



**Propositions pré-analytiques en hémostase :
Stabilité des paramètres d'hémostase spécialisée et délais
de réalisation des examens (partie 3)**

Juin 2020

Rédaction : Céline Desconclois, Claire Flaujac

Relecture : Odile Crepin, Emmanuel De Maistre, Claire Espanel, Florence Fischer, Martine Alhenc Gelas, Jean Marc Giannoli, Isabelle Guin, Laetitia Mauge, Pierre Toulon

Vérification et Approbation : Elodie Boissier, Céline Desconclois, Claire Flaujac, Marie-Françoise Hurtaud-Roux

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Sommaire..... | 2 |
| Abréviations..... | 4 |
| 1. Introduction | 5 |
| a. Méthodologie | 5 |
| b. Echantillons transportés en carboglace | 8 |
| 2. Protéine C (activité et antigène) | 12 |
| c. Stabilité en sang total..... | 12 |
| d. Stabilité en plasma frais | 14 |
| e. Stabilité en plasma congelé..... | 15 |
| 3. Protéine S (activité fonctionnelle et antigène) | 19 |
| a. Stabilité en sang total..... | 19 |
| b. Stabilité en plasma frais | 22 |
| c. Stabilité en plasma congelé..... | 24 |
| 4. Résistance à la protéine C activée..... | 28 |
| a. Stabilité en sang total..... | 28 |
| b. Stabilité en plasma frais | 31 |
| c. Stabilité en plasma congelé..... | 32 |
| 5. Temps de thrombine..... | 34 |
| a. Stabilité en sang total..... | 34 |
| b. Stabilité en plasma frais | 35 |
| c. Stabilité en plasma congelé..... | 38 |
| 6. Temps de reptilase | 41 |
| a. Stabilité en sang total..... | 41 |
| b. Stabilité en plasma frais | 41 |
| c. Stabilité en plasma congelé..... | 42 |
| 7. Recherche d'un anticoagulant circulant de type lupique | 42 |
| a. Stabilité en sang total..... | 43 |
| b. Stabilité en plasma frais | 45 |
| c. Stabilité en plasma congelé..... | 46 |
| 8. Facteur XI (activité coagulante) | 50 |
| a. Stabilité en sang total..... | 50 |
| b. Stabilité en plasma frais | 51 |
| c. Stabilité en plasma congelé..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 9. Facteur XII (activité coagulante) | 55 |
| a. Stabilité en sang total..... | 55 |
| b. Stabilité en plasma frais | 56 |
| c. Stabilité en plasma congelé..... | 57 |
| 10. Facteur XIII (antigène et activité)..... | 59 |
| a. Stabilité en sang total..... | 60 |
| b. Stabilité en plasma frais | 61 |
| c. Stabilité en plasma congelé..... | 61 |
| 11. Références..... | 63 |

Abréviations

| | |
|-------|---|
| AC | Activité coagulante |
| ACC | Anticoagulant circulant |
| AOD | Anticoagulants oraux directs |
| Ag | Antigène |
| AVK | Anti-vitamine K |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CPD | Citrate phosphate dextrose |
| CTAD | Citrate théophylline adénosine dipyridamole |
| DRVVT | Test de venin de vipère Russel dilué |
| FXI | Facteur XI |
| FXII | Facteur XII |
| FXIII | Facteur XIII |
| GFHT | Groupe Français d'études sur l'Hémostase et la Thrombose |
| HBPM | Héparine de bas poids moléculaire |
| HNF | Héparine non fractionnée |
| ISTH | International Society of Thrombosis and Haemostasis |
| LA | Lupus anticoagulant |
| LA1 | Lupus anticoagulant temps 1 (recherche) |
| LA2 | Lupus anticoagulant temps 2 (confirmation) |
| PC | Protéine C |
| PCa | Protéine C activée |
| PPP | Plasma pauvre en plaquettes |
| PS | Protéine S |
| PSL | Protéine S libre |
| SCT | <i>Silice clotting time</i> ou temps de coagulation avec silice |
| TA | Température ambiante |
| TP | Taux de prothrombine |
| TR | Temps de reptilase |
| TT | Temps de thrombine |
| TCA | Temps de céphaline avec activateur |
| RPCA | Résistance à la protéine C activée |

1. Introduction

a. Méthodologie

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-janvier 2019) afin d'émettre des recommandations ou propositions 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 ou propositions ont une répercussion non seulement sur les bonnes pratiques d'un laboratoire d'hémostase mais aussi sur les instructions 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 de l'analyte à doser le moins stable.** De même, en cas de gestion de prélèvements en urgence, les délais de rendu des 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 (Arrêté du 15 décembre 2016), et/ou à celles proposées par la Société Française de Biologie Clinique (Vaubourdolle et al. 2018). Ces délais de rendu de résultats en urgence restent conformes aux délais de conservation proposés par le GFHT.

Ce document complète ceux précédemment mis en ligne sur le site du GFHT en 2017, et janvier 2019 et qui concernaient 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))

([recommandations Hémostase générale](#)) puis les paramètres d'hémostase spécialisée (antithrombine, facteurs II, V, VII, VIII, IX, X, Willebrand et activité anti-Xa ou anti-IIa des anticoagulants oraux directs ([recommandations hémostase spécialisée](#))). Les modalités générales de centrifugation et 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 réalisé par le GFHT en 2016 et 2018 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 janvier 2019 ont été ajoutés aux précédents travaux pour les paramètres suivants : protéine C (PC), protéine S (PS), test de résistance à la protéine C activée (RPCA), recherche d'anticoagulant circulant (ACC) de type lupique, temps de thombine (TT), temps de reptilase (TR), facteur XI, facteur XII, facteur XIII. Les communications affichées n'ont pas été retenues. 36 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 ou propositions. Cette notion de « propositions » est nouvelle par rapport aux documents de 2017 et 2019. En effet, quand les données de la littérature sont apparues de faible puissance, seules des propositions ont été émises par le groupe de travail. **Les recommandations et propositions sont regroupées dans un tableau de synthèse reprenant 4 niveaux de recommandations ou propositions.** Pour ces nouveaux paramètres étudiés, le groupe de travail a revu la définition des 3 niveaux de recommandations précédemment retenus et a défini un nouveau niveau (absence de données), en raison du peu de littérature se rapportant aux paramètres étudiés :

- **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 et incluant des sujets ayant des taux pathologiques pour le paramètre analysé (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, ...) ou données ne reposant que sur une seule étude solide, n'incluant pas de sujets pathologiques (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).
- **Absence de données** : données insuffisantes pour proposer une recommandation

La catégorie « données insuffisantes ou absentes », permet ainsi à chaque laboratoire de mettre en place des essais s'il souhaite conserver les échantillons au-delà des délais validés par la littérature.

Dans les tableaux de synthèse, en l'absence de recommandations solides, les données figurant dans la colonne « Acceptable » sont uniquement des propositions.

Les recommandations comportent une notion de temps : pour les paramètres pour lesquels l'analyse de la littérature nous a fourni des données qui montrent une dégradation/surestimation au-delà de cette durée, la mention « Dégradation au-delà » est indiquée. Pour les paramètres où il n'existe pas de données au-delà d'une certaine durée, la mention « Pas de données au-delà de ... » est notée.

La mention « jusqu'à » signifie que le paramètre est stable uniquement jusqu'au temps cité alors que la mention « au moins » induit que le paramètre est probablement stable plus longtemps, sans qu'il y ait de données disponibles au-delà de ce temps.

Pour tous les paramètres étudiés dans ce document, sauf mention contraire clairement spécifiée, un rappel est fait sur les conditions générales de conservation et de traitement des échantillons recommandées ([recommandations hémostase générale](#)) :

- Les délais de conservation (sang total, plasma, plasma congelé) ne doivent pas être cumulés
- Une conservation à 37°C est déconseillée
- Un cycle unique de congélation/décongélation est recommandé
- La décongélation se fait au bain-marie
- Le temps de décongélation dépend du volume de l'aliquote (exemple 4 minutes pour 1 ml), sans dépasser 10 minutes.
- Homogénéisation douce par 5 retournements après décongélation (vortex non conseillée, sauf mention contraire mentionnée pour certains paramètres)

b. Echantillons transportés en carboglace

Par rapport aux documents déjà publiés par le GFHT, une attention particulière doit être portée sur les échantillons congelés et transférés en carboglace. En effet, plusieurs études ont montré que le transport en carboglace était responsable d'une acidification du milieu et de la variation de certains paramètres d'hémostase en particulier pour la protéine C et les

recherches d'anticoagulant circulant de type lupique (Plumhoff et al. 1992; Murphy et al. 2013; Gosselin et al. 2015; Odsæter et al. 2015; Trondsetås et al. 2017).

En 2018, Trondsetås et coll. (Trondsetås et al. 2017) ont montré sur 30 plasmas de volontaires sains que l'exposition prolongée en carboglace (≥ 16 h) avait un effet sur le pH du plasma et entraînait une diminution statistiquement significative du taux de PC dosée par méthode chromogénique, ainsi qu'un allongement des temps de Quick et des TCA. Une diminution de 0.3 à 0.6 g/L (valeur médiane moyenne) était observée pour le fibrinogène. La décongélation tube ouvert ainsi que la conservation 24h à -80°C après un transport prolongé en carboglace permet de normaliser le pH et retrouver les taux initiaux (Trondsetås et al. 2017). L'antithrombine (mesure amidolytique) et la protéine S (mesure antigène libre) n'étaient pas affectées par ces variations de pH. Les auteurs soulignent également que les mêmes précautions sont à prendre pour les tests qui reposent sur des principes TCA comme les recherches d'anticoagulant circulant de type lupique par exemple.

En 2015, Gosselin et coll (Gosselin et al. 2015) ont montré sur des pools de plasmas normaux que l'exposition prolongée en carboglace jusqu'à 16h *versus* une conservation à -70°C était à l'origine de variations statistiquement significatives (test ANOVA) des temps de dépistage (LA1) et de confirmation (LA2) du test de venin de vipère Russel dilué (DRVVT), des temps de Quick, des TCA et des taux de facteur X. Les dosages de D-dimères, fibrinogène, facteurs (II, V, VII, VIII, IX, XI et XII), activité du facteur Willebrand, protéine C (méthode chromogénique) et antithrombine (méthode chromogénique) n'étaient pas cliniquement affectés. On peut noter que dans cette étude, les modifications des tests LA1 et LA2 étaient malgré tout sans impact sur le calcul du ratio LA1/LA2 (Gosselin et al. 2015). Dans cette étude, plusieurs conditions de stockages étaient évaluées (tube polypropylène avec ou sans bouchon à vis), ainsi que plusieurs conditions de décongélation à 37°C au bain-marie (tube ouvert ou fermé). Les auteurs suggèrent que le raccourcissement (biais maximal < 0.2 s) du test LA1 dans certaines conditions de stockage, en particulier pour les tubes sans bouchon à vis, ferait que des ACC de type lupique de faible puissance biologique et proche de la limite de positivité pour le test de recherche ne seraient plus détectés et les tests de confirmation non réalisés. La décongélation en tube ouvert ne modifie pas les résultats dans cette étude. La

discordance avec l'étude précédente de Trondsetas (Trondsetås et al. 2017) peut s'expliquer par le délai de conservation dans la carboglace différent entre ces études.

Odsæter et coll. ont évalué l'impact de la conservation à -20°C ou à -80°C après transport en carboglace de 24 heures des plasmas congelés dans les 4 heures suivant le prélèvement (8 volontaires sains) (Odsæter et al. 2015). La conservation à -20°C pendant 72 heures suivant un transport en carboglace diminue en moyenne le pH de 7.1 à 6.1, avec un allongement significatif des DRVVT et des *Silice clotting time* (SCT) ayant un impact sur l'interprétation clinico-biologique. Les tests de recherche, de confirmation et les ratios sont affectés, avec une augmentation de faux positif de l'ordre de 75%. Une conservation à -80°C pendant 4 jours des échantillons suivant le transport en carboglace est sans impact sur la recherche d'ACC de type lupique.

Murphy et coll., ont observé que l'acidification du milieu après un transport en carboglace pouvait être prévenue en plaçant les échantillons à -70°C pendant 96 heures avant la décongélation ou en décongelant les tubes bouchons ouverts (Murphy et al. 2013).

De la même façon, Plumhoff et coll. ont décrit que pour certains tests, le temps de Quick en particulier, l'acidification peut être neutralisée en maintenant les échantillons 15 à 30 minutes à TA après la décongélation avant la réalisation des tests (Plumhoff et al. 1992).

En cas de transport en carboglace des échantillons, les recommandations et propositions du GFHT sont les suivantes :

- **Est recommandé : une conservation à au moins -70°C pendant au moins 3 jours avant la réalisation des tests.**
- **Est acceptable : une décongélation à 37°C en tube ouvert pendant quelques minutes des échantillons avant la réalisation des tests, une conservation de 24h à au moins -70°C suivant le transport en carboglace et le maintien des échantillons 15 à 30 minutes à TA, tube ouvert, après la décongélation et avant la réalisation des tests.**
- **Est non-conforme : la conservation des échantillons à une température >-20°C suivant un transport en carboglace.**

Il n'y a pas de données sur **les variations de pH** pouvant être observées pour des échantillons transportés en carboglace et conservés à des températures comprises entre -20°C et -70°C.

Synthèse :

| Paramètre | PLASMA DECANTE et CONGELE | | | |
|--|---|--|--|--|
| | Recommandé | Acceptable | Non conforme | Pas de données ou données insuffisantes |
| Transport en carboglace des échantillons | - Après transport en carboglace, conservation à T°C ≤ -70°C au moins 3 jours avant dosage | - Après transport en carboglace, conservation à T°C ≤ -70°C au moins 24h avant dosage - Conservation à T°C ≤ -70°C et décongélation au bain-marie à 37°C, tube ouvert pendant quelques minutes - Maintien des échantillons 15 minutes à TA, tube ouvert, après la décongélation et avant réalisation des dosages | - Après transport en carboglace, conservation à une T°C de -20°C avant le dosage | - Aucune donnée pour la conservation entre -20°C et -70°C après le transport en carboglace - Effet de la décongélation en tube ouvert après conservation à -20°C suivant le transport en carboglace |

2. Protéine C (activité et antigène)

En ce qui concerne le dosage de la protéine C (PC), 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, ce pour les différentes techniques de mesure de l'activité utilisées : PC activité anticoagulante (AC) et activité chromogénique.

Aucun article n'a étudié la stabilité de la PC antigène, à l'exception de Lewis et coll. pour les plasmas congelés (Lewis et al. 2001). Une stabilité au moins équivalente à celle de la mesure par les tests fonctionnels est probable.

c. Stabilité en sang total

Le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recommande, comme pour plusieurs autres paramètres d'hémostase que le dosage de la PC, sans préciser de technique, soit effectué dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008).

L'analyse de la littérature met en évidence une stabilité plus longue de la PC dans les échantillons de sang total. Trois études ont évalué la durée de conservation à TA (Luddington et al. 1997; Zürcher et al. 2008; Kim et al. 2018) et une à +4°C (Kim et al. 2018). Les trois études concernent l'activité chromogénique, une seule l'activité anticoagulante (Zürcher et al. 2008). Ces études sont présentées dans le tableau I. Les prélèvements ont été réalisés sur des tubes citratés 3,2%. Les conditions de traitement des échantillons avant analyse et les méthodes de dosage utilisées sont hétérogènes.

