délai de conservation maximal avant que la variation n'excède +/-5 ou 10% par rapport au taux basal (12). Dans cette étude, les plasmas testés étaient issus de donneurs sains (plasmaphérèse, n=6), valeur moyenne des taux de FVIII non précisée. La variation par

rapport aux taux basal était <10% jusqu'à 18 mois pour une conservation à -74°C (+/-2°C) quelle que soit la nature du tube de stockage et jusqu'à 3 mois pour un stockage en tube de polystyrène conservé à -24°C (+/-2°C) ou 6 mois dans des microtubes en polypropylène à -24°C (+/-2°C) (12). Guder et coll. en 2015 proposait au nom de la société allemande d'hémostase une conservation de 2 semaines à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  (29).

Gosselin et coll. ont rapporté en 2015 une différence statistiquement significative (test de Student) mais non cliniquement significative des valeurs mesurées 1 semaine après congélation à -70°C par rapport aux valeurs basales (extrêmes des taux 6-344%) mesurées moins de 4h après le prélèvement (citrate 3,2%). Il n'y avait pas de mesure au-delà d'une semaine dans cette étude (13).

Zander et coll. ont montré une absence de stabilité des plasmas conservés à -20°C (+/-2°C) avec une différence statistiquement significative (FVIII moyen voisin de 100%), dès 1 semaine et se majorant à 1 mois et 3 mois. En revanche les auteurs rapportent une stabilité du FVIII d'au moins 3 mois lorsque les échantillons sont conservés à -80°C (+/-2°C) ou moins (<-130°C) (pas de mesure au-delà de 3 mois). Les échantillons étaient conservés en microtubes en polypropylène. Les cycles de congélation/décongélation sont responsables de variations significatives que les plasmas soient conservés à -20°C ou  $\leq -80^{\circ}\text{C}$  (30).

Dans une étude portant sur 60 échantillons plasmatiques, Betsou et coll. ont observé une diminution statistiquement significative des résultats du FVIII après conservation 9 ans à -80°C avec un % moyen de variation largement > 10% (68+/-9.8%) , ainsi qu'après 10 cycles de congélation/décongélation (14).

Favaloro et coll. n'ont pas retrouvé de différence significative sur les taux de FVIII dosés après conservation entre 2 et 7 jours à -20°C ou -80°C, mais soulignent l'importance d'une homogénéisation après décongélation avant le dosage du FVIII. Une tendance à une diminution des taux de FVIII étant observée en l'absence d'homogénéisation (31). Ce point est concordant avec l'article de Lima et coll., publié en 2015 , qui retrouvait une différence selon les conditions d'agitation post-décongélation et préconisait une agitation douce par retournement plutôt qu'à l'aide d'une roue tourne tube (32).

L'étude de Zhao et coll. publiée en 2017 qui repose sur des données issues de 144 sujets sains adultes (36 patients par condition de stockage, dosages réalisés sur deux automates

CS5100 et CA7000 Sysmex, après 15 jours, 1 mois, 3 mois, 6 mois et 1 an de conservation), a montré une diminution statistiquement significative des taux dès un mois de conservation à -80°C pour un dosage réalisé sur CS5100 et dès 15 jours à -20°C ou -80°C si le dosage est réalisé sur un automate CA7000 (25). Si l'on considère, un seuil de 10% de variation par rapport au taux de FVIII de référence, alors les différences semblent significatives à partir de 3 mois à -80°C (variation moyenne : -13.11% sur CA7000 et -10.1% sur CS5100). La variation est ensuite stable jusqu'à un an, dernier temps étudié. A -20°C dès 1 mois les variations dépassent le seuil de 10% (variation moyenne : -10.68% sur CA7000 et -16.58% sur CS5100) (25).

**En conclusion, au vu des résultats publiés, le GFHT recommande une conservation limitée à 7 jours des plasmas à conservés à  $T^{\circ}\leq -20^{\circ}\text{C}$ . La conservation est acceptable jusqu'à 15 jours à  $T^{\circ}\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Pour les conservations des plasmas à  $T^{\circ}\leq -70^{\circ}\text{C}$ , idéalement la conservation doit être inférieure à 3 mois, acceptable jusqu'à 18 mois. Le GFHT recommande une conservation en tube polypropylène par rapport au polystyrène et une homogénéisation douce des plasmas après décongélation.**

### Synthèse

- **Stabilité du facteur VIII conservé en sang total à TA: recommandée de 4 heures, acceptable jusqu'à 6 heures.**
- **Une conservation en sang total à température réfrigérée ou dans la glace est non conforme.**
- **Stabilité du facteur VIII en plasma sur tube primaire centrifugé et conservé à TA: recommandée pour un délai strictement inférieure à 4 heures.**
- Une conservation du plasma à température réfrigérée ou dans la glace est non recommandée.
- **Stabilité du facteur VIII dans les plasmas congelés à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ : recommandée 7 jours, acceptable jusqu'à 15 jours.**
- **Stabilité du facteur VIII dans les plasmas congelés à  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ : recommandée jusqu'à 3 mois, acceptable jusqu'à 18 mois.**

- Le GFHT recommande une conservation en tube polypropylène par rapport au polystyrène et une homogénéisation douce des plasmas après décongélation.