Dans l'étude de Zürcher et coll., les échantillons sont 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 (Zürcher et al. 2008). Aucune variation significative liée au transport n'est observée entre l'hiver et l'été. Les échantillons sont décongelés à +37°C pendant 5 min,

brèvement vortexés et analysés immédiatement. Les résultats sont comparés avec un échantillon de référence, transporté par pneumatique, centrifugé dans l'heure suivant le prélèvement, congelé immédiatement et analysé immédiatement après décongélation. Les taux de PC des 59 échantillons dosés avec les deux techniques (AC et chromogénique) restent stables jusqu'à 48-52h à TA, sans différence cliniquement significative. Une différence statistiquement significative est néanmoins notée à partir de 4-6h pour la PC chromogénique et 8-12h pour la PC AC mais la variation moyenne reste < 10 % à 48-52h (respectivement -6,2% et -2,9% avec IC 99% < 10%), donc cliniquement non significative.

De plus, aucun des 10 échantillons pour la technique chromogénique et des 7 échantillons pour la technique AC, ayant des valeurs limites comprises entre 50 et 90%, n'a changé de statut (déficitaire ou normal) au cours du temps. Cependant, les variations observées avec la technique AC semblent plus importantes. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 48h pour les deux techniques (variation moyenne < 10%).

Une seule étude a inclus des patients avec des valeurs pathologiques (n=10 sur un total de 26 échantillons) (Luddington et al. 1997). Au-delà de 24h de conservation, une variation à la baisse des taux de PC peut conduire à une mauvaise classification : individus avec taux limites classés comme déficitaires. Aucun patient déficitaire n'a été classé comme normal. Les auteurs concluent à une stabilité acceptable de la PC pendant 24h en sang total à TA pour une mesure par technique chromogénique.

L'étude de Kim et coll. paraît peu informative car elle s'intéresse à des temps de conservation de 4h maximum (Kim et al. 2018), cependant c'est la seule décrivant une conservation à +4°C. Les auteurs concluent à une stabilité à TA et à +4°C d'au moins 4h pour le dosage de PC par technique chromogénique.

En conclusion, le délai de conservation maximal du sang total à TA recommandé par le GFHT pour la mesure de l'activité de la PC, quelle que soit la technique utilisée, est de 24h, données insuffisantes au-delà.

L'exposition du prélèvement à une température réfrigérée pendant au moins 4h est acceptable, pas de données disponibles au-delà.

Tableau I : Résumé des études de stabilité de la PC sur sang total

| Références | T°C conservation | Population Tube (anticoagulant) | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------|---|--|---|---|
| (Zürcher et al. 2008) | TA et transport à T°C non contrôlée (été et hiver) | N=59 104% (25-75 ^e p : 82- 125) Citrates 3,2% | <1h (ref); 4-6; 8-12; 24-28; 48-52h Centrifugation (1500g 10 min) x2 à TA Congélation avant dosage, absence d'effet de la congélation Activité anticoagulante <i>Protein C Reagent (Dade Behring)</i> | Au moins 48-52h (variation moy < 10%) |
| (Zürcher et al. 2008) | TA et transport à T°C non contrôlée (été et hiver) | N=59 121% (25-75 ^e p : 92- 144) Citrates 3,2% | <1h (ref); 4-6; 8-12; 24-28; 48-52h Centrifugation (1500g 10 min) x2 à TA Congélation avant dosage, absence d'effet de la congélation Activité chromogénique <i>Berichrom Protein C (Dade Behring)</i> | Au moins 48-52h (variation moy < 10%) |
| (Luddington et al. 1997) | TA | N=26 126% (IC95% : 110-142) Dont un patient déficientaire en protéine C (taux entre 60-70% et un patient taux limite 70%) Citrates 3,2% | 0, 1, 2, 3 jours Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée Activité chromogénique <i>Chromogenix AB</i> | Au moins 24h, différence significative à partir de 48h y compris le patient à taux limite classé comme déficientaire (test statistique données paramétriques : test ANOVA, données non paramétriques : test KRUSKAL WALLACE ANOVA) |
| (Kim et al. 2018) | TA | N=22 (sains) 111% (sd : 18,5%) Citrates 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Activité chromogénique <i>Coamatic Protein C (Chromogenix/DiaPharma)</i> | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moy < 6%) |
| (Kim et al. 2018) | + 4°C | N=22 (sains) 111% (sd : 18,5%) Citrates 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Activité chromogénique <i>Coamatic Protein C (Chromogenix/DiaPharma)</i> | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moy < 6%) |

d. Stabilité en plasma frais

Pour la PC, le CLSI recommande, comme pour plusieurs autres paramètres d'hémostase que le dosage, sans précisions sur la technique et la décantation ou non du plasma, soit effectué dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008).

Une seule étude a évalué une conservation plus longue du plasma à +6°C (Heil et al. 1998). Elle est présentée dans le tableau II. Réalisée en 1998 sur le plasma de 7 volontaires sains

prélevés sur tube citraté 3.2%, elle a évalué la conservation du plasma frais obtenu par centrifugation immédiate (double centrifugation à 2000 g, +18°C), aliquoté, puis conservé au réfrigérateur (+6°C) jusqu'à 7 jours (temps étudiés 0h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h et 168h). La variation moyenne des taux de PC dosées par méthode fonctionnelle (activité anticoagulante) est < 10 % jusqu'à 7 jours pour des plasmas double centrifugés, aliquotés et conservés +6C.

En dehors des recommandations du CLSI, il n'y a pas d'autres études publiées évaluant la conservation à TA.

Les notices des fournisseurs de réactifs de dosage de la PC, se réfèrent aux données du CLSI.

En conclusion, en l'absence de données suffisantes, le GFHT ne recommande pas de délai de conservation du plasma frais à TA pour la mesure de l'activité de la PC quelle que soit la technique utilisée.

Un délai de conservation d'au moins au moins 4h à TA est acceptable, données insuffisantes au-delà.

Pour une conservation à température réfrigérée, un délai d'au moins 4h est acceptable (données de la littérature insuffisantes, avis d'experts).

Tableau II : Résumé des études de stabilité de la PC sur plasma frais

| <i>Références</i> | <i>T°C conservation</i> | <i>Population Tube</i> | <i>Pré-analytique Méthode de dosage</i> | <i>Stabilité (analyse)</i> |
|--------------------|-------------------------|--|--|-----------------------------|
| (Heil et al. 1998) | + 6°C | N=7 Taux non renseignés Citrate 3,2% | 0, 8, 24, 48, 72, 96, 168h Centrifugation 2000g TA x 2, temps non précisé, décanté Activité anticoagulante (<i>Protein C Behringwerke</i>) | 7 jours (variation <10%) |

e. Stabilité en plasma congelé

Le CLSI se réfère à l'étude de Woodhams et coll, qui indique une stabilité de la PC (méthode anticoagulante) d'au moins 24 mois, que le plasma soit conservé à -24°C ou à -74°C (Woodhams et al. 2001), avec une variation < 10%, dans le sens de l'augmentation. En prenant comme critère une variation < 5%, la durée de stabilité décrite est de 18 mois aux deux températures. Cette étude a été réalisée sur des aliquotes de plasma issus de

plasmaphérèse (citrate 3,8%) de 6 sujets sains permettant de tester plusieurs types d'aliquotage (stockage en tube de polystyrène ou dans des microtubes en polypropylène), de conditions de congélation et de durées de conservation.

Les données de l'étude de Woodhams ainsi que celles de trois autres (Luddington et al. 1997; Lewis et al. 2001; Betsou et al. 2009) sont rapportées dans le tableau III.

Les études de Luddington et Betsou se sont intéressées à un nombre plus important d'échantillons, avec respectivement 26 individus dont 16 normaux et 10 patients porteurs de thrombophilie dont 2 avec des taux bas ou limites et 60 patients aux taux non précisés, et ont évalué la stabilité de la PC par technique chromogénique sur plasma (citraté 3,2%) congelé à -80°C, avec des délais de conservation allant de 2 à 4 semaines (Luddington et al. 1997) à 9 ans (Betsou et al. 2009) (cf tableau III). Ces études sont hétérogènes sur le plan pré-analytique. L'étude de Luddington et coll. décrit une variation statistiquement significative du taux de PC après un cycle de congélation mais les données détaillées sur le pourcentage de variation par type de patients (normaux ou pathologiques) ne sont pas précisées, ne permettant pas de conclure et de comparer à d'autres articles. La différence moyenne de variation est de 30%. L'étude plus récente de Betsou et coll qui s'est intéressée à un effectif de patients beaucoup plus important montre une différence significative. La variation entre les moyennes des valeurs à T0 et à 9 ans est représentée graphiquement et semble > 10% avec une évolution positive, mais aucune donnée chiffrée n'est disponible dans l'article pour évaluer plus précisément ces variations. Nous ne pouvons donc pas conclure pour ce délai de conservation.

L'étude de Lewis et coll décrit la conservation à -70°C de 29 pools de plasmas maisons ou commerciaux (14 congelés et 15 lyophilisés) avec des modalités de préparation, centrifugation et décongélation non précisées pour le dosage de la PC par méthode antigénique (Lewis et al. 2001). Pour les pools congelés, il n'a pas été observé de différence significative jusqu'à 28 mois. Ces données ne peuvent pas être comparées aux autres études par manque de détails méthodologiques.

Pour être tout à fait exhaustif, deux articles rapportent l'étude de la stabilité de plasmas conservés en carboglace pendant des périodes variables pour le dosage de la PC par

méthode chromogénique. L'équipe de Gosselin (Gosselin et al. 2015) a étudié la stabilité de 10 pools de plasmas citratés 3,2% (taux moyen 85%, de 58 à 142%), aliquotés après double centrifugation en microtube à bouchon à clipser ou à visser, conservés à -70°C ou dans de la carboglace pendant au moins 16h puis décongelés 5 minutes à 37°C bouchés ou débouchés. Aucune différence significative n'a été observée entre le mode de congélation ou de décongélation et le type de tube. En 2018, Trondsetas et coll ont montré sur 30 plasmas de volontaires sains que l'exposition prolongée en carboglace ($\geq 16h$) avait un effet sur le pH du plasma et entraînait une diminution statistiquement significative du taux de PC dosée par méthode chromogénique. La décongélation tubes ouverts ainsi que la conservation 24h à -80°C après un transport prolongé en carboglace permet de normaliser le pH et le taux de PC (Trondsetås et al. 2017).

En conclusion, pour la mesure de l'activité de la PC sur plasma congelé, d'après les informations disponibles à ce jour, le GFHT ne peut qu'émettre une proposition pour la durée de conservation maximale : une conservation jusqu'à 24 mois à une température $\leq -20^\circ\text{C}$ ou à une température $\leq -70^\circ\text{C}$ est acceptable, données insuffisantes au-delà.

Tableau III : Résumé des études de stabilité de la PC sur plasma congelé

| <i>Références</i> | <i>T°C conservation</i> | <i>Population Tube</i> | <i>Pré-analytique Méthode de dosage</i> | <i>Stabilité (analyse)</i> |
|--------------------------|-------------------------|--|--|---|
| (Woodhams et al. 2001) | -20°C | N=6 sujets sains Plasmaphérèse sur citrate 3,8% | A 2 semaines puis à 1 mois puis tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C Activité anticoagulante <i>Staclot PC (Stago)</i> | 18 mois (variation<5%) Au moins 24 mois (variation < 10%) |
| (Woodhams et al. 2001) | -70 °C | N=6 sujets sains Plasmaphérèse sur Citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C Activité anticoagulante <i>Staclot PC (Stago)</i> | 18 mois (variation<5%) Au moins 24 mois (variation < 10%) |
| (Lewis et al. 2001) | -70 °C | N=29 pools de plasma 14 Congelés 15 lyophilisés <i>Conditions pré-analytiques non précisées, taux non précisés</i> | Tous les mois à jusqu'à 28 mois Conditions de centrifugation et de décongélation non précisées. <i>PC Ag ELISA Maison</i> | Au moins 28 mois (test statistique, (CV max 10.4%) au cours du temps) Manque d'information ne permettant pas une interprétation claire |
| (Luddington et al. 1997) | - 80°C | N=26 <i>126% (IC95% : 110-142)</i> <i>Dont un patient déficitaire (taux</i> | 2 à 4 semaines de congélation Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée, | variation moyenne de plus 30% tous plasmas confondus, pas de détails entre plasmas |

| | | | | |
|----------------------|--------|---|--|---|
| | | entre 60 et 70%) et un patient taux limite 70% Citrates 3,2% | Décongélation rapide à 37°C Activité chromogénique <i>Chromogenix AB</i> | normaux ou pathologiques (test statistique données paramétriques : test ANOVA, données non paramétriques : test KRUSKAL WALLACE ANOVA) sans détails sur le % de variation |
| (Betsou et al. 2009) | -80 °C | N=60 patients Citrates 3,2% | T0, 9 ans Centrifugation 1500g 15min 15°C, Décongélation à TA Activité chromogénique <i>Stachrom PC (Stago)</i> | Variation significative après 9 ans (test statistique Wilcoxon). Pas de détails sur le % de variation. Distribution des valeurs T0/T9 en faveur d'une variation moy de +20% |

Synthèse

| Paramètre | SANG TOTAL et PLASMA FRAIS | | | |
|-----------------------|--|--|--------------|---|
| | Recommandé | Acceptable | Non conforme | Pas de données ou données insuffisantes |
| Protéine C (activité) | Sang total : - jusqu'à 24h à T°C ambiante | Sang total : - au moins 4h à T°C réfrigérée Plasma : - au moins 4h à T°C ambiante ou réfrigérée | | Sang total : - au-delà de 24h à T°C ambiante - au-delà de 4h à T°C réfrigérée Plasma : - au-delà de 4h à T°C ambiante ou réfrigérée |

| Paramètre | PLASMA DECANTE et CONGELE | | | |
|-----------------------|---------------------------|---|----------------------------------|--|
| | Recommandé | Acceptable | Non conforme | Pas de données ou données insuffisantes |
| Protéine C (activité) | | - Au moins 24 mois à T°C ≤ -20°C ou à ≤ -70°C | - Conservation à une T°C > -20°C | - Au-delà de 24 mois à T°C ≤ -20°C ou ≤ -70°C - Effet des cycles de congélation/décongélation |

3. Protéine S (activité fonctionnelle et antigène)

Concernant le dosage de la protéine S (PS), nous avons recherché les données de stabilité en sang total dans différentes conditions de conservation, TA ou réfrigérée, puis en plasma frais ou congelé à différentes températures, et ce pour les différentes techniques utilisées : PS activité anticoagulante (cofacteur de la protéine C activée (PCa)), antigène libre et total.

a. Stabilité en sang total

Le CLSI recommande, comme pour plusieurs autres paramètres que le dosage de la PS, sans préciser de technique, soit effectué dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008).

Une seule étude concerne la technique PS activité anticoagulante (Kim et al. 2018), deux autres le dosage de l'antigène libre (Luddington et al. 1997; Zürcher et al. 2008) et une dernière le dosage de l'antigène total (Zürcher et al. 2008). Ces études sont présentées dans le tableau IV.

L'étude de Kim et coll. est la seule ayant évalué la stabilité de la PS par technique anticoagulante, elle s'intéresse à des temps de conservation de 4h maximum (Kim et al. 2018) à TA et à +4°C sur 22 prélèvements de volontaires sains. Les échantillons ont été prélevés sur citrate 3,2%, centrifugés à T0 ou T4h après conservation à TA ou +4°C, congelés puis testés en même temps après décongélation 5 minutes à 37°C. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les taux à T0 et T4h, que ce soit à TA ou +4°C mais les échantillons stockés à +4°C avaient des taux significativement plus hauts que ceux stockés à TA. Les auteurs concluent cependant à une stabilité à TA et à +4°C d'au moins 4h pour le dosage de PS par technique anticoagulante.