- En l'absence de données, le GFHT ne se prononce pas quand à la stabilité du FVIII dans des échantillons issus de patients substitués par concentrés de FVIII

## 7. Le facteur Willebrand (antigène et activité)

Dans les différentes études, aucune information n'est disponible sur la possibilité qu'il s'agisse ou non de plasmas de patients substitués par des concentrés de facteur von Willebrand (VWF).

### a. Stabilité en sang total

Pour le VWF, le CLSI (H21-A5) (3) recommande un délai maximal de conservation de 4h après le prélèvement en sang total citraté sur des échantillons transportés et conservés à TA, ce qui est cohérent avec ce que préconise Adcock en 2016 (26). Une conservation du prélèvement en sang total au-delà de 4h à TA induit un risque de diminution du taux de VWF. Le CLSI (H21-A5) et Adcock rendent inacceptable la conservation du prélèvement à température réfrigérée ou dans la glace en raison d'un risque de diminution du taux de VWF.

L'étude de Zürcher et coll., a évalué la stabilité du VWF en sang total citraté (3,2%) (4). Les échantillons issus de 59 patients de consultation de thrombophilie (12 sous traitement AVK, aucun sous héparine), sont transportés par une personne à température extérieure (-12°C à +10°C en hiver et +11°C à +29°C en été) puis conservés à TA (20 à 25°C) sur des périodes de 4-6h, 8-12h, 24-28h et 48-52h, avant double centrifugation (1500g, deux fois 10 min, +20°C) et congélation à -80°C pendant une durée non spécifiée. Aucune variation significative liée au transport n'était observée entre l'hiver et l'été. Les échantillons sont décongelés à +37°C pendant 5 min, brièvement vortexés et analysés immédiatement. Les résultats de VWF:Ag et VWF cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) sont comparés avec un échantillon de référence, transporté par pneumatique, centrifugé dans l'heure suivant le prélèvement, congelé et analysé immédiatement après décongélation. Aucun impact clinique (i.e différence < 10% de la valeur du tube référence) n'a été constatée jusqu'à 48-52h de conservation en sang

total et aucune différence statistiquement significative n'a été observée jusqu'à 8-12h de conservation en sang total.

L'étude de Favaloro et coll. a évalué la stabilité du VWF en sang total citraté (3,2%) de 39 volontaires sains. Les prélèvements sont conservés pendant 3,5h à TA et à +4°C avant centrifugation (2500g, 15 min, température non précisée), congelés à -80°C pendant une période non précisée et analysés immédiatement après décongélation (15). Les taux de VWF antigène (VWF:Ag) et VWF activité de liaison au collagène (VWF:CB) obtenus sur les prélèvements conservés à TA pendant 3,5h ne montrent pas de différence statistiquement significative avec les taux obtenus sur les échantillons de référence centrifugés immédiatement après le prélèvement. Une diminution significative du VWF:Ag et du VWF:CB est constatée sur les échantillons conservés à +4°C pendant 3,5h pouvant entraîner un diagnostic erroné de maladie de Willebrand (VWD) et/ou un rapport VWF:CB /VWF:Ag sous-estimé induisant un risque d'erreur de typage de la VWD. Ces résultats sont confirmés par l'étude de Refaai et coll (27) qui suggère que dans des conditions réfrigérées, le FVIII et le facteur Willebrand forment un cryoprécipité qui est réversible après réchauffage du sang total à +37°C.

Dans leur étude, Böhm et coll. ont étudié la stabilité du VWF en sang total citraté (3,2%, non tamponné) à TA et sur glace pilée pendant 3h et 6h, sur un groupe de 25 sujets (10 témoins sains, 10 patients connus pour une maladie de Willebrand de type 1 (VWD1) et 5 patients connus pour une maladie de Willebrand de type 2 (VWD2)), avant centrifugation (2500g, 40 min à +4°C) et congélation à -20°C pour une durée non précisée (28). Cette étude montre que les taux de VWF:Ag et de VWF:RCo sont stables pendant 6h à TA chez les témoins sains et les patients avec une VWD1. Sur glace pilée, les taux de VWF:Ag et de VWF:RCo diminuent significativement en moins de 3h chez les témoins sains et les patients avec une VWD1. La diminution du taux de VWF:RCo est plus marquée avec une sous-estimation du ratio VWF:RCo/VWF:Ag induisant un risque de faux diagnostic de VWD de type 2. L'hypothèse des auteurs est que la diminution du VWF en sang total dans la glace serait due à une fixation des multimères de haut poids moléculaires du VWF sur les récepteurs GP1b $\alpha$  plaquettaires exposés par le froid. Cependant, les résultats de cette étude sont à interpréter avec



réserve, les conditions de centrifugation des tubes primaires à +4°C n'étant pas en conformité avec les recommandations actuelles.

L'étude de Kim et coll. évalue la stabilité du VWF en sang total citraté (3,2%) de 22 volontaires sains, à TA et dans la glace (0°C) pendant 4h avant centrifugation (obtention de plasma pauvre en plaquettes sans précision) et congélation immédiatement à -70°C sans durée précisée (9). Les échantillons sont analysés immédiatement après décongélation à +37°C pendant 5 minutes et mélange. Aucune différence significative, ni statistique ni clinique (variation clinique significative quand > 6% de l'échantillon de référence), n'a été constatée sur les taux de VWF:Ag et de VWF:RCo jusqu'à 4h de conservation à TA. Les résultats montrent une diminution statistiquement significative du VWF:Ag et du VWF:RCo dans les 4h dans la glace. Une variation cliniquement significative du VWF:Ag et VWF:RCo est également observée dans la glace (respectivement -9,5% et -18,8%) à 4h de conservation.

Les différents articles sont présentés sous forme résumé dans le tableau V.

**Le GFHT recommande la réalisation du dosage de VWF antigène ou activité sur sang total jusqu'à 6h à TA. Mais une conservation du prélèvement jusqu'à 48h à TA est acceptable pour des taux normaux. Les données au-delà de 6h pour les prélèvements pathologiques sont insuffisantes. Une conservation sur glace ou à température réfrigérée est non conforme.**

**Tableau V : Résumé des études de stabilité du VWF sur sang total**

Références	Température de conservation	Population Tube	Pré-analytique Méthode de dosage	Stabilité (analyse)
Zürcher, 2008 (4)	Température ambiante et transport à T°C non contrôlée (été et hiver)	N=59 132% (25-75 <sup>e</sup> p : 100-160) Citrate 3,2%	<1h (ref); 4-6; 8-12; 24-28; 48-52h Centrifugation (1500g 10 min) x2 à TA Congélation avant dosage -80°C VWF :Ag et VWF :RCo	<b>Au moins 48-72h</b> (variation moy<10%) Au moins 8-12h (analyse statistique)
Favaloro, 2004 (15)	Température ambiante et 4°C	N=39 (sains) Citrate 3,2%	<b>0 et 3,5h</b> Centrifugation 2500g 15 minutes (T° non précisée) Congélation avant dosage à -80°C VWF :Ag et VWF :CB	<b>Au moins 3,5h</b> (test statistique)
Kim, 2018 (9)	Température ambiante ou glace	N=22 (sains) 108.3% (sd : 20%) Citrate 3,2%	<b>0, 4h</b> Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage à -70°C VWF :Ag et VWF :RCo	<b>Diminution à 4h</b> (biais considéré comme cliniquement significative par les auteurs si >6% mais ne dépassant pas 10%) <b>Diminution significative à 4h dans la glace</b>
Böhm, 2006 (28)	Température ambiante ou glace pilée	N 10 témoins sains; 10 patients Willebrand type 1 et 5 type 2 Citrate 3,2%	<b>3 et 6h</b> Centrifugation 2500g, 40 min à 4°C congélation avant dosage à -20°C pour tous les points y compris « référence » VWF :Ag et VWF :RCo	<b>6h pour les taux normaux et Willebrand de type 1 (Willebrand de type 2 : 1/2 diminution de 23% de FVW :RCo à 3h et 2/3 stable à 6h, 3/5 patients FVW :RCo indosable à T0 ; 6/6 VWF :Ag stable à 6h)</b> (biais par rapport à la référence conservée dans les mêmes conditions + test de Wilcoxon) <b>Diminution significative à 3.5h dans la glace</b>
Refaai, 2006 (27)	Glacé	N 10 témoins sains Citrate 3,2%	<b>0 et 3,5h</b> Centrifugation 5000 g 3 min congélation avant dosage à -20°C pour tous les points y compris « référence » VWF :Ag et VWF :RCo	<b>Diminution significative à 3.5h dans la glace</b> (test statistique)

### *b. Stabilité en plasma frais*

Pour le VWF, d'après le CLSI, le délai de conservation maximal du plasma après centrifugation est de 4h après le prélèvement sur tube citraté, conservé et transporté à TA (3). Seulement deux études décrites ci-après évaluent la stabilité de VWF:Ag et du VWF:RCo sur plasma frais. Aucune information n'est disponible pour les autres techniques (VWF:CB ...) ni pour des plasmas de patients substitués pas des concentrés de facteur Willebrand.