Deux études ont évalué la durée de conservation à TA du dosage de l'antigène libre de la protéine S (Ag PSL) (Luddington et al. 1997; Zürcher et al. 2008). Les prélèvements ont été réalisés sur des tubes citratés 3,2%. Les conditions de traitement des échantillons avant analyse et les méthodes de dosage utilisées sont différentes dans les 2 études.

L'étude de Luddington est la seule étude à avoir inclus des patients avec des valeurs pathologiques (n=10 sur un total de 26 échantillons) (Luddington et al. 1997). Après 72h de conservation à TA (temps maximum étudié), il n'y avait pas de variation statistiquement significative du taux de d'Ag PSL sur les prélèvements double centrifugés (2500g, 2 fois 10 min, température non précisée). Seul un patient avec un taux limite passait à un taux déficitaire au bout de 48h. Les auteurs concluent à une stabilité de l'Ag PSL pendant 72h en sang total à TA. En conclusion, à TA, une stabilité d'au moins 24h de l'Ag PSL est observée, une diminution des taux pouvant apparaître à partir de 48h.

Dans l'étude de Zürcher et coll., les échantillons sont issus de 59 patients de consultation de thrombophilie (12 sous traitement AVK, aucun sous héparine), 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 (Zürcher et al. 2008). Aucune variation significative liée au transport n'est observée entre l'hiver et l'été. Les échantillons sont décongelés à +37°C pendant 5 min, brièvement vortexés et analysés immédiatement. Les résultats sont comparés avec un échantillon de référence, transporté par pneumatique, centrifugé dans l'heure suivant le prélèvement, congelé et analysé immédiatement après décongélation. Les taux d'Ag PSL des 59 échantillons restent stables jusqu'à 48-52h à TA : différence statistiquement significative à partir de 24-28h mais variation moyenne < 10 % jusqu'à 48-52h (-4,3% et IC 99% < 10%). Cependant, parmi les 11 échantillons de femmes et les 7 échantillons d'hommes ayant des taux limites ou bas (respectivement 45-75% et 50-90%), une variation aléatoire franche est observée, en particulier chez les femmes dès 4-6h. Les auteurs concluent malgré cela à une stabilité jusqu'à au moins 48h pour cette technique (variation moyenne < 10%).

Zürcher *et coll.* sont les seuls à avoir évalué la stabilité de l'antigène total de la PS. Dans la même étude que celle décrite ci-dessus, les taux d'antigène total de la PS des 59 échantillons restent stables jusqu'à 8-12h à TA : différence statistiquement significative et variation moyenne de 9.8% soit proche des 10% à 24-28h (IC 99% compris entre -13% et -6,5%) et 17.7% sur la dernière mesure à 48-52h (IC 99% compris entre -22% et -13.5%).

En conclusion, sur sang total, la protéine S activité est stable au moins 4h, à TA et à température réfrigérée, pas de données disponibles au-delà.

La protéine S antigène libre est stable au moins 24h sur sang total conservé à TA, données insuffisantes au-delà.

La protéine S antigène total est stable au moins 12h sur sang total conservé à TA, données insuffisantes au-delà.

Tableau IV : Résumé des études de stabilité de la PS sur sang total

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------------|--|--|---|---|
| Activité anticoagulante | | | | |
| (Kim et al. 2018) | TA | N=22 (sains) 101,7% (sd : 11,2%) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Activité anticoagulante <i>Staclot PS (Stago)</i> | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moy < 6%) |
| (Kim et al. 2018) | + 4°C | N=22 (sains) 101,7% (sd : 11,2%) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Activité anticoagulante <i>Staclot PS (Stago)</i> | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moy < 6%) |
| Antigène libre | | | | |
| (Zürcher et al. 2008) | TA et transport à T°C non contrôlée (été et hiver) | N=59 (sains et pathologiques dont AVK) 81% (25-75 ^e p : 63-98) Citrate 3,2% | <1h (ref); 4-6; 8-12; 24-28; 48-52h Centrifugation (1500g 10 min) x2 à TA Congélation avant dosage, absence d'effet de la congélation Antigène libre <i>Asserachrom total Protein S (Stago)</i> | Au moins 48-52h (variation moy<10%) Variations > pour les taux limites |
| (Luddington et al. 1997) | TA | N=26 118% (IC95% : 100-136) Dont un patient déficitaire (taux entre voisin de 20%) et un patient taux limite 70% Citrate 3,2% | 0, 1, 2, 3 jours Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée Antigène libre <i>ELISA Maison</i> | Au moins 72h, (test statistique : données paramétriques : test ANOVA, données non paramétriques : test KRUSKAL WALLACE ANOVA) 1 patient variation significative à 48h |
| Antigène total | | | | |
| (Zürcher et al. 2008) | TA et transport à T°C non contrôlée (été et hiver) | N=59 108% (25-75 ^e p : 83-125) Citrate 3,2% | <1h (ref); 4-6; 8-12; 24-28; 48-52h Centrifugation (1500g 10 min) x2 à TA Congélation avant dosage, absence d'effet de la congélation Antigène total <i>Asserachrom total Protein S (Stago)</i> | 8-12h (variation moy<10%) |

b. Stabilité en plasma frais

Pour la PS, le CLSI recommande, comme pour plusieurs autres paramètres d'hémostase que le dosage, sans préciser de technique, soit effectué dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008).

Deux études, décrites dans le tableau V, ont évalué une conservation plus longue du plasma. L'étude de Heil, réalisée en 1998 sur le plasma de 7 volontaires sains prélevés sur tube citraté 3.2%, a évalué la conservation du plasma frais obtenu par centrifugation immédiate (2000 g 2 fois +18°C), aliquoté puis *conservé au réfrigérateur (+6°C)* jusqu'à 7 jours (temps étudiés 0h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h et 168h) (Heil et al. 1998). La variation des taux de PS (méthode fonctionnelle) est significative dès 8h avec une diminution moyenne de 12%, suivie d'une augmentation des taux à 24h qui restent ensuite stables jusqu'à 96h. Cette cinétique est expliquée par les auteurs par l'inactivation des facteurs V et VIII.

L'équipe de Betsou a étudié la stabilité de la PS dosée par technique anticoagulante et Ag PSL sur le plasma de 11 volontaires sains *conservé* à 20°C (temps étudié 24h et 48h) et 37°C (12h et 24h) (Betsou et al. 2009). Les données de stabilité à 37°C ne sont pas montrées, cette T°C de conservation étant déconseillée par le GFHT. L'interprétation de cette étude est peu aisée en l'absence de précision des % de variation, mais permet de dégager une tendance. A 20°C, les taux semblent stables 24h avec la technique anticoagulante (moyenne T0 81%±13.4 vs T24h 85.3%±14.5), mais une diminution est observée à 48h (moyenne 66.1%±18.7). Avec la technique Ag PSL, une augmentation importante des taux est observée dès 24h (moyenne T0 73.5%±18.4 vs T24h 118.3%±18.3). Cette étude montre également qu'à 37°C, les taux semblent diminués avec la technique anticoagulante dès 12h (moyenne T0 81%±13.4 vs T12h 72.2%±14.5), et augmentés avec la technique Ag PSL dès 12h (moyenne T0 73.5%±18.4 vs T24h 107.3.3%±17.7).

D'après les auteurs, l'augmentation des taux d'Ag PSL lorsque les délais de conservation augmentent serait liée à une modification de l'équilibre entre la PS libre et la protéine S liée à la C4BP.

Les notices des fournisseurs de réactifs de dosage de la protéine S, se réfèrent aux données du CLSI.

En conclusion, la protéine S activité est stable jusqu'à 24h en plasma (tube primaire centrifugé) conservé à TA. En revanche, un délai supérieur à 24h à TA est non conforme. Les données sont insuffisantes pour la conservation à température réfrigérée.

La protéine S antigène libre est stable au moins 4h en plasma (décanté ou non) conservé à TA. En revanche, un délai supérieur à 24h à TA est non conforme. A notre connaissance, il n'existe pas de données sur la stabilité entre 4h et 24h, ou à température réfrigérée.

A notre connaissance, il n'existe pas de données sur la stabilité de la protéine S antigène totale.

Même si une étude a évalué la stabilité de la PS à 37°C, cette température de conservation n'est pas recommandée.

Tableau V : Résumé des études de stabilité de la PS sur plasma frais

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------------|------------------|---|---|---|
| Activité anticoagulante | | | | |
| (Heil et al. 1998) | +6°C | N=7 Taux non renseignés Citrates 3,2% | 0, 8, 24, 48, 72, 96, 168h Centrifugation 2000g TA x 2, temps non précisé, décanté Technique anticoagulante Protein S Behringwerke | < 8h (variation 12% à 8h) |
| (Betsou et al. 2009) | +20°C | N=11 patients 81% (SD 13,4) Citrates 3,2% | T0, 24h, 48h Conditions non précisées PS activité anticoagulante Staclof PS (Stago) | Taux stables sans détails sur le % de variation moyen à 24h. Diminution à 48h (test statistique Wilcoxon) |
| (Betsou et al. 2009) | +37°C | N=11 patients 81% (SD 13,4) Citrates 3,2% | T0, 12h, 24h Conditions non précisées PS activité anticoagulante Staclof PS (Stago) | Diminution des taux non significative à 12h, sans précision sur le % de variation moyen (test statistique Wilcoxon) |
| Antigène libre | | | | |
| (Betsou et al. 2009) | +20°C | N=11 patients 73,5% (SD 18,4) Citrates 3,2% | T0, 24h, 48h Conditions non précisées Antigène PS libre ELISA | Augmentation significative des taux dès 24h (premier temps étudié) (test statistique Wilcoxon) |
| (Betsou et al. 2009) | +37°C | N=11 patients 73,5% (SD 18,4) Citrates 3,2% | T0, 12h, 24h Conditions non précisées Antigène PS libre ELISA | Augmentation significative des taux dès 12h (premier temps étudié) (test statistique Wilcoxon) |

c. Stabilité en plasma congelé

Le CLSI (Adcock et al. 2008) se réfère à l'étude de Woodhams et coll., qui indique une stabilité de la PS dosée par technique anticoagulante de 12 mois à -24°C et de 18 mois à -74°C, avec une variation < 10% (Woodhams et al. 2001). En prenant comme critère une variation < 5%, la durée de stabilité décrite est de 6 mois à -24°C et de 8 mois à -74°C. Cette étude a été réalisée sur des aliquotes de plasma issus de plasmaphérèse (citrate 3,8%) de 6 sujets sains permettant de tester plusieurs types d'aliquotage (stockage en tube de polystyrène ou dans en microtubes en polypropylène), de conditions de congélation et de durées de conservation.

Les données de l'étude de Woodhams ainsi que celles de quatre autres (Luddington et al. 1997; Lewis et al. 2001; Betsou et al. 2009; Zander et al. 2014) sont rapportées dans le tableau VI.

Luddington et coll ont évalué la stabilité de l'Ag PSL sur le plasma citraté (3.2%) de 26 individus dont 16 normaux et 10 patients aux taux bas ou limites, congelé à -80°C pendant 2 à 4 semaines (Luddington et al. 1997). Aucune variation statistiquement significative n'est décrite après un cycle de congélation mais les données détaillées sur le pourcentage de variation ne sont pas précisées.

L'étude plus récente de Betsou et coll s'est intéressée à un effectif de patients beaucoup plus important (60 patients dont les taux ne sont pas précisés) avec un délai de conservation allant jusqu'à 9 ans à -80°C pour le dosage de la PS activité anticoagulante (Betsou et al. 2009). Elle montre une variation statistiquement significative à 9 ans avec un taux < 51% pour tous les prélèvements. Aucune autre donnée chiffrée n'est disponible dans l'article pour évaluer plus précisément l'évolution de ces variations.

Zander et coll. rapportent une stabilité des plasmas conservés d'au moins 3 mois lorsque les échantillons sont conservés à -20°C (+/-2°C) -80°C (+/-2°C) ou moins (<-130°C) (pas de mesure au-delà de 3 mois) (Zander et al. 2014). Les échantillons étaient conservés en microtubes en polypropylène. L'exposition brève (< 5 min) a des températures variables (de -100 °C à TA) n'a pas eu d'effet, quelle que soit la température de stockage initiale.

L'étude de Lewis et coll décrit la conservation à -70°C de 29 pools de plasmas maisons ou commerciaux (14 congelés et 15 lyophilisés) avec des modalités de préparation, centrifugation et décongélation non précisées pour le dosage de l'Ag PSL (Lewis et al. 2001). Pour les pools congelés, une variation significative a été décrite à 29 mois sur un des pools congelés. Ces données ne peuvent pas être comparées aux autres études les conditions préanalytiques n'étant pas précisées.

Pour être tout à fait exhaustif, un article rapporte l'étude de la stabilité de plasma conservé en carboglace pour le dosage de l'Ag PSL. En 2018, Trondsetas et coll n'ont pas montré sur 30 plasmas de volontaires sains d'effet de l'exposition prolongée en carboglace (≥16h) (Trondsetås et al. 2017). Les autres articles évaluant l'impact de la carboglace pendant 24h n'ont pas étudié la protéine S.

En conclusion, pour la mesure de l'activité de la PS, d'après les informations disponibles à ce jour, le GFHT ne peut qu'émettre une proposition pour la durée de conservation maximale : une conservation jusqu'à 12 mois à une température ≤-20°C et 18 mois à une température ≤-70°C est acceptable.

En ce qui concerne l'antigène PSL, le GFHT ne peut qu'émettre une proposition : un délai de conservation d'au moins 3 mois est acceptable à ≤-20°C et ≤-70°C, données insuffisantes au-delà.