Dans l'étude de Böhm et coll., les auteurs ont étudié la stabilité du facteur Willebrand (dosage VWF:Ag et VWF:RCo) en plasma frais citraté non tamponné (3,2%) conservé, après centrifugation (2500g, 40 min à +4°C) et décantation, à TA et sur glace pilée pendant 3h et 6h puis congelé à -20°C pour une durée non précisée et analysé immédiatement après décongélation (28). Ils ont étudié un groupe de 25 sujets (10 témoins sains, 10 patients connus pour une maladie de Willebrand de type 1 (VWD1) et 5 patients connus pour une maladie de Willebrand de type 2 (VWD2)). Cette étude montre que les taux de VWF:Ag et de VWF:RCo sont stables pendant 6h à TA et sur glace pilée chez les témoins sains et les patients avec une VWD1. Il n'est pas observé de diminution plus importante quand le plasma est conservé sur glace, contrairement à ce qui est observé avec le sang total, ce qui serait en faveur d'un effet dépendant des plaquettes et de la présence des multimères de haut poids moléculaire du VWF : hypothèse d'une augmentation de la fixation de la GPIIb/IIIa au VWF taille dépendante (multimères de haut poids moléculaire et de poids intermédiaire), avec une perte moins importante chez les patients VWD2A et VWD2B. Les auteurs concluent que les prélèvements ne doivent pas être acheminés et conservés dans la glace avant centrifugation. Cependant, les résultats de cette étude sont à interpréter avec réserves, les conditions de centrifugation des tubes primaires à +4°C n'étant pas en conformité avec les recommandations actuelles.

La seconde étude plus récente de Linskens et coll. a évalué la stabilité du VWF:Ag et du VWF:RCo chez 20 volontaires sains dont les prélèvements ont été double centrifugés, aliquotés, conservés de 2 à 48h à TA puis congelés à -20°C pour une durée non précisée (20). Les taux de VWF:Ag et de VWF:RCo sont restés stables jusqu'à 48h : différence moyenne de 2.7% (IC -1.0 à 6.3%) et -2.3% (IC -6.2 à 2.2%) pour respectivement VWF:Ag et VWF:RCo. Les auteurs concluent que le délai de conservation acceptable pour le VWF:Ag et le VWF:RCo sur plasma frais à TA est de 48h.

En conclusion, pour le VWF:Ag et le VWF:RCo, les deux seules études disponibles montrent une stabilité en plasma frais jusqu'à au moins 6h (pas de mesure au-delà de 6h) pour Böhm et coll. incluant des plasmas de patients avec maladie de Willebrand et 48h pour Linskens et coll. pour des plasmas de volontaires sains. Les dosages du VWF étant généralement associés à ceux du FVIII, le dosage du VWF dans des délais compatibles avec la stabilité du FVIII est recommandé.

**Le GFHT recommande la réalisation du dosage de VWF antigène ou activité sur le plasma jusqu'à 6h à TA. Mais une conservation du plasma jusqu'à 48h à TA est acceptable pour des taux normaux. Les données au-delà de 6h pour les plasmas pathologiques sont insuffisantes. De principe, une conservation à TA est recommandée après centrifugation.**

### *c. Stabilité en plasma congelé*

Très peu de publications sont disponibles sur la stabilité du facteur Willebrand après congélation. Dans l'étude de Woodhams et coll., qui ne concernait que le VWF:Ag (dosage Liatest® STAGO), les plasmas testés étaient issus de donneurs sains (plasmaphérèse, n=6), valeur moyenne des taux de VWF non précisée, les dosages étaient réalisés à T0 puis après une conservation de 2 semaines, 1 mois puis tous les mois jusqu'à 24 mois (12). Les variations par rapport aux taux basals étaient < à 5% jusqu'à 12 mois et < à 10% jusqu'à 24 mois (temps maximum étudié) pour une conservation à -24°C (+/-2°C) ou -74°C (+/-2°C) et ce quelle que soit la nature du tube de stockage. Favaloro et coll. n'ont pas retrouvé de différence significative sur les taux de VWF (antigène, liaison au collagène ou activité co-facteur de la ristocétine) dosés après conservation entre 2 et 7 jours à -20°C ou -80°C. En revanche, lors de la décongélation, l'absence d'homogénéisation des plasmas après décongélation était responsable d'une diminution significative et importante des taux de VWF par toutes les techniques de dosages (31), ceci pouvant conduire à une erreur de diagnostic de maladie de Willebrand.

**En conclusion, le GFHT recommande une conservation limitée à  $T^{\circ}\leq-20^{\circ}\text{C}$  ou  $T^{\circ}\leq-70^{\circ}\text{C}$  des plasmas pour les dosages de l'activité du VWF ( $\leq 7$  jours), il n'y pas de données pour les mesures d'activité au-delà de 7 jours. Pour le dosage du VWF:Ag, les prélèvements sont stables jusqu'à 12 mois à  $\leq-20^{\circ}\text{C}$  et jusqu'à 24 mois à  $\leq-70^{\circ}\text{C}$ .**

### Synthèse

- **Stabilité du facteur Willebrand conservé en sang total et plasma à TA: recommandée jusqu'à 6 heures**, acceptable jusqu'à 48 heures pour des taux normaux.
- Une conservation en sang total à température réfrigérée ou dans la glace est non conforme.
- Une conservation du plasma à température réfrigérée ou dans la glace est non recommandée.
- **Stabilité du facteur Willebrand (activité) dans les plasmas congelés : recommandée 7 jours à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  ou  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ .**
- **Stabilité du facteur Willebrand (antigène) dans les plasmas congelés : recommandée jusqu'à 12 mois à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  et jusqu'à 24 mois à  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ .**
- **Le GFHT recommande une homogénéisation douce des plasmas après décongélation.**

## 8. Les anticoagulants oraux directs

Les anticoagulants oraux directs ne requérant pas de surveillance biologique systématique, les conditions de réalisation des dosages, et notamment les délais avant réalisation ont fait l'objet de peu d'études. Les recommandations proposées par le GFHT reposent donc sur une bibliographie pauvre, de nombreux points sont donc en « données insuffisantes ».

### 1) Apixaban (dosage par méthode chromogénique anti-FXa)

#### a. Stabilité en sang total

Une seule étude a étudié spécifiquement la stabilité en sang total, sur 5 plasmas issus de patients traités par apixaban : une stabilité d'au moins 2h (durée maximale étudiée) à TA est rapportée (33).

Les récentes recommandations de l'*International Council for Standardization in Haematology* (ICSH) recommandent un traitement de l'échantillon dans les 4h après prélèvement, sans que cette pratique soit argumentée par les auteurs (34).

#### b. Stabilité en plasma frais

Selon 2 études *in vitro* réalisées chacune sur 3 plasmas enrichis, l'apixaban (mesuré par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)) est stable au moins 24h (35), et jusqu'à 14 jours (36), à TA et à +2-8°C.

Deux études ont été réalisées sur plasmas issus de patients traités par apixaban. La première (n=10 patients) rapporte une stabilité d'au moins 8h (durée maximale étudiée) à TA, et d'au moins 48h (durée maximale étudiée) à +5°C (33). Les récentes recommandations de l'ICSH reposent sur cette étude et préconisent une analyse dans les 8h après prélèvement, et au-delà une conservation réfrigérée pendant 48h maximum (34). Mais une seconde étude publiée après ces recommandations et réalisée sur 45 échantillons rapporte une stabilité d'au moins 7 jours (durée maximale étudiée) sur plasma centrifugé dans les 4h après prélèvement et conservé à TA sur tube primaire non décanté (37).

#### c. Stabilité en plasma congelé

Sur une petite série de 10 plasmas issus de patients traités par apixaban, une stabilité d'au moins 30 jours à -20°C (durée maximale étudiée) est rapportée (33). A -80°C, les seules

données disponibles sont issues d'une seule étude sur 3 plasma enrichis analysés par LC-MS, rapportant une stabilité de 72 jours (durée maximale étudiée) (35).

Les études sur plasma enrichis analysés par LC-MS rapportent l'absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation sur l'apixaban (35,36). Cette notion est reprise dans les recommandations de l'ICSH (34). En revanche, la seule étude réalisée sur plasmas de patients analysés par méthode chromogénique anti-FXa retrouve un impact significatif de 3 cycles successifs de congélation/décongélation (33).