Tableau VI : Résumé des études de stabilité de la PS sur plasma congelé

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------------|------------------|---|---|---|
| Activité anticoagulante | | | | |
| (Woodhams et al. 2001) | -20°C | N=6 sujets sains Plasmaphérèse sur citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C Activité anticoagulante <i>Staclof PS (Stago)</i> | 6 mois (variation < 5%) 12 mois (variation < 10%) |
| (Woodhams et al. 2001) | -70 °C | N=6 sujets sains Plasmaphérèse sur Citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C Activité anticoagulante <i>Staclof PS (Stago)</i> | 8 mois (variation < 5%) 18 mois (variation < 10%) |
| (Betsou et al. 2009) | -80 °C | N=60 patients 81% (SD 13,4) Citrate 3,2% | T0, 9 ans Centrifugation 1500g 15min 15°C, Décongélation à TA Activité anticoagulante <i>Staclof PS (Stago)</i> | Variation significative après 9 ans (test statistique Wilcoxon). Diminution des taux avec toutes les valeurs < 51% |

| | | | | |
|--------------------------|---------|---|--|--|
| (Betsou et al. 2009) | -80 °C | N=11 patients 81% (SD 13,4) Citrate 3,2% | T0, 1 cycle de congélation/décongélation, 10 cycles de congélation/décongélation Conditions non précisées Activité anticoagulante <i>Staclot PS (Stago)</i> | Pas de différence significative après 1 cycle de congélation/décongélation. Après 10 cycles, pas de différence statistiquement significative (test statistique Wilcoxon) mais pas détails sur le % de variation moyen (moyenne de 81% à 74.6%) |
| Antigène libre | | | | |
| (Zander et al. 2014) | -20°C | N=10 pools de patients (5 pools de patients de rea et 5 pools de patients de consultation) | 0, 7, 30 et 90 jours Conditions non précisées <i>Antigène PS libre ACL Top</i> | Au moins 3 mois (variation < 3CVs, test-t apparié) |
| (Luddington et al. 1997) | -80°C | N=26 118% (IC95% : 100-136) Citrate 3,2% Dont un patient déficitaire (voisin de 20%) et un patient taux limite | 2 à 4 semaines de congélation Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée, Décongélation rapide à 37°C <i>Antigène PS libre ELISA</i> | variation moyenne de moins 10% tous plasmas confondus, pas de détail plasmas normaux ou pathologiques (test statistique données paramétriques : test ANOVA, données non paramétriques : test KRUSKAL WALLACE ANOVA) sans détails sur le % de variation |
| (Betsou et al. 2009) | -80 °C | N=11 patients 73,5% (SD 18,4) Citrate 3,2% | T0, 1 cycle de congélation/décongélation, 10 cycles de congélation/décongélation le jour du prélèvement <i>Antigène PS libre ELISA</i> | Pas de différence significative après 1 cycle de congélation/décongélation. Après 10 cycles augmentation significative des taux (test statistique Wilcoxon) |
| (Zander et al. 2014) | -80°C | N=10 pools de patients (5 pools de patients de rea et 5 pools de patients de consultation) | 0, 7, 30 et 90 jours Conditions non précisées <i>Antigène PS libre ACL Top</i> | Au moins 3 mois (variation < 3CVs, test-t apparié) |
| (Zander et al. 2014) | <-130°C | N=10 pools de patients (5 pools de patients de rea et 5 pools de patients de consultation) | 0, 7, 30 et 90 jours Conditions non précisées <i>Antigène PS libre ACL Top</i> | Au moins 3 mois (variation < 3CVs, test-t apparié) |
| Antigène total | | | | |
| (Lewis et al. 2001) | -70 °C | N=29 pools de plasma 14 Congelés 15 lyophilisés AC non précisé, taux non précisés | Tous les mois à jusqu'à 28 mois Conditions de centrifugation et de décongélation non précisées. <i>Antigène PS total ELISA Maison</i> | A 28 mois variation significative sur un des pools congelés (test-t) |

Synthèse :

| <u>Paramètre</u> | <u>SANG TOTAL et PLASMA FRAIS</u> | | | |
|--|-----------------------------------|---|---|---|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Protéine S (antigène et activité)</u> | | <u>Sang total :</u> - au moins 4h à T°C ambiante ou T°C réfrigérée (activité) - au moins 24h T°C ambiante (antigène libre) - au moins 12h à T°C ambiante (antigène total) | <u>Sang total:</u> - conservation à 37°C | <u>Sang total :</u> - au-delà de 4h à T°C ambiante ou réfrigérée (activité) - au-delà de 24h à T°C ambiante (antigène libre) - au-delà de 12h à T°C ambiante (antigène total) |
| | | <u>Plasma :</u> - jusqu'à 24h à T°C ambiante (activité) - au moins 4h à T°C ambiante (antigène libre) | <u>Plasma :</u> - au-delà de 24h à T°C ambiante (activité et antigène libre) - conservation à 37°C | <u>Plasma :</u> - conservation à T°C réfrigérée (activité) - conservation entre 4h et 24h à T°C ambiante ou conservation à T° réfrigérée (antigène libre) - Aucune donnée pour antigène total |

| <u>Paramètre</u> | <u>PLASMA DECANTE et CONGELE</u> | | | |
|--|----------------------------------|--|--|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Protéine S (antigène et activité)</u> | | - Jusqu'à 12 mois à T°C ≤ -20°C (activité) - Jusqu'à 18 mois à T°C ≤ -70°C (activité) - Au moins 3 mois à T°C ≤ -20°C ou ≤ -70°C (antigène libre) | - Au-delà de 12 mois à T°C ≤ -20°C (activité) - Au-delà de 18 mois à T°C ≤ -70°C (activité) | - Au-delà de 3 mois à T°C ≤ -20°C ou ≤ -70°C (antigène libre) - Aucune donnée pour antigène total |

4. Résistance à la protéine C activée

Concernant la technique de résistance à la protéine C activée (RPCA), nous avons recherché les données de stabilité en sang total dans différentes conditions de conservation, TA ou réfrigérée, puis en plasma frais ou congelé à différentes températures.

a. Stabilité en sang total

Le CLSI recommande, comme pour la plupart des paramètres d'hémostase, que la mesure de la RPCA soit effectuée dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008).

Les 4 études ayant évalué la stabilité de la RPCA sur sang total (Luddington et al. 1997; Freyburger et al. 1999; Zürcher et al. 2008; Kim et al. 2018) sont présentées dans le tableau VII.

L'étude de Kim et coll. s'intéresse à des temps de conservation de 4h maximum à TA et à +4°C sur 22 prélèvements de volontaires sains (Kim et al. 2018). Les échantillons ont été prélevés sur citrate 3,2%, centrifugés à T0 ou T4h après conservation à TA ou +4°C, congelés puis testés en même temps après décongélation 5 minutes à 37°C. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les ratios de RPCA à T0 et T4h, que ce soit à TA ou +4°C.

Trois études ont évalué la durée de conservation uniquement à TA pour la mesure des ratios de RPCA (Luddington et al. 1997; Freyburger et al. 1999; Zürcher et al. 2008). Les prélèvements ont été réalisés sur des tubes citratés 3,2% sauf pour une partie de l'étude de Freyburger, où des tubes citratés 3.8% ont été également utilisés. Les conditions de traitement des échantillons avant analyse et les méthodes de dosage utilisées sont hétérogènes pour ces 3 études.

L'étude de Luddington a inclus des patients avec des valeurs pathologiques (n=10 sur un total de 26 échantillons) (Luddington et al. 1997). Après 24h de conservation, une variation à la baisse des ratios de RPCA (variation statistiquement significative) est observée sur les prélèvements double centrifugés (2500g, 2 fois 10 min, température non précisée). Aucun patient muté n'a été classé comme normal. Un patient avec un ratio limite est passé à un

ratio anormal au bout de 72h. Les auteurs concluent à une stabilité de 24h en sang total à TA pour une mesure du ratio de RPCA.

En 1999, Freyburger et coll ont étudié la stabilité sur sang total chez 14 individus (6 volontaires sains et 8 patients comprenant des porteurs de déficit en PS et de la mutation FV Leiden à l'état hétérozygote et homozygote) (Freyburger et al. 1999). Les prélèvements sont réalisés sur tubes citratés 3.2% et 3.8%. Les échantillons, prélevés sur tube citraté 3.8%, sont conservés à TA pendant 1, 3, 5, 7 et 24h pour les volontaires sains et jusqu'à 48h pour les patients puis centrifugés (20 min, à TA, à 2000g). Les résultats sont comparés à un échantillon analysé immédiatement. Pour les volontaires sains, les ratios de RPCA obtenus avec la technique modifiée (prédilution en facteur V) à 24h sont stables, que les plasmas aient été congelés ou non avant analyse (durée non précisée) : toutes les valeurs se situent entre 97 et 101% de la valeur initiale ($CV \leq 2.7\%$). Une variation un peu plus importante est à noter avec la méthode originale (sans pré-dilution) *versus* méthode modifiée sur les plasmas congelés mais sans impact sur l'interprétation du statut. Les tests réalisés sur 5 volontaires sains prélevés sur citrate 3.2% montrent une stabilité à TA de 7h. Pour les patients, les résultats sont comparables avec une variation $\leq 3\%$ à 24h mais une diminution du ratio RPCA à 48h avec la méthode modifiée.

Dans l'étude de Zürcher et coll., les échantillons sont 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 $+10^{\circ}\text{C}$ en hiver et $+11^{\circ}\text{C}$ à $+29^{\circ}\text{C}$ en été) puis conservés à TA ($+20$ à $+25^{\circ}\text{C}$) sur des périodes de 4-6h, 8-12h, 24-28h et 48-52h, avant double centrifugation (1500g, 2 fois 10 min, $+20^{\circ}\text{C}$) et congélation à -80°C pendant une durée non spécifiée (Zürcher et al. 2008). Aucune variation significative liée au transport n'est observée entre l'hiver et l'été. Les échantillons sont décongelés à $+37^{\circ}\text{C}$ pendant 5 min, brièvement vortexés et analysés immédiatement. Les résultats sont comparés avec un échantillon de référence, transporté par pneumatique, centrifugé dans l'heure suivant le prélèvement, congelé et analysé immédiatement après décongélation. Les ratios de RPCA des 59 échantillons restent stables jusqu'à 48-52h à TA. Une différence statistiquement significative est observée à partir de 48-52h mais la variation moyenne reste $< 10\%$ à 48-52h ($-4,3\%$ et IC 99% $< 10\%$). De plus, les mesures effectuées sur 16 échantillons de patients FV

Leiden hétérozygote et 15 de patients avec ratio à la limite de la normale (2,2-2,5) sont restées stables et aucun patient avec un ratio limite n'a changé de statut. Les auteurs concluent à une stabilité jusqu'à au moins 48h pour cette technique (variation moyenne < 10%).

En conclusion, pour la mesure de la RPCA, le GFHT recommande un délai de conservation du sang total jusqu'à 24h à TA, acceptable 48h et non conforme au-delà de 48 heures.

La RPCA est stable au moins 4h sur sang total conservé à température réfrigérée. A notre connaissance, il n'y a pas de données disponibles au-delà.

Tableau VII : Résumé des études de stabilité de la RPCA sur sang total

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------|--|---|--|--|
| (Kim et al. 2018) | TA | N=22 (sains) 2,43 (SD : 0,1) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Activité anticoagulante Coatest APC Resistance V Chromogenix/DiaPharma | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |
| (Luddington et al. 1997) | TA | N=26 3,4 (IC95% : 3,2-3,5) Citrate 3,2% | 0, 1, 2, 3 jours Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée Chromogenix | 24h Différence significative à partir de 48h (test statistique données paramétriques : test ANOVA, données non paramétriques : test KRUSKAL WALLACE ANOVA) |
| (Freyburger et al. 1999) | TA | N=14 (6 VS et 8 patients) Citrate 3,8% | 1, 2, 3, 5, 7 et 24h + 48h pour les patients Centrifugation 2000g TA, 20' Absence d'effet de la congélation COATEST-APC-Resistance-V reagent Avec et sans pre dilution en def V Chromogenix | 24h (variation < 10%) Diminution du ratio à 48h pour les patients |
| (Freyburger et al. 1999) | TA | N=5 Citrate 3,2% | 7h Centrifugation 2000g TA, 20' COATEST-APC-Resistance-V reagent Avec pre dilution en def V Chromogenix | Au moins 7h (data non précisée) |
| (Zürcher et al. 2008) | TA et transport à T°C non contrôlée (été et hiver) | N=59 2,47 (25-75 ^e p : 1,87-2,62) Citrate 3,2% | <1h (ref); 4-6; 8-12; 24-28; 48-52h Centrifugation (1500g 10 min) x2 à TA Congélation avant dosage, absence d'effet de la congélation COATEST APC Resistance V (Chromogenix, Instrumentation | 48-52h (variation moyenne <10%) |

| | | | Laboratory) | |
|-------------------|-------|---|---|---|
| (Kim et al. 2018) | + 4°C | N=22 (sains) 2,43 (sd : 0,1) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Coatest APC Resistance V Chromogenix/DiaPharma | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |

b. Stabilité en plasma frais

Pour la mesure de la RPCA, le CLSI recommande, comme pour plusieurs autres paramètres d'hémostase que le dosage, sans préciser de technique, soit effectué dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008).

Deux études, décrites dans le tableau VIII, ont évalué la conservation du plasma à TA.

En 1999, Freyburger et coll ont étudié la stabilité du plasma chez 14 individus (6 volontaires sains et 8 patients comprenant des porteurs de déficit en PS et de la mutation FV Leiden à l'état hétérozygote et homozygote) (Freyburger et al. 1999). Les échantillons, prélevés sur tube citraté 3.8%, ont été centrifugés (20 min à TA 2000g) puis conservés à TA pendant 1, 3, 5, 7 et 24h pour les volontaires sains et jusqu'à 48h pour les patients. Les résultats sont comparés à un échantillon analysé immédiatement. Pour les volontaires sains, les ratios de RPCA obtenus avec la technique modifiée à 24h étaient stables, que les plasmas aient été congelés ou non avant analyse (durée non précisée) : toutes les valeurs se situent entre 97 et 101% de la valeur initiale ($CV \leq 2.7\%$). Une variation un peu plus importante est à noter avec la méthode originale *versus* méthode modifiée sur les plasmas congelés mais sans impact sur l'interprétation du statut. Les tests réalisés sur 5 volontaires sains prélevés sur citrate 3.2% montrent une stabilité à TA de 7h. Pour les patients, les résultats sont comparables avec une variation $\leq 3\%$ à 24h mais une diminution du ratio RPCA à 48h avec la méthode modifiée.

Plus récemment, l'équipe de Foshat a étudié 42 plasmas dont 18 issus de patients avec une coagulopathie (traitements anti-vitamine K, hépatopathie) (Foshat et al. 2015). Les tubes prélevés sur citrate 3.2% ont été centrifugés 15 min à 1500g à TA puis conservés à TA et

analysés à 2h et 4h. Les ratios de RPCA sont stables à 4h avec une variation < 10 % (% de variation moyen : 0.2 ± 8.5).

En conclusion, la RPCA est stable 24h sur plasma conservé à TA. La stabilité est acceptable jusqu'à 48h à TA, mais non conforme au-delà.

Tableau VIII : Résumé des études de stabilité de la RPCA activée sur plasma frais

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------|------------------|--|--|---|
| (Foshat et al. 2015) | TA | N=42 (23 VS et 18 patients) 2.6 (sd 0.3) Citrates 3,2% | 2 et 4h Centrifugation 1500g TA, 15' COATEST-APC-Resistance-V reagent Chromogenix | Au moins 4h (test statistique non précisé p < 0.05 et variation < 10%) |
| (Freyburger et al. 1999) | TA | N=14 (6 VS et 8 patients) Citrates 3.8% | 1, 2, 3, 5, 7 et 24h + 48h pour les patients Centrifugation 2000g TA, 20' Absence d'effet de la congélation COATEST-APC-Resistance-V reagent Avec et sans pre dilution en def V Chromogenix | 24h (variation < 10%) Diminution du ratio à 48h pour les patients |
| (Freyburger et al. 1999) | TA | N=5 Citrates 3,2% | 7h Centrifugation 2000g TA, 20' COATEST-APC-Resistance-V reagent Avec pre dilution en def V Chromogenix | Au moins 7h (variation < 10%) (data non précisée) |

c. Stabilité en plasma congelé

Les 2 études ayant étudié cette conservation (Luddington et al. 1997; Foshat et al. 2015) sont rapportées dans le tableau IX.

Luddington et coll ont évalué la stabilité de la RPCA sur le plasma citraté (3.2%) de 26 individus dont 16 normaux et 10 patients aux taux bas ou limites, congelé à -80°C pendant 2 à 4 semaines (Luddington et al. 1997). Une variation statistiquement significative est décrite après un cycle de congélation/décongélation mais les données détaillées sur le pourcentage de variation ne sont pas précisées.

L'équipe de Foshat a étudié 42 plasmas dont 18 issus de patients avec une coagulopathie (Foshat et al. 2015). Les tubes prélevés sur citrate 3.2% ont été centrifugés 15 min à 1500g à TA puis congelés à -20°C et analysés à 48h, 1 et 2 semaines. Les ratios de RPCA sont stables jusqu'à 2 semaines avec une variation < 10 % et pas de changement significatif

En conclusion, la RPCA est stable au moins 15 jours sur plasma congelé conservé à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et au moins 1 mois sur plasma congelé conservé à $\leq -70^{\circ}\text{C}$. A notre connaissance, il n'existe pas de données pour des durées de conservation plus longues.

Tableau IX : Résumé des études de stabilité la RPCA sur plasma congelé

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------|------------------|---|---|--|
| (Foshat et al. 2015) | -20°C | N=42 (23 VS et 18 patients) 2.6 (sd 0.3) Citrate 3,2% | 18h, 1 et 2 semaines Centrifugation 1500g TA, 15' <i>COATEST-APC-Resistance-V reagent Chromogenix</i> | Au moins 2 semaines (test statistique non précisé p < 0.05 et variation < 10%) |
| (Luddington et al. 1997) | - 80°C | N=26 3.4 (IC95% : 3.2-3.5) Citrate 3,2% | 2 à 4 semaines de congélation Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée, Décongélation rapide à 37°C <i>Chromogenix</i> | 4 semaines variation significative (test statistique données paramétriques : test ANOVA, données non paramétriques : test KRUSKAL WALLACE ANOVA) sans détails sur le % de variation |

Synthèse :

| Paramètre | SANG TOTAL et PLASMA FRAIS | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Recommandé | Acceptable | Non conforme | Pas de données ou données insuffisantes |
| Résistance à la protéine C activée | Sang total : - jusqu'à 24h à T°C ambiante | Sang total : - jusqu'à 48h à T°C ambiante - au moins 4h à T°C réfrigérée | Sang total: - au-delà de 48h à T°C ambiante | Sang total : - au-delà de 4h T°C réfrigérée |
| | Plasma : - jusqu'à 24h à T°C ambiante | Plasma : - jusqu'à 48h à T°C ambiante | Plasma: - au-delà de 48h à T°C ambiante | |

| <u>Paramètre</u> | <u>PLASMA DECANTE et CONGELE</u> | | | |
|---|----------------------------------|--|---------------------|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Résistance à la protéine C activée</u> | | - Au moins 15 jours à T°C ≤ -20°C - Au moins 1 mois à T°C ≤ -70°C | | - Au-delà de 15 jours à T°C ≤ -20°C - Au-delà de 1 mois à T°C ≤ -70°C |

5. Temps de thrombine

Concernant la mesure du temps de thrombine (TT), nous avons recherché les données de stabilité en sang total dans différentes conditions de conservation, TA ou réfrigérée, puis en plasma frais ou congelé à différentes températures.

a. Stabilité en sang total

Le CLSI recommande, comme pour la plupart des paramètres d'hémostase, que la mesure du TT soit effectuée dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008).

Une seule étude a évalué la stabilité en sang total du TT. L'étude de Kim et coll. s'intéresse à des temps de conservation de 4h maximum à TA et à +4°C sur 22 prélèvements de volontaires sains (Kim et al. 2018). Les échantillons ont été prélevés sur citrate 3,2%, centrifugés à T0 ou T4h après conservation à TA ou +4°C, congelés puis testés en même temps après décongélation 5 minutes à 37°C. Aucune différence significative n'a été trouvée pour le TT entre T0 et T4h, que ce soit à TA ou +4°C.

Concernant la stabilité du TT chez les patients traités par dabigatran, les données ont déjà été détaillées dans les recommandations 2018 du GFHT. Les seules données disponibles concernent le TTd (temps de thrombine dilué).

En conclusion, le TT est stable au moins 4h sur sang total conservé à TA ou température réfrigérée, pas de données disponibles au-delà de 4h.

Chez les patients traités par dabigatran, se référer aux recommandations 2018 du GFHT.

Tableau X : Résumé des études de stabilité du TT sur sang total

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|-------------------|------------------|---|--|---|
| (Kim et al. 2018) | TA | N=22 (sains) 2,43 (sd : 0,1) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage <i>Thromboquik (Stago)</i> Thrombine bovine 1,5 µ/ml final | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |
| (Kim et al. 2018) | + 4°C | N=22 (sains) 2,43 (sd : 0,1) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage <i>Thromboquik (Stago)</i> Thrombine bovine 1,5 µ/ml final | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |

b. Stabilité en plasma frais

Pour le temps de thrombine, le CLSI recommande, comme pour plusieurs autres paramètres d'hémostase, que le dosage, sans préciser de technique, soit effectué dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008).

Les 3 études ayant évalué une conservation plus longue du plasma à TA et à température réfrigérée (Heil et al. 1998; Zhao and Lv 2013; Feng et al. 2014) sont présentées dans le tableau XI.

L'étude de Heil et coll réalisée en 1998 est la seule à avoir étudié des patients traités par héparine non fractionnée. Elle a été réalisée sur 20 sujets sains et 20 sujets sous héparinothérapie, prélevés sur tube citraté 3.2%. Elle 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 (temps étudiés 0h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h et 168h) (Heil et al. 1998). La variation moyenne des TT des volontaires sains est < 10 % jusqu'à 7 jours quelle que soit la température. En revanche, les TT des patients sous héparinothérapie ont varié de plus de 10 % après 8h pour les prélèvements conservés à +6°C, et avant 8h pour les prélèvements conservés à TA (variation - 16%). Les auteurs concluent que les dosages de TT de patients non traités par héparine peuvent être réalisés jusqu'à 7 jours, conservés à TA ou à +6°C, mais pour les patients sous héparine non fractionnée, les TT doivent être réalisés dans les 8h si

conservés à + 6°C ou immédiatement si conservés à TA. Le raccourcissement du TT en présence d'héparine est dû à l'inactivation de l'héparine par le relargage du facteur 4 plaquettaire des granules α .

En 2014, Feng et coll ont évalué la stabilité du TT jusqu'à 24h, sur des échantillons centrifugés, décantés et conservés à +4 et +25°C de 72 patients asymptomatiques/sains (Feng et al. 2014). Comparés aux résultats du T0, une diminution statistiquement significative du TT a été observée dès 2h mais les variations sont inférieures à 10% que ce soit à +4°C ou +25°C jusqu'à 24h (respectivement variation moyenne 0,31% et 2,09%). L'équipe conclut que le TT peut être dosé au moins jusqu'à 24h sur plasma frais.

En 2013, Zhao et coll. ont également étudié la stabilité du TT jusqu'à 24h sur plasma frais à +4°C et à TA sur 160 plasmas de patients (80 à +4°C et 80 à TA) ne recevant pas de traitement anticoagulant mais avec des temps allant jusqu'à 62.19 secondes, centrifugés, puis conservés rebouchés jusqu'à 24h (Zhao and Lv 2013). Les temps étudiés étaient 4, 8 et 24h, et les résultats comparés au T0. Comme pour la précédente étude, comparés aux résultats du T0, un raccourcissement statistiquement significatif du TT a été observé dès le premier temps étudié mais les variations sont inférieures à 10% que ce soit à +4°C ou +25°C jusqu'à 24h. L'équipe conclut que le TT peut être dosé au moins jusqu'à 24h sur plasma frais.

Concernant la stabilité du TT chez les patients traités par dabigatran, les données ont déjà été détaillées dans les recommandations 2018 du GFHT. Lorsque le temps de thrombine est utilisé pour évaluer la présence ou mesurer une concentration de dabigatran, la mesure en plasma sur tube primaire centrifugé et conservé à TA est recommandée jusqu'à 2 heures et acceptable jusqu'à 4 heures à TA ou réfrigérée (Lessire et al. 2015).

Il est important de noter que les réactifs de mesure du temps de thrombine ne sont tous équivalents (source de la thrombine, concentration, sensibilité à l'héparine...). Ces variations de réactifs pourraient expliquer certains résultats (Flanders et al. 2003).

En conclusion, en l'absence d'héparine et de dabigatran, le GFHT recommande pour le TT un délai de conservation de 24h sur plasma, conservé à TA ou à température réfrigérée. Une stabilité jusqu'à 7 jours semble acceptable.

Pour la réalisation du TT sur des plasmas héparinés conservés à TA, le GFHT ne recommande pas de délai maximal, compte tenu des variations pouvant être liées aux réactifs utilisés ainsi qu'à la dégradation de l'héparine dans les échantillons. Un délai de 8h est acceptable. Il convient de rappeler qu'un suivi d'un traitement par héparine non fractionnée n'est pas réalisé par le temps de thrombine. Ce test est donc actuellement souvent demandé pour vérifier la qualité d'un prélèvement. Il sera alors important de prendre en compte dans cette vérification le délai de réalisation mentionnée ci-dessus.

Pour la réalisation du TT sur des plasmas avec dabigatran : se référer aux publications 2018 du GFHT.

Tableau XI : Résumé des études de stabilité du TT sur plasma frais

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|-----------------------|------------------|--|--|---|
| (Heil et al. 1998) | TA | N=40 : 20 volontaires sains et 20 patients sous héparino-thérapie <i>Valeurs non renseignées</i> Citrates 3,2% | 0, 8, 24, 48, 72, 96, 168h Centrifugation 2000g TA x 2, temps non précisé, décanté <i>Test thrombine Behringwerke</i> | Volontaires sains au moins 7 jours (variation < 10%) Patients sous héparino-thérapie < 8h (variation > 10%) |
| (Feng et al. 2014) | TA | N=72 17,4±0,79 sec Citrates 3,2% | 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24h Centrifugation 3000g 10 min, température non précisée, décanté <i>Test thrombin Reagent Siemens</i> | Au moins 24h (variation < 10%) |
| (Zhao and Lv 2013) | TA | N=80 patients 19,95 (5-95 ^e p : 14.945-62.19) sec Citrates 3,2% | 0, 4, 8 et 24h Centrifugation 3000g 10 min, température non précisée, non décanté <i>Dade thrombin reagent Siemens</i> | Au moins 24h (variation < 10%) |
| (Lessire et al. 2015) | TA | N=8 plasmas enrichis dabigatran | 0, 2, 4 et 24h Centrifugation et température non précisées <i>STA®-Thrombin et HemosIL®TT</i> | 2h, majorée à 4h et 24h (différence statistique, sans impact clinique à 2h selon les auteurs) |
| (Heil et al. 1998) | + 6°C | N=40 : 20 volontaires sains et 20 patients sous héparino-thérapie <i>Valeurs non renseignées</i> Citrates 3,2% | 0, 8, 24, 48, 72, 96, 168h Centrifugation 2000g TA x 2, temps non précisé, décanté <i>Test thrombin Behringwerke</i> | Volontaires sains au moins 7 jours (variation <10%) Patients sous héparino-thérapie jusqu'à 8h (variation > 10% au-delà) |
| (Feng et al. 2014) | + 4°C | N=72 17,4±0,79 sec Citrates 3,2% | 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24h Centrifugation 3000g 10 min, température non précisée, décanté <i>Test thrombin Reagent Siemens</i> | Au moins 24h (variation < 10%) |
| (Zhao and Lv 2013) | + 4°C | N=80 patients 19,95 (5-95 ^e p : 14.945-62.19) sec | 0, 4, 8 et 24h Centrifugation 3000g 10 min, température non précisée, non décanté | Au moins 24h (variation < 10%) |

| | | | | |
|-----------------------|-------|---------------------------------|--|--|
| | | Citrate 3,2% | <i>Dade thrombin reagent Siemens</i> | |
| (Lessire et al. 2015) | + 4°C | N=8 plasmas enrichis dabigatran | 0, 2, 4 et 24h Centrifugation et température non précisées <i>STA®-Thrombin et HemosL®TT</i> | 24h (différence statistique Wilcoxon, avec impact clinique selon les auteurs) |

c. Stabilité en plasma congelé

Le CLSI se réfère à l'étude de Woodhams et coll, qui indique une stabilité du TT de 10 mois à -24°C et de 24 mois à -74°C (Woodhams et al. 2001), avec une variation < 10%. En prenant comme critère une variation < 5%, la durée de stabilité décrite est de 3 mois à -24°C et de 20 mois à -74°C. Cette étude a été réalisée sur des aliquotes de plasma issus de plasmaphérèse (citrate 3,8%) de 6 sujets sains permettant de tester plusieurs types d'aliquotage (stockage en tube de polystyrène ou dans en microtubes en polypropylène), de conditions de congélation et de durées de conservation.

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 variation statistiquement significative des taux dès 1 mois de conservation, voire 15 jours, en fonction de l'automate et de la température de conservation (-20°C ou -80°C). Si l'on considère, un seuil de 10% de variation par rapport au TT de référence, il n'y a pas de différences significatives jusqu'à 1 an, dernier temps étudié, que ce soit à -20°C (variation moyenne : 8.04% sur CA7000 et 4.71% sur CS5100) ou à -80°C (variation moyenne : 5.89% sur CA7000 et 4.4% sur CS5100).

Concernant la stabilité du TT chez les patients traités par dabigatran, les données ont déjà été détaillées dans les recommandations 2018 du GFHT. Il y a très peu de données pour la conservation du temps de thrombine lorsqu'il est utilisé pour évaluer la présence ou mesurer une concentration de dabigatran en plasma congelé.

Les données de ces deux études sont rapportées dans le tableau XII (Woodhams et al. 2001; Zhao and Lv 2013).

En conclusion, le GFHT conclut que le délai maximal recommandé de conservation du plasma congelé pour la réalisation du TT est de 12 mois à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$, dégradation au-delà, et d'au moins 12 mois à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$. La conservation au moins 24 mois à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$ est acceptable, pas de données disponibles au-delà de 24 mois à $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Tableau XII : Résumé des études de stabilité du TT sur plasma congelé

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|------------------------|------------------|---|--|---|
| (Woodhams et al. 2001) | -20°C | N=6 sujets sains Plasmaphérese sur citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C <i>STA Thrombin reagent (Stago)</i> | 6 mois (variation < 5%) 12 mois (variation < 10%) |
| (Zhao et al. 2017) | -20°C | N=36 sur CA7000 et 36 sur CS5100 17,6±1,0 s sur CS5100 19,5±0.9s sur CA7000 Citrate 3.2% | 0, 15 jours, 1 mois, 6 mois, 1 an Centrifugation 3000g 10min, température non précisée, Décongélation 10min à +37°C <i>Dade thrombin reagent Siemens</i> | Au moins 12 mois (variation < 10%) |
| (Woodhams et al. 2001) | -70 °C | N=6 sujets sains Plasmaphérese sur Citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C <i>STA Thrombin reagent (Stago)</i> | 20 mois (variation < 5%) 24 mois (variation < 10%) |
| (Zhao et al. 2017) | -80°C | N=36 sur CA7000 et 36 sur CS5100 17,4±1,2 s sur CS5100 19,3±0.9s sur CA7000 Citrate 3.2% | 0, 15 jours, 1 mois, 6 mois, 1 an Centrifugation 3000g 10min, température non précisée, Décongélation 10min à +37°C <i>Dade thrombin reagent Siemens</i> | Au moins 12 mois (variation < 10%) |

Synthèse :

| <u>Paramètre</u> | <u>SANG TOTAL et PLASMA FRAIS</u> | | | |
|---|---|--|---|---|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Temps de thrombine (avec ou sans héparine)</u> | | Sang total : - au moins 4h à T°C ambiante et réfrigérée | | Sang total : - au-delà de 4h T°C ambiante et réfrigérée |
| Pour les plasmas contenant du dabigatran, se référer aux précédents documents du GFHT | Plasma: - au moins 24h à T°C ambiante ou réfrigérée (sans traitement) | Plasma : - jusqu'à 7 jours à T°C ambiante ou réfrigérée (sans traitement) - strictement dans les 8h à T°C ambiante (si plasma hépariné) | Plasma: - au-delà de 8h à T°C ambiante (si_plasma hépariné) | |

| <u>Paramètre</u> | <u>PLASMA DECANTE et CONGELE</u> | | | |
|---------------------------|---|--|--|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Temps de thrombine</u> | - Jusqu'à 12 mois à T°C ≤ -20°C (sans traitement) - Au moins 12 mois à T°C ≤ -70°C (sans traitement) | - Au moins 24 mois à T°C ≤ -70°C (sans traitement) | - Au-delà de 12 mois à T°C ≤ -20°C (sans traitement) | - Au-delà de 24 mois à T°C ≤ -70°C (sans traitement) |

6. Temps de reptilase

a. Stabilité en sang total

Le CLSI n'émet pas de recommandations pour la mesure du temps de reptilase (TR).