### **Synthèse**

- **Stabilité de l'apixaban conservé en sang total à TA: acceptable jusqu'à 2 heures (mesure chromogénique), données insuffisantes au-delà.**
- **Stabilité de l'apixaban en plasma sur tube primaire centrifugé et conservé à TA: recommandée jusqu'à 7 jours (mesure chromogénique)**
- **Stabilité de l'apixaban dans les plasmas congelés à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ : recommandée 30 jours (mesure chromogénique).** A des  $T^{\circ}\leq -70^{\circ}\text{C}$ , la durée de conservation est probablement plus longue mais l'absence de données ne permet pas au GFHT de se prononcer.
- **Un unique cycle de congélation/décongélation est recommandé.**

### ***2) Edoxaban (dosage par méthode chromogénique anti-FXa)***

Une seule étude, réalisée sur 3 échantillons de plasma enrichis analysés par LC-MS, porte sur la stabilité de l'edoxaban (36). Aucune étude n'a été réalisée sur plasmas issus de patients traités par edoxaban. En l'absence de données, le GFHT ne se prononce pas quant aux délais acceptables pour réaliser un dosage chromogénique anti-FXa d'edoxaban.

### **Synthèse**

En l'absence de données, le GFHT ne se prononce pas quant aux délais acceptables pour réaliser un dosage chromogénique anti-FXa d'edoxaban.

### 3) Rivaroxaban (dosage par méthode chromogénique anti-FXa)

#### a. Stabilité en sang total

Une seule étude a évalué spécifiquement la stabilité en sang total, sur 5 plasmas issus de patients traités par rivaroxaban : une stabilité à TA d'au moins 2h (durée maximale étudiée) est rapportée (33).

Les récentes recommandations de l'ICSH recommandent un traitement de l'échantillon dans les 4h après prélèvement, sans que cette pratique soit argumentée par les auteurs (34).

#### b. Stabilité en plasma frais

Selon 2 études *in vitro* réalisées chacune sur 3 plasmas enrichis, le rivaroxaban mesuré par LC-MS est stable au moins 24h (35), et jusqu'à 14 jours (36) à TA et à +2-8°C.

Deux études ont été réalisées à partir de plasmas de patients traités par rivaroxaban. La première étude (n=10 patients) rapporte une stabilité d'au moins 8h (durée maximale étudiée) à TA, et d'au moins 48h (durée maximale étudiée) à +5°C (33). Les récentes recommandations de l'ICSH reposent sur cette étude et préconisent une analyse dans les 8h après prélèvement, et au-delà une conservation réfrigérée pendant 48h maximum (34). Mais une seconde étude publiée après ces recommandations et réalisée sur 40 échantillons rapporte une stabilité d'au moins 7 jours (durée maximale étudiée) sur plasma centrifugé dans les 4h après prélèvement et conservé à TA sur tube primaire non décanté (37).

#### c. Stabilité en plasma congelé

Sur une petite série de 10 plasmas issus de patients traités par rivaroxaban, une stabilité d'au moins 30 jours (durée maximale étudiée) à -20°C est rapportée (33). A -80°C, les seules données disponibles sont issues d'une seule étude sur 3 plasma enrichis analysés par LC-MS, rapportant une stabilité de 72 jours (durée maximale étudiée) (35).

Les études sur plasma enrichis analysés par LC-MS rapportent l'absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation sur le rivaroxaban (35,36), confirmée sur plasmas de patients par méthode chromogénique anti-FXa (33). Cette notion est reprise dans les recommandations de l'ICSH (34).



## Synthèse

- **Stabilité du rivaroxaban conservé en sang total à TA: acceptable jusqu'à 2 heures (mesure chromogénique), données insuffisantes au-delà.**
- **Stabilité du rivaroxaban en plasma sur tube primaire centrifugé et conservé à TA: recommandée jusqu'à 7 jours (mesure chromogénique).**
- **Stabilité du rivaroxaban dans les plasmas congelés à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ : recommandée 30 jours (mesure chromogénique).** A des  $T^{\circ}\leq -70^{\circ}\text{C}$ , la durée de conservation est probablement plus longue mais l'absence de données ne permet pas au GFHT de se prononcer.
- Un échantillon peut subir jusqu'à 3 cycles de congélation/décongélation sans impact significatif.

### 4) *Dabigatran (dosage fonctionnel)*

#### *a. Stabilité en sang total*

Une seule étude a évalué spécifiquement la stabilité en sang total du dabigatran, dosé par temps de thrombine dilué (Hemoclot® Hyphen Biomed). Sur 5 plasmas issus de patients traités, une stabilité d'au moins 2h (durée maximale étudiée) à TA est rapportée (33).