Une seule étude (tableau XIII) a évalué la stabilité en sang total du TR dans deux conditions de températures. L'étude de Kim et coll. s'intéresse à des temps de conservation de 4h maximum à TA et à +4°C sur 22 prélèvements de volontaires sains (Kim et al. 2018). Les échantillons ont été prélevés sur citrate 3,2%, centrifugés à T0 ou T4h après conservation à TA ou +4°C, congelés puis testés en même temps après décongélation 5 minutes à 37°C. Aucune différence significative n'a été trouvée pour le TR entre T0 et T4h, que ce soit à TA ou +4°C.

En conclusion, le TR est stable au moins 4h sur sang total conservé à TA ou à température réfrigérée, pas de données disponibles au-delà.

Tableau XIII : Résumé des études de stabilité du TR sur sang total

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|-------------------|------------------|---|---|---|
| (Kim et al. 2018) | TA | N=22 (sains) 2,43 (sd : 0,1) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Aroxin (Sigma diagnostics) Aroxin 5 µ/ml final | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |
| (Kim et al. 2018) | + 4°C | N=22 (sains) 2,43 (sd : 0,1) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage Aroxin (Sigma diagnostics) Aroxin 5 µ/ml final | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |

b. Stabilité en plasma frais

A notre connaissance, il n'existe pas de données sur la stabilité du TR en plasma conservé à TA ou à température ambiante.

c. Stabilité en plasma congelé

A notre connaissance, il n'existe pas de données sur la stabilité du TR en plasma congelé.

Synthèse :

| <u>Paramètre</u> | <u>SANG TOTAL et PLASMA FRAIS</u> | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|---|---------------------|---|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Temps de reptilase</u> | | <u>Sang total :</u> - au moins jusqu'à 4h à T°C ambiante et réfrigérée | | <u>Sang total :</u> - au-delà de 4h à T°C ambiante ou réfrigérée |
| | | | | <u>Plasma :</u> - absence de données |

| <u>Paramètre</u> | <u>PLASMA DECANTE et CONGELE</u> | | | |
|---------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------|---|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Temps de reptilase</u> | | | | - Absence de données pour l'ensemble des conditions |

7. Recherche d'un anticoagulant circulant de type lupique

Concernant la recherche d'un anticoagulant circulant (ACC) de type lupique ou lupus anticoagulant (LA), nous avons recherché les données de stabilité en sang total dans différentes conditions de conservation, TA ou réfrigérée, puis en plasma frais ou congelé à différentes températures. Toutes les techniques utilisées pour la recherche d'un ACC lupique sont présentées dans ce paragraphe, qu'il s'agisse d'un principe du temps de céphaline avec activateur (TCA), de test de venin de vipère Russel dilué (DRVVT) ou de temps de coagulation avec silice (SCT). Le DRVVT est composé de deux temps de coagulation appelé lupus

anticoagulant temps 1 (LA1 ou recherche) et lupus anticoagulant temps 2 (LA2 ou confirmation), ainsi que d'un ratio LA1/LA2.

Selon l'International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Pengo et al. 2009) la recherche d'ACC lupique doit être effectuée par 2 tests reposant sur des principes d'activation de la coagulation différents et sur un même échantillon si un ou plusieurs tests sont réalisés avec plusieurs concentrations de phospholipides. La sensibilité et la stabilité des tests utilisés pour la recherche des ACC de type lupique sont dépendantes des réactifs utilisés.

Les [recommandations pré-analytiques concernant les conditions de préparation, centrifugations](#) ont déjà été détaillées dans un précédent document du GFHT et ne seront pas revues de manière exhaustive dans ce paragraphe.

a. Stabilité en sang total

Le document H60-A du CLSI dédié à la recherche des ACC de type lupique reprend les éléments du document H21, et recommande un transport des échantillons à TA et un traitement dans les 4 heures suivant le prélèvement (Adcock et al. 2008; Ledford-Kraemer et al. 2014).

L'étude de Luddington en 1997 a inclus des patients avec des valeurs pathologiques (n=10 sur un total de 26 échantillons) (Luddington et al. 1997). Les valeurs sont exprimées en ratio de DRVVT, ratio patient/témoin (témoin maison réalisé par addition de substitut plaquettaire à du plasma pauvre en plaquettes pour obtenir un temps de 40 secondes). Après 24h de conservation en sang total à TA, une variation à la baisse des ratios de DRVVT est observée (variation statistiquement significative) sur les prélèvements double centrifugés (2500g, 2 fois 10 min, température non précisée). Cette diminution des ratios du DRVVT des patients « pathologiques », reste cependant supérieure au seuil de positivité 1.4 retenu dans cette étude. Les auteurs suggèrent que la diminution du ratio pourrait entraîner une mauvaise classification d'un patient avec un ACC de type lupique de faible puissance biologique. Ils concluent cependant à une stabilité de 24h en sang total à TA pour le test du DRVVT.

L'étude de Kim et coll. s'intéresse à des temps de conservation de 4h maximum à TA et à +4°C sur 22 prélèvements de volontaires sains (Kim et al. 2018). Les échantillons ont été prélevés sur citrate 3,2%, centrifugés à T0 ou T4h après conservation à TA ou +4°C, congelés puis testés en même temps après décongélation 5 minutes à 37°C. Une différence statistiquement significative a été trouvée pour le TCA (réactif PTTLA Stago) entre T0 et T4h à TA ou entre les T4h à TA *versus* +4°C. Cet allongement des temps de coagulation a été jugé cliniquement non pertinent (variation de 3.3%, inférieur au critère fixé par les auteurs de 6%). On peut noter que le TCA « classique » (réactif Platelin Stago) était également prolongé à T4h à TA et à +4°C. Les auteurs suggèrent un possible bénéfice de conserver les prélèvements à +4°C pour la recherche d'un ACC de type lupique par diminution de l'activation plaquettaire par le froid et donc de l'exposition des phospholipides.

Les résultats sont présentés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Résumé des études de stabilité des recherches ACC de type lupique sur sang total

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------|------------------|---|--|---|
| (Luddington et al. 1997) | TA | N=26 (sains et pathologiques) 1.11 (IC95% : 1.07-1.15) Citrate 3,2% | 0, 1, 2, 3 jours Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée <i>DRVVT (Diagnostic reagent ltd, Oxon UK) sur KC10</i> | <24h Différence significative à partir de 24h pour les plasmas positifs (test statistique données paramétriques : test ANOVA, données non paramétriques : test KRUSKAL WALLACE ANOVA) |
| (Kim et al. 2018) | TA | N=22 (sains) 2,43 (sd : 0,1) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage <i>PTT LA (Stago)</i> | Variation significative à T4h test statistique, mais non pertinent cliniquement (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |
| (Kim et al. 2018) | + 4°C | N=22 (sains) 2,43 (sd : 0,1) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage <i>PTT LA (Stago)</i> | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |

En conclusion, les données de la littérature sont insuffisantes pour émettre des recommandations. Ces données font apparaître que la recherche d'ACC de type lupique est stable au moins 4 heures sur sang total conservé à TA. Un délai de conservation de 4h à température réfrigérée est également acceptable. Données insuffisantes au-delà.

b. Stabilité en plasma frais

Le document H60-A du CLSI recommande une conservation du plasma pauvre en plaquettes (PPP <10G/L) à TA pour une durée n'excédant pas 4 heures (Ledford-Kraemer et al. 2014), ainsi qu'une conservation des PPP en aliquote d'environ 1ml de plasma décanté en tube polypropylène bouché dès la double centrifugation.

En 2015, l'équipe de Foshat a étudié 42 plasmas dont 18 issus de patients avec une coagulopathie (Foshat et al. 2015). Les tubes prélevés sur citrate 3.2% ont été centrifugés 15 min à 1500g à TA puis conservés à TA et analysés à 2h et 4h. Les DRVVT (exprimés en secondes) sont stables à 4h avec une variation < 10 % (% moyen de variation : -6.5 +/-13.5 pour les plasmas pathologiques et -1.3+/-1.6 pour les plasmas normaux).

Dans ce paragraphe concernant la stabilité en plasma frais, il convient de souligner deux études (Froom and Barak 2011; Gosselin et al. 2015) qui soulignent la nécessité d'avoir un PPP de bonne qualité avant de réaliser la recherche d'un ACC de type lupique que celle-ci soit réalisée en plasma frais le jour même du prélèvement ou congelé. L'étude de Froom et coll. a comparé les tests DRVVT et SCT de 50 plasmas consécutifs pathologiques (ratio DRVTT>1.1) après une simple ou une double centrifugation à 4h après le prélèvement, puis ceux de 40 plasmas (20 normaux et 20 SCT positifs) après une simple centrifugation, à des temps différents : T4h *versus* T6-8h (Froom and Barak 2011). La différence est non significative entre la simple et la double centrifugation des tests réalisés en plasmas frais, mais il faut noter que dès la première centrifugation, le taux des plaquettes résiduelles était compris entre 8 et 30G/L. Concernant les variations entre T4h et T6-8h, 2 plasmas pathologiques ont été retrouvés discordants pour le DRVVT sur les 40 testés avec une diminution des ratios, dont un patient passant de 1.40 à normal 1.14, le second de 1.37 à 1.22. Les ratios de SCT semblent moins affectés, une seule discordance est notée, sans impact clinique.

Tableau XV : Résumé des études de stabilité de la recherche d'un ACC de type lupique sur plasma frais

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|----------------------|---------------------|--|---|--|
| (Foshat et al. 2015) | TA | N=42 (23 VS et 18 patients) Moy. normaux 37sec (sd 3.7) Moy. pathologiques 63sec (sd 21) | 2 et 4h Centrifugation 1500g TA, 15' | 4h (test statistique non précisé p < 0.05 et variation < 10%) |

| | | | | |
|------------------------|----|---|---|---|
| | | Citrate 3,2% | <i>DRVVT (CryoCheck LA Check reagent (Precision BioLogic))</i> | |
| (Froom and Barak 2011) | TA | N=50 Ratio LA1/LA2 >1.1 (essais simple versus double centrifugation) N=40 (dont 20 normaux et 20 SCT pathologiques pour les essais de temps) | 4h et 6-8h 1 ^{er} essai : Simple centrifugation 1500g, Température non précisée, 10', Seconde centrifugation même conditions 10' plus tard. 2 ^{ème} essai : Simple centrifugation 1500g, Température non précisée, 10' <i>DRVTT et SCT (IL)</i> | 4h (test statistique Pearson et comparaison de variance p>0.05) Mais 2 plasmas avec DRVVT pathologiques discordants entre T4h et T6-8h avec diminution des ratios, dont 1 passant de 1.40 à normal 1.14 ; SCT non modifiés) |

En conclusion, la recherche d'ACC de type lupique est stable au moins 4 heures sur plasma conservé à TA, données insuffisantes au-delà.

Pour rappel, la double centrifugation avec décantation intermédiaire est recommandée y compris si les tests sont réalisés en plasmas frais sans congélation ([recommandations hémostase générale](#)). La simple centrifugation (hors congélation) est acceptable si une vérification des plaquettes résiduelles est réalisée (<10 G/L).

c. Stabilité en plasma congelé

Le CLSI se réfère à l'étude de Woodhams et coll, et indique une stabilité des ACC de type lupique de 14 jours à -24°C et d'au moins 6 mois à -74°C (Woodhams et al. 2001). Il est important de noter que les recommandations du CLSI sont probablement extrapolées des tests globaux taux de prothrombine (TP) et TCA (activateur silice et kaolin), car dans l'article de Woodhams et coll. les autres tests pouvant être réalisés pour la recherche des ACC lupiques (TCA sensibilisé, de DRVVT ou de SCT) ne sont pas détaillés. Le CLSI recommande une congélation rapide en microtube en polypropylène après l'obtention du PPP, soit en moins de 4 heures après le prélèvement (Adcock et al. 2008).

Les recommandations 2009 de l'ISTH sur la recherche de LA préconisent une conservation à -70°C ou en deçà (Pengo et al. 2009). La congélation doit être la plus rapide possible.

L'équipe de Foshat a étudié 42 plasmas dont 18 issus de patients avec une coagulopathie (Foshat et al. 2015). Les tubes prélevés sur citrate 3.2% ont été centrifugés 15 min à 1500g à

TA puis congelés à -20°C et analysés à 48h, 1 et 2 semaines. Les ratios de DRVVT sont stables jusqu'à 2 semaines avec une variation moyenne <10 %, mais dont les écarts types sont >10% (5.1% +/-12.4% pour les plasmas pathologiques). Les auteurs concluent à une stabilité de 2 semaines à -20°C.

Luddington et coll ont évalué la stabilité du DRVVT sur le plasma citraté (3.2%) de 26 individus dont 16 normaux et 10 patients aux ratios bas ou limites, congelé à -80°C pendant 2 à 4 semaines (Luddington et al. 1997). Une variation statistiquement significative est décrite après un cycle de congélation mais les données détaillées sur le pourcentage de variation ne sont pas précisées, cependant il est noté une diminution des ratios normaux et pathologiques.

Enfin, Gosselin et coll. ont étudiés 379 plasmas (normaux et pathologiques) congelés dans les 4 heures suivant le prélèvement à -70°C pour 1 semaine (Gosselin and Dwyre 2015). Aucun impact sur le DRVVT n'a été observé pour cette durée de conservation si les plasmas sont double centrifugés avant congélation, mais il existe un raccourcissement en cas de simple centrifugation, quelle que soit la valeur des plaquettes résiduelles après la première centrifugation. En cas de simple centrifugation, et après réalisation des tests sur les plasmas décongelés à 37°C, 13 échantillons étaient négatifs après décongélation (ratio<1.20) (sur 27 échantillons positifs).

Le transport des échantillons congelés et les conditions de décongélation ont fait l'objet de plusieurs publications et recommandations. Selon le CLSI, la décongélation des échantillons congelés doit être de 5 minutes au bain marie à 37°C. En revanche, en cas d'échantillons transportés en carboglace, la décongélation doit être faite dans un incubateur à sec à 37°C, en tube ouvert pendant au moins 15 minutes (Ledford-Kraemer et al. 2014) ce qui permet de retrouver un équilibre entre le CO₂ de l'air ambiant et celui du plasma transporté en carboglace et ainsi rééquilibrer le pH du plasma dont les variations sont à l'origine d'une prolongation des temps de coagulation. Ces données sont aussi mentionnées dans les recommandations d'Adcock et coll. en 2012 (Adcock Funk et al. 2012).

Les TCA et le DRVVT semblent être particulièrement sensibles aux variations de pH. L'impact des échantillons transportés en carboglace, en particulier au-delà de 16h a été détaillé dans le paragraphe d'introduction du document.

Tableau XVI : Résumé des études de stabilité de la recherche d'un ACC de type lupique sur plasma congelé

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|--------------------------|------------------|--|--|--|
| (Woodhams et al. 2001) | -20°C | N=6 sujets sains Plasmaphérese sur citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C <i>PTTA automated et CK-Prest (Stago)</i> | 6 mois (variation < 5%) 8 mois (variation < 10%) |
| (Foshat et al. 2015) | -20°C | N=42 (23 VS et 18 patients) Moy. normaux 37sec (sd 3.7) Moy. pathologiques 63sec (sd 21) Citrate 3,2% | 18h, 1 et 2 semaines Centrifugation 1500g TA, 15' <i>DRVVT (CryoCheck LA Check reagent (Precision BioLogic))</i> | Au moins 2 semaines (test statistique p < 0.05 et variation < 10%) |
| (Woodhams et al. 2001) | -70 °C | N=6 sujets sains Plasmaphérese sur Citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C <i>PTTA automated et CK-Prest (Stago)</i> | 24 mois (variation < 5%) (variation < 10%) |
| (Luddington et al. 1997) | - 80°C | N=26 1.11 (IC95% : 1.07-1.15) Citrate 3,2% Dont un patient ACC lupique positif et un patient limite | 2 à 4 semaines de congélation Centrifugation (2500g 10 min) x2 T°C non précisée, Décongélation rapide à 37°C <i>DRVVT sur KC10 (Diagnostic reagent Ltd, Oxon UK)</i> | 2 à 4 semaines variation non statistiquement significative sur les plasmas normaux et moyenne de variation du ratio +0.05 (test statistique données paramétriques : test ANOVA, données non paramétriques : test KRUSKAL WALLACE ANOVA) sans détails sur le % de variation, mais diminution des ratios. |
| (Gosselin et al. 2015) | -70°C | N=58 (normaux et pathologiques) | 1 semaine de congélation Conditions centrifugations non précisées <i>DRVVT Siemens</i> | 1 semaine si double centrifugation (variation statistique) |

En conclusion, pour la recherche d'un ACC de type lupique, la double centrifugation est recommandée avant congélation.

En cas de transport en carboglace des échantillons, le GFHT recommande un respect strict des recommandations émises en introduction.

Les données de la littérature sont insuffisantes pour émettre des recommandations sur la durée de conservation pour la recherche d'un ACC de type lupique. Cette recherche est stable au moins 15 jours sur plasma conservé à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et au moins 4 semaines à $\leq -70^{\circ}\text{C}$ (avis d'experts), données insuffisantes au-delà.

Synthèse :

| <u>Paramètre</u> | <u>SANG TOTAL et PLASMA FRAIS</u> | | | |
|---|--|--|---------------------|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Recherche d'un anticoagulant circulant de type lupique</u> | | Sang total : - au moins 4h à TA ou à T°C réfrigérée | | Sang total : - au-delà de 4h T°C ambiante ou réfrigérée |
| | Plasma : - double centrifugation | Plasma : - au moins 4h à T°C ambiante - simple centrifugation mais vérification des plaquettes résiduelles < 10 G/L | | Plasma : - au-delà de 4h à T° ambiante - conservation à T° réfrigérée |

| <u>Paramètre</u> | <u>PLASMA DECANTE et CONGELE</u> | | | |
|---|---|--|---------------------|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Recherche d'un anticoagulant circulant de type lupique</u> | - Double centrifugation avant congélation | - Au moins 15 jours à T°C $\leq -20^{\circ}\text{C}$ - Au moins 4 semaines à T°C $\leq -70^{\circ}\text{C}$ | | - Absence de données : au-delà de 15 jours à T°C $\leq -20^{\circ}\text{C}$ - Absence de données : au-delà de 4 semaines à T°C $\leq -70^{\circ}\text{C}$ |

8. Facteur XI (activité coagulante)

a. Stabilité en sang total

Pour l'activité coagulante du facteur XI (FXI), le CLSI, comme pour la plupart des autres facteurs de coagulation, préconise un délai maximal de conservation sur sang total citraté de 4 heures, à TA (Adcock et al. 2008). Ceci est cohérent avec l'étude de Favalaro et coll. qui a évalué un délai de 3,5h (durée maximale de l'étude) sans noter de variation significative (Favalaro et al. 2004), ainsi qu'avec l'étude de Kim et coll. qui décrit une stabilité des taux de FXI jusqu'à 4h (durée maximale de l'étude) (Kim et al. 2018). Une troisième étude a évalué des durées de conservation plus longues et a conclu à une stabilité d'au moins 48-52h pour le dosage du FXI sur sang total conservé à TA (biais moyen inférieur à 10% et cliniquement non significatif) (Zürcher et al. 2008). Ces trois études sont décrites dans le tableau XVII.

Pour le sang total citraté conservé à +4°C, les équipes de Favalaro et Kim ne rapportent pas de variations cliniquement significatives des taux de FXI mesuré sur des prélèvements de témoins sains conservés à +4°C ou dans la glace jusqu'au temps maximum évalué : 3,5h (Favalaro et al. 2004) et 4h (Kim et al. 2018).

En conclusion, les données de la littérature sont insuffisantes pour émettre des recommandations. Le FXI semble stable jusqu'à 48h sur sang total conservé à TA. Une conservation du sang total à température réfrigérée semble acceptable au moins 4h, données insuffisantes au-delà.

Tableau XVII : Résumé des études de stabilité du facteur XI sur sang total

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|------------------------|---|--|--|--|
| (Favalaro et al. 2004) | TA | N=39 (sains) Citrate 3,2% | 0 et 3,5h Centrifugation 2500g 15 minutes (T° non précisée) Congélation avant dosage à -80°C | Au moins 3,5h (test statistique : test Mann-Whitney) |
| (Zürcher et al. 2008) | TA et transport à T°C non contrôlée (été et hiver) | N=59 108% (25-75 ^e p : 97-116) 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 | Au moins 48-52h (variation moy<10%) |

| | | | | |
|------------------------|-------|--|---|---|
| (Kim et al. 2018) | TA | N=12 (sains) 105,8% (sd : 20,3%) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage à -70°C | Stabilité à 4h (Biais statistiquement significatif mais considéré comme non cliniquement significatif par les auteurs car variation < 6% vs T0h) (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |
| (Favaloro et al. 2004) | +4°C | N=39 (sains) Citrate 3,2% | 0 et 3,5h Centrifugation 2500g 15 minutes (T° non précisée) Congélation avant dosage à -80°C | Au moins 3,5h (test statistique : test Mann-Whitney) |
| (Kim et al. 2018) | Glace | N=12 (sains) 105,8% (sd : 20,3%) Citrate 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage à -70°C | Stabilité à 4h (Biais statistiquement significatif mais considéré comme non cliniquement significatif par les auteurs car variation < 6% vs T0h) (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |

b. Stabilité en plasma frais

Sur plasma frais, le délai maximum de conservation du facteur XI recommandé par le CLSI est de 4h, que ce soit à TA ou +2-+4°C (Adcock et al. 2008).

Néanmoins, Linskens 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, et conservés jusqu'à au moins 48h, que ce soit avec les réactifs Stago ou Instrumentation Laboratory/Werfen (Linskens and Devreese 2018). Cette étude est décrite dans le tableau XVIII.

Il n'y a pas de données sur la conservation des plasmas frais à température réfrigérée.

En conclusion, le FXI semble stable au moins 48h sur plasma conservé à TA, mais ces données sont à interpréter avec précaution (une seule étude, uniquement sur sujets sains). Les données sont insuffisantes pour la conservation à température réfrigérée.

Tableau XVIII : Résumé des études de stabilité du facteur XI sur plasma frais

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|------------------------------|---------------------|----------------------------------|---|---------------------------------------|
| (Linskens and Devreese 2018) | TA | N=19 (sains) Citrate 3,2% | 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 et 48h Centrifugation (1500g 15 minutes x2, TA) Congélation avant dosage à -20°C <i>Réactif Stago sur STAR MAX (STA-CK Prest et STA factor deficient plasma)</i> | Au moins 48h (variation moy < 10%) |

| | | | | |
|------------------------------|----|------------------------------|--|---------------------------------------|
| (Linskens and Devreese 2018) | TA | N=19 (sains) Citrate 3,2% | 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 et 48h Centrifugation (1500g 15 minutes x2, TA) Congélation avant dosage à -20°C <i>Réactif Werfen sur ACL-TOP (HemosIL SynthASil et factor déficient plasma)</i> | Au moins 48h (variation moy < 10%) |
|------------------------------|----|------------------------------|--|---------------------------------------|

c. Stabilité en plasma congelé

Les durées maximales de conservation des plasmas congelés préconisées par le CLSI (Adcock et al. 2008), qui sont fondées sur l'étude de Woodhams et coll. (Woodhams et al. 2001), sont variables selon la température de conservation. Le FXI est stable jusqu'à 18 mois à une température de -74°C pour un biais moyen accepté de 10% ou de 6 mois pour un biais moyen accepté de 5%, 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 4 mois pour un biais moyen accepté de 5% ou de 6 mois pour un biais moyen accepté de 10%, quel que soit le type de tube (Woodhams et al. 2001). Cependant, les recommandations du CLSI ne reposent que sur une cette seule étude portant sur un faible nombre d'échantillons (n=6) provenant de sujets sains.

Les données de l'étude de Woodhams ainsi que celles des deux suivantes (Favaloro et al. 2004; Zander et al. 2014) sont rapportées dans le tableau XIX.

Zander et coll. rapportent une stabilité des plasmas d'au moins 3 mois (durée maximale étudiée) lorsqu'ils sont conservés à -20°C (+/-2°C), -80°C (+/-2°C) ou moins (<-130°C) (Zander et al. 2014). Les échantillons étaient conservés en microtubes en polypropylène. L'exposition brève (< 5 min) à des températures variables (de -100 °C à TA) n'a pas eu d'effet, quelle que soit la température de stockage initiale.

Favaloro et coll. n'ont pas retrouvé de différence significative sur les taux de FXI 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 FXI. Une tendance à une diminution des taux de FXI étant observée en l'absence d'homogénéisation (Favaloro et al. 2017).

Pour être exhaustif, un article rapporte l'étude de la stabilité de plasmas conservés en carboglace. L'équipe de Gosselin (Gosselin et al. 2015) a étudié la stabilité de 10 pools de plasmas citratés 3,2% (taux moyen 107%, de 67 à 145%), aliquotés après double centrifugation en microtube à bouchon à clipser ou à visser, conservés à -70°C ou dans de la carboglace pendant au moins 16h puis décongelés 5 minutes à 37°C bouchés ou débouchés. Des différences statistiquement significatives ont été observées entre les différents modes de décongélation et les différents tubes mais aucune différence n'était cliniquement significative.

En conclusion, il y a peu de données sur la stabilité du FXI en plasma congelé. Le FXI est stable jusqu'à 6 mois à $\leq -20^\circ\text{C}$ et jusqu'à 18 mois à -70°C .

Tableau XIX : Résumé des études de stabilité du facteur XI sur plasma congelé

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|------------------------|------------------|--|---|--|
| (Woodhams et al. 2001) | -20°C | N=6 sujets sains Plasmaphérese sur citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C <i>CK-Prest (Stago)</i> | 4 mois (variation < 5%) 6 mois (variation < 10%) |
| (Zander et al. 2014) | -20°C | N=10 pools de patients (5 pools de patients de rea et 5 pools de patients de consultation) | 0, 7, 30 et 90 jours Conditions non précisées <i>ACL Top</i> | Au moins 3 mois (variation < 3CVs, test-t apparié) |
| (Favaloro et al. 2017) | -20°C | N=48 patients consécutifs | 0 puis 2 à 7 jours Conditions pré-analytiques non précisées Comparaison des méthodes d'homogénéisation après décongélation 5 min à 37°C au bain-marie : inversion, roue tourne-tube, vortex ou pas de mélange | Pas de différence après 2 à 7 jours si homogénéisation (inversion, vortex ou roue tourne-tube) Tendance à la diminution des taux en l'absence de mélange (test de Wilcoxon) |
| (Woodhams et al. 2001) | -70 °C | N=6 sujets sains Plasmaphérese sur Citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C <i>CK-Prest (Stago)</i> | 6 mois (variation < 5%) 18 mois (variation < 10%) |
| (Zander et al. 2014) | -80°C | N=10 pools de patients (5 pools de patients de rea et 5 pools de patients de consultation) | 0, 7, 30 et 90 jours Conditions non précisées <i>ACL Top</i> | Au moins 3 mois (variation < 3CVs, test-t apparié) |
| (Favaloro et al. 2017) | -80°C | N=48 patients consécutifs | 0 puis 2 à 7 jours Conditions pré-analytiques non précisées Comparaison des méthodes d'homogénéisation après | Pas de différence après 2 à 7 jours si homogénéisation (inversion, vortex ou roue tourne-tube) Tendance à la diminution des taux en l'absence de mélange |

| | | | | |
|----------------------|--------|--|--|--|
| | | | décongélation 5 min à 37°C au bain-marie : inversion, roue tourne-tube, vortex ou pas de mélange | (test de Wilcoxon) |
| (Zander et al. 2014) | -130°C | N=10 pools de patients (5 pools de patients de rea et 5 pools de patients de consultation) | 0, 7, 30 et 90 jours Conditions non précisées <i>ACL Top</i> | Au moins 3 mois (variation < 3CVs, test-t apparié) |

Synthèse :

| <u>Paramètre</u> | <u>SANG TOTAL et PLASMA FRAIS</u> | | | |
|-------------------|-----------------------------------|---|---------------------|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Facteur XI</u> | | Sang total : - jusqu'à 48h à T°C ambiante - au moins 4h à T°C ambiante ou réfrigérée | | Sang total : - au-delà de 48h T°C ambiante -au-delà de 4h à T° réfrigérée |
| | | Plasma : - au moins 48h à T°C ambiante | | Plasma : - au-delà de 48h à T°C ambiante - conservation à T°C réfrigérée |

| <u>Paramètre</u> | <u>PLASMA DECANTE et CONGELE</u> | | | |
|-------------------|----------------------------------|---|---------------------|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Facteur XI</u> | | - Jusqu'à 6 mois à T°C ≤ -20°C - Jusqu'à 18 mois à T°C ≤ -70°C | | |

9. Facteur XII (activité coagulante)

a. Stabilité en sang total

Pour l'activité coagulante du facteur XII (FXII), le CLSI, comme pour la plupart des autres facteurs de coagulation, préconise un délai maximal de conservation sur sang total citraté de 4h, à TA (Adcock et al. 2008).

Ceci est cohérent avec l'étude de Favaloro et coll. qui a évalué un délai de 3,5h (durée maximale de l'étude) sans noter de variation pertinente (Favaloro et al. 2004) ainsi qu'avec l'étude de Kim et coll. qui décrit une stabilité des taux de FXII jusqu'à 4h (durée maximale de l'étude) (Kim et al. 2018). Ces études sont décrites dans le tableau XX.

Pour le sang total citraté conservé à +4°C, les équipes de Favaloro et Kim ne rapportent pas de variations cliniquement significative des taux de FXII mesurés sur des prélèvements de témoins sains conservés à +4°C ou dans la glace jusqu'au temps maximum évalué : 3,5h (Favaloro et al. 2004) et 4h (Kim et al. 2018).

En conclusion, les données de la littérature sont insuffisantes pour émettre des recommandations. Le FXII est stable au moins 4h sur sang total conservé à TA ou à température réfrigérée, données insuffisantes au-delà.

Tableau XX : Résumé des études de stabilité du facteur XII sur sang total

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|------------------------|------------------|--|--|---|
| (Favaloro et al. 2004) | TA | N=39 (sains) Citrates 3,2% | 0 et 3,5h Centrifugation 2500g 15 minutes (T° non précisée) Congélation avant dosage à -80°C | Au moins 3,5h (test statistique : test Mann-Whitney) |
| (Kim et al. 2018) | TA | N=12 (sains) 109,4% (sd : 40,9%) Citrates 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage à -70°C | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |
| (Favaloro et al. 2004) | +4°C | N=39 (sains) Citrates 3,2% | 0 et 3,5h Centrifugation 2500g 15 minutes (T° non précisée) Congélation avant dosage à -80°C | Au moins 3,5h (test statistique : test Mann-Whitney) |
| (Kim et al. 2018) | Glacé | N=12 (sains) 109,4% (sd : 40,9%) Citrates 3,2% | 0, 4h Conditions de centrifugation non précisées Congélation avant dosage à -70°C | Au moins 4h (test statistique Tukey et variation moyenne < 6%) |

b. Stabilité en plasma frais

Sur plasma frais, le délai maximum de conservation du facteur XII recommandé par le CLSI est de 4h, que ce soit à TA ou +2-+4°C (Adcock et al. 2008).

Linskens et coll. ont étudié deux systèmes analytiques sur des délais plus longs (48h). Ils 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 8h avec le système réactifs/automates Stago, et jusqu'à 24h avec le système réactifs/automates Instrumentation Laboratory/Werfen (Linskens and Devreese 2018). Ces données sont décrites dans le tableau XXI. Une augmentation significative des taux est observée à 48h de stockage (% d'augmentation moyen 13,9% et 10,3%, respectivement pour Stago et IL/Werfen. Pour Stago, dès 12h, l'intervalle de confiance 99% est compris entre -2,4 et 11,4%. Cette augmentation de l'activité du FXII est probablement due à l'activation de la phase contact, phénomène déjà décrit pour des plasmas issus du don conservés à température réfrigérée (Cardigan and Green 2015).

Il n'y a pas de données à température réfrigérée.

En conclusion, le FXII est stable 8h sur plasma conservé à TA. Il n'y a pas de données sur la stabilité à température réfrigérée.

Tableau XXI : Résumé des études de stabilité du facteur XII sur plasma frais

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|------------------------------|---------------------|------------------------------|--|---|
| (Linskens and Devreese 2018) | TA | N=19 (sains) Citrate 3,2% | 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 et 48h Centrifugation (1500g 15 minutes x2, TA) Congélation avant dosage à -20°C <i>Réactif Stago sur STAR MAX (STA-CK Prest et STA factor deficient plasma)</i> | 8h (variation moy < 10%) Augmentation des taux |
| (Linskens and Devreese 2018) | TA | N=19 (sains) Citrate 3,2% | 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 et 48h Centrifugation (1500g 15 minutes x2, TA) Congélation avant dosage à -20°C Réactif Werfen sur ACL-TOP (HemosIL SynthASil et factor deficient plasma) | 24h (variation moy < 10%) Augmentation des taux |

c. Stabilité en plasma congelé

Les durées maximales de conservation des plasmas congelés préconisées par le CLSI (Adcock et al. 2008), qui sont fondées sur l'étude de Woodhams et coll. (Woodhams et al. 2001), sont variables selon la température de conservation. Le FXII est stable jusqu'à au moins 24 mois (délai maximal étudié) à une température de -74°C pour un biais moyen accepté de 5%, 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 18 mois pour un biais moyen accepté de 10%, quel que soit le type de tube (Woodhams et al. 2001). Cependant, ces recommandations ne reposent que sur une étude portant sur un faible nombre d'échantillons (n=6) provenant de sujets sains.

Les données de l'étude de Woodhams ainsi que celles de Favaloro et coll (Favaloro et al. 2017) sont rapportées dans le tableau XXII.

Favaloro et coll. n'ont pas retrouvé de différence significative sur les taux de FXII 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 FXII, une tendance à une diminution des taux de FXII étant observée en l'absence d'homogénéisation (Favaloro et al. 2017).

Pour être exhaustif, un article rapporte l'étude de la stabilité de plasmas conservés en carboglace. L'équipe de Gosselin (Gosselin et al. 2015) a étudié la stabilité de 10 pools de plasmas citratés 3,2% (taux moyen 117%, de 78 à 164%), aliquotés après double centrifugation en microtube à bouchon à clipser ou à visser, conservés à -70°C ou dans de la carboglace pendant au moins 16h puis décongelés 5 minutes à 37°C bouchés ou débouchés. Des différences statistiquement significatives ont été observées entre les différents modes de congélation et décongélation et les différents tubes mais aucune différence n'était cliniquement significative.

En conclusion, le FXII semble stable jusqu'à 18 mois sur plasma conservé à -20°C et au moins 24 mois sur plasma conservé à -70°C mais ces données sont à interpréter avec précaution (une seule étude, sur 6 sujets sains).

Tableau XXII : Résumé des études de stabilité du facteur XII sur plasma congelé

| Références | T°C conservation | Population Tube | Pré-analytique Méthode de dosage | Stabilité (analyse) |
|------------------------|------------------|--|---|--|
| (Woodhams et al. 2001) | -20°C | N=6 sujets sains Plasmaphérese sur citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C CK-Prest (Stago) | 6 mois (variation < 5%) 18 mois (variation < 10%) |
| (Favaloro et al. 2017) | -20°C | N=48 patients consécutifs | 0 puis 2 à 7 jours Conditions pré-analytiques non précisées Comparaison des méthodes d'homogénéisation après décongélation 5 min à 37°C au bain-marie : inversion, roue tourne-tube, vortex ou pas de mélange | Pas de différence après 2 à 7 jours si homogénéisation (inversion, vortex ou roue tourne-tube) Tendance à la diminution des taux en l'absence de mélange (test de Wilcoxon) |
| (Woodhams et al. 2001) | -70 °C | N=6 sujets sains Plasmaphérese sur Citrate 3,8% | 2 sem, tous les mois jusqu'à 24 mois Centrifugation 1500g 30min TA, Décongélation 15min à +37°C CK-Prest (Stago) | 24 mois (variation < 5%) 24 mois (variation < 10%) |
| (Favaloro et al. 2017) | -80°C | N=48 patients consécutifs | 0 puis 2 à 7 jours Conditions pré-analytiques non précisées Comparaison des méthodes d'homogénéisation après décongélation 5 min à 37°C au bain-marie : inversion, roue tourne-tube, vortex ou pas de mélange | Pas de différence après 2 à 7 jours si homogénéisation (inversion, vortex ou roue tourne-tube) Tendance à la diminution des taux en l'absence de mélange (test de Wilcoxon) |

Synthèse :

| Paramètre | SANG TOTAL et PLASMA FRAIS | | | |
|--------------------|-----------------------------------|---|---------------------|---|
| | Recommandé | Acceptable | Non conforme | Pas de données ou données insuffisantes |
| Facteur XII | | Sang total : - au moins 4h à T°C ambiante ou réfrigérée | | Sang total : - au-delà de 4h T°C ambiante ou réfrigérée |
| | | Plasma : - au moins 8h à T°C ambiante | | Plasma: - au-delà de 8h à T°C ambiante - conservation à T°C réfrigérée |

| <u>Paramètre</u> | <u>PLASMA DECANTE et CONGELE</u> | | | |
|--------------------|----------------------------------|---|---------------------|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Facteur XII</u> | | - Jusqu'à 18 mois à T°C ≤ -20°C - Au moins 24 mois à T°C ≤ -70°C | | - Données insuffisantes au-delà de 24 mois à T°C ≤ -70°C |

10. Facteur XIII (antigène et activité)

Les dosages de l'activité du facteur XIII (FXIII) font principalement appel à deux types de méthodologies :

- l'évaluation de la fonctionnalité du FXIII directement par la dissolution d'un caillot (test à l'urée, test à l'acide acétique ou monochloroacétique...). Ces techniques ne détectent que le déficit sévère et manquent de standardisation. Elles ne sont pas recommandées par le sous-comité de l'ISTH (Kohler et al. 2011). Les mesures de l'activité du FXIII passent le plus souvent par l'évaluation de l'activité transglutaminase (ou isopeptidase) du FXIII à l'aide d'incorporation d'amine marquée ou de libération d'ammoniaque.
- l'évaluation antigénique du facteur XIII, associe une détection antigène/anticorps et la reconnaissance des sous-unités A et/ou B.

Dans ce paragraphe, les données bibliographiques étant limitées, les propositions concernant la stabilité s'entendent pour les mesures antigéniques comme fonctionnelles.

Les données de stabilité issues des trousse fournisseurs sont présentées dans le tableau ci-dessous (tableau XXIII).

Tableau XXIII : Résumé des données de stabilité des trousseaux fournisseurs

| Recommandations fabricants pour la stabilité du FXIII dans les échantillons | | | | |
|---|--|---|--|------------------|
| | Echantillons «frais » | | Plasmas congelés | |
| | +15 à +25°C | +2 à +8°C | Au moins - 20° | Au moins - 70 °C |
| <i>FXIII activité</i> <i>Siemens</i> Berichrom FXIII® | 8 heures (plasma centrifugé le plus rapidement possible après le prélèvement) | 24 heures (plasma centrifugé le plus rapidement possible après le prélèvement) | 2 mois | Pas de données |
| <i>FXIII activité</i> <i>Technochrom</i> Technochrom FXIII® | 24 heures (plasma) | 3 jours (plasma) | 6 mois | 6 mois |
| <i>FXIII antigène</i> <i>Stago</i> K-Assay Factor XIII® | Dosage sur plasma dans les 24 heures, sans précision de température de conservation | | Possibilité de conservation des plasmas congelés, sans précision de délai ou de température de conservation | |
| <i>FXIII antigène</i> <i>Werfen</i> Factor XIII Antigen® | Se référer aux données du CLSI | | | |
| <i>FXIII activité</i> <i>semi</i> <i>quantitative</i> <i>Stago</i> Facteur XIII® (semi quantitatif, test à l'acide chloroactique) | 4 heures (plasma) | Pas de données | 1 mois | Pas de données |

a. Stabilité en sang total

Le CLSI recommande, comme pour la majorité des paramètres que le dosage du FXIII, sans préciser de technique, soit effectué dans les 4 heures après le prélèvement sur des échantillons transportés et conservés à TA (Adcock et al. 2008). Les données de conservation du sang total à température réfrigérée sont inconnues (Adcock et al. 2008).

b. Stabilité en plasma frais

La conservation à TA du plasma frais et la centrifugation du sang total pour l'obtention du plasma doit se faire dans les 4 h suivant le prélèvement selon le CLSI (Adcock et al. 2008).

Guder et coll. recommandent pour la société allemande de « Clinical Chemistry and Laboratory Medicine », la réalisation du dosage du facteur XIII dans les 4 heures qui suivent le prélèvement sur tube citraté conservé à TA, sans préciser s'il s'agit d'un dosage de l'activité transglutaminase ou d'un dosage antigénique (Guder et al. 2010).

Dorgalaleh et coll. dans une revue sur le FXIII, notent une diminution des taux de FXIII pour une conservation au-delà de 3 jours à TA (Dorgalaleh et al. 2016). Cet article fait référence aux recommandations anglaises (Mackie et al. 2013) qui ne détaillent pas plus la méthodologie ou les résultats ayant permis de proposer cette recommandations de conservation.

c. Stabilité en plasma congelé

Guder et coll. recommandent pour la société allemande « Clinical Chemistry and Laboratory Medicine », une stabilité d'un mois à -20°C, et aucune proposition pour la température de -80°C, sans préciser s'il s'agit d'un dosage de l'activité transglutaminase ou d'un dosage antigénique (Guder et al. 2010).

Dorgalaleh et coll., dans une revue sur le FXIII, préconisent une conservation du plasma congelé à au moins -20°C jusqu'à 3 mois (10 à 12 semaines), et au moins -70 °C jusqu'à 18 mois (Dorgalaleh et al. 2016). Cependant dans cet article, les données ayant permis d'établir ces propositions ne sont pas présentées. La décongélation des échantillons doit se faire à 37°C sur une durée de 3 à 5 minutes, une température inférieure à 37°C étant responsable de la formation de cryoprécipités (Dorgalaleh et al. 2016).

En conclusion, pour le dosage du FXIII, en l'absence de bibliographie solide, le GFHT ne recommande pas de délais de conservation du sang total, du plasma frais ou congelé. Le GFHT suggère une conservation du sang total d'au moins 4h et du plasma frais d'au moins 8 heures à TA et à température réfrigérée. Le GFHT suggère une conservation d'au moins 2 mois à au moins -20°C et -70°C, les données sont insuffisantes au-delà.

Synthèse :

| <u>Paramètre</u> | <u>SANG TOTAL et PLASMA FRAIS</u> | | | |
|---------------------|-----------------------------------|---|---------------------|---|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Facteur XIII</u> | | Sang total : - au moins 4h à T°C ambiante | | Sang total : - au-delà de 4h T°C ambiante ou conservation à T° réfrigérée |
| | | Plasma : - au moins 8h à T°C ambiante ou réfrigérée | | Plasma: - au-delà de 8h à T°C ambiante ou réfrigérée |

| <u>Paramètre</u> | <u>PLASMA DECANTE et CONGELE</u> | | | |
|---------------------|----------------------------------|--|---------------------|--|
| | <u>Recommandé</u> | <u>Acceptable</u> | <u>Non conforme</u> | <u>Pas de données ou données insuffisantes</u> |
| <u>Facteur XIII</u> | | - Au moins 2 mois à T°C ≤ -20°C ou T°C ≤ -70°C | | - Données insuffisantes au-delà de 2 mois à T°C ≤ -20°C ou T°C ≤ -70°C |

11. Références

- Adcock DM, Hoefner DM, Kottke-Marchand K, Marlar RA, Szamosi DI, Warunek DJ. 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(5).
- Adcock Funk D, Lippi G, Favalaro E. Quality Standards for Sample Processing, Transportation, and Storage in Hemostasis Testing. *Semin Thromb Hemost.* 2012 Sep;38(06):576–85.
- Arrêté du 15 décembre. 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>
- Betsou F, Roussel B, Guillaume N, Lefrère J-J. Long-term stability of coagulation variables: Protein S as a biomarker for preanalytical storage-related variations in human plasma. *Thromb Haemost.* 2009 Jun;101(6):1172–5.
- Cardigan R, Green L. Thawed and liquid plasma--what do we know? *Vox Sang.* 2015 Jul;109(1):1–10.
- Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini MS, Farshi Y, Roshanzamir F, Naderi M, et al. Diagnosis of factor XIII deficiency. *Hematol Amst Neth.* 2016 Aug;21(7):430–9.
- Favaloro EJ, Oliver S, Mohammed S, Ahuja M, Grzechnik E, Azimulla S, et al. Potential misdiagnosis of von Willebrand disease and haemophilia caused by ineffective mixing of thawed plasma. *Haemophilia.* 2017 Sep;23(5):e436–43.
- 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 Nov;122(5):686–92.
- 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 Jan 27;4:3868.
- Flanders MM, Crist R, Rodgers GM. Comparison of five thrombin time reagents. *Clin Chem.* 2003 Jan;49(1):169–72.
- Foshat M, Bates S, Russo W, Huerta A, Albright K, Giddings K, et al. Effect of freezing plasma at -20°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 Off J Int Acad Clin Appl Thromb.* 2015 Jan;21(1):41–7.
- Freyburger G, Andras M, Sanchez G, Hall CM, Rosén S. Response to activated protein C upon storage of whole blood and plasma. *Thromb Res.* 1999 Jan 15;93(2):89–95.
- Froom P, Barak M. Lupus anticoagulant testing: analyzing fresh samples after a single centrifugation and after a 6-8 h delay. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Oct