Les récentes recommandations de l'ICSH recommandent un traitement de l'échantillon dans les 4h après prélèvement, sans que cette pratique soit argumentée par les auteurs (34).

#### *b. Stabilité en plasma frais*

Selon 2 études *in vitro* réalisées chacune sur 3 plasma enrichis, le dabigatran dosé par LC-MS est stable au moins 24h (35) et jusqu'à 14 jours (36), à TA et à  $+2-8^{\circ}\text{C}$ . En revanche, sur 8 plasmas enrichis dosés par temps de thrombine (STA®-Thrombin et HemosIL®TT), une différence statistiquement significative est retrouvée dès 4h de conservation à TA. La différence n'a pas été analysée du point de vue clinique. Les auteurs préconisent donc de réaliser les tests dans un délai inférieur à 2h à TA ou une conservation jusqu'à 24h à  $+2-8^{\circ}\text{C}$  (38).

La seule étude réalisée sur des plasmas de patients traités par dabigatran (n=10) analysés par temps de thrombine dilué (Hemoclot® Hyphen Biomed) rapporte une stabilité de 2h à TA (la durée maximale étudiée était de 8h), et l'absence de stabilité à +2-8°C (33).

Les récentes recommandations de l'ICSH préconisent un délai maximal de 24h pour les dosages par LC-MS. Dans le cas des techniques fonctionnelles (temps de thrombine) un délai maximum de 4h est préconisé (34).

### *c. Stabilité en plasma congelé*

Sur une petite série de 10 plasmas issus de patients traités par dabigatran, une stabilité d'au moins 30 jours à -20°C (durée maximale étudiée) est rapportée (33). A -80°C, les seules données disponibles sont issues d'une seule étude sur 3 plasma enrichis analysés par LC-MS, rapportant une stabilité de 72 jours (36).

Les études sur plasmas enrichis analysés par LC-MS rapportent l'absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation sur le dabigatran (35,36). Cette notion est reprise dans les recommandations de l'ICSH (34). En revanche, la seule étude réalisée sur plasmas de patients traités analysés par temps de thrombine dilué (Hemoclot® Hyphen Biomed) retrouve un impact significatif de 3 cycles successifs de congélation/décongélation (33).

### **Synthèse**

- **Stabilité du dabigatran conservé en sang total à TA : acceptable jusqu'à 2 heures** (dosage fonctionnel).
- **Stabilité du dabigatran en plasma sur tube primaire centrifugé et conservé à TA : recommandée jusqu'à 2 heures et acceptable jusqu'à 4 heures à TA ou réfrigérée** (dosage fonctionnel basé sur le temps de thrombine). **Les délais en plasmas ne sont pas cumulables avec le délai sur sang total.**
- Une conservation du plasma au-delà de 24h à TA ou réfrigérée n'est pas recommandée.
- **Stabilité du dabigatran dans les plasmas congelés à  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  : recommandée 30 jours (dosage fonctionnel)**. A des  $T^{\circ}\leq -70^{\circ}\text{C}$ , la durée de conservation est probablement plus longue mais l'absence de données ne permet pas au GFHT de se prononcer.
- **Un unique cycle de congélation/décongélation est recommandé.**

## 9. Références

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 | Legifrance [Internet]. 2016. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2016/12/15/AFSP1637323A/jo/texte>
2. Vaubourdolle M, Alvarez J-C, Barbé F, et al. Critical care testing: SFBC recommendations in 2018. *Ann Biol Clin (Paris)* 2018; 76: 23–44.
3. Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchand K, et al. CLSI Document H21-A5. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays. *Approv Guidel-Fifth Ed Clin Lab Stand Inst* 2008; 28: .
4. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, et al. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* [Internet] 2008 [cited 2018 Sep 14]; . Available from: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH07-07-0448>
5. Luddington R, Peters J, Baker P, et al. 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.
6. 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.
7. van Balveren JA, Huijskens MJ, Gemen EF, et al. Effects of time and temperature on 48 routine chemistry, haematology and coagulation analytes in whole blood samples. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med* 2017; 54: 448–62.
8. 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.
9. Kim YA, Lewandrowski KB, Lucien F-A, et al. The effects of transport temperature and time on routine and specialized coagulation assays: *Blood Coagul Fibrinolysis* 2018; 1.
10. Heil W, Grunewald R, Amend M, et al. Influence of Time and Temperature on Coagulation Analytes in Stored Plasma. *Clin Chem Lab Med* [Internet] 1998 [cited 2018 Sep 14]; 36: . Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.1998.36.issue-7/cclm.1998.077/cclm.1998.077.xml>
11. Rimac V, Coen Herak D. Is it acceptable to use coagulation plasma samples stored at room temperature and 4°C for 24 hours for additional prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, antithrombin, and D-dimer testing? *Int J Lab Hematol* 2017; 39: 475–81.
12. Woodhams B, Girardot O, Blanco M-J, et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma: *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 229–36.

13. 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.
14. Betsou F, Roussel B, Guillaume N, et al. Long-term stability of coagulation variables: Protein S as a biomarker for preanalytical storage-related variations in human plasma. *Thromb Haemost* [Internet] 2009 [cited 2018 Sep 14]; . Available from: <http://www.schattauer.de/index.php?id=1214&doi=10.1160/TH08-10-0679>
15. 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.
16. Toulon P, Abecassis L, Smahi M, et al. 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.
17. Toulon P, Metge S, Hangard M, et al. Impact of different storage times at room temperature of unspun citrated blood samples on routine coagulation tests results. Results of a bicenter study and review of the literature. *Int J Lab Hematol* 2017; 39: 458–68.
18. Leeming DR, Craig S, Stevenson KJ, et al. The determination of INR in stored whole blood. *J Clin Pathol* 1998; 51: 360–3.
19. Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralized anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haematol* 1997; 96: 431–4.
20. Linskens EA, Devreese KMJ. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hematol* 2018; 40: 292–303.
21. O'Neill EM, Rowley J, Hansson-Wicher M, et al. Effect of 24-hour whole-blood storage on plasma clotting factors. *Transfusion (Paris)* 1999; 39: 488–91.
22. Christensen TD, Jensen C, Larsen TB, et al. 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.
23. Palmer RN, Gralnick HR. Cold-induced contact surface activation of the prothrombin time in whole blood. *Blood* 1982; 59: 38–42.
24. Feng L, Zhao Y, Zhao H, et al. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep* [Internet] 2015 [cited 2018 Sep 14]; 4: . Available from: <http://www.nature.com/articles/srep03868>
25. Zhao Y, Feng G, Zhang J, et al. Effects of preanalytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and IX activity. *Sci Rep* 2017; 7: 12179.
26. Adcock DM, Favaloro EJ, Lippi G. Critical pre-examination variables in the hemostasis laboratory and their quality indicators. *Clin Biochem* 2016; 49: 1315–20.

27. Refaai MA, Van Cott EM, Lukoszyk M, et al. Loss of factor VIII and von Willebrand factor activities during cold storage of whole blood is reversed by rewarming. *Lab Hematol Off Publ Int Soc Lab Hematol* 2006; 12: 99–102.
28. Böhm M, Täschner S, Kretzschmar E, et al. 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 Int J Haemost Thromb* 2006; 17: 39–45.
29. Guder WG, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, et al. Quality of Diagnostic Samples - Recommendations of the Working Group on Preanalytical Quality of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2010.
30. Zander J, Bruegel M, Kleinhempel A, et al. Effect of biobanking conditions on short-term stability of biomarkers in human serum and plasma. *Clin Chem Lab Med [Internet]* 2014 [cited 2018 Sep 14]; 52: . Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2014.52.issue-5/cclm-2013-0705/cclm-2013-0705.xml>
31. Favaloro EJ, Oliver S, Mohammed S, et al. Potential misdiagnosis of von Willebrand disease and haemophilia caused by ineffective mixing of thawed plasma. *Haemophilia* 2017; 23: e436–43.
32. Lima-Oliveira G, Adcock DM, Salvagno GL, et al. Mixing of thawed coagulation samples prior to testing: Is any technique better than another? *Clin Biochem* 2016; 49: 1399–401.
33. McGrail R, Revsholm J, Nissen PH, et al. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. *Thromb Res* 2016; 148: 107–10.
34. Gosselin R, Adcock D, Bates S, et al. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost [Internet]* 2018 [cited 2018 Sep 11]; . Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1627480>
35. Schmitz EMH, Boonen K, van den Heuvel DJA, et al. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1636–46.
36. Gous T, Couchman L, Patel JP, et al. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry: *Ther Drug Monit* 2014; 36: 597–605.
37. Boissier E, Genebrier S, Lakhil K, et al. Rivaroxaban and Apixaban Anti-Xa Measurements: Impact of Plasma Storage for 7 Days at Room Temperature. *Thromb Haemost* 2018; 118: 1488–90.
38. Lessire S, Douxfils J, Baudar J, et al. Is Thrombin Time useful for the assessment of dabigatran concentrations? An in vitro and ex vivo study. *Thromb Res* 2015; 136: 693–6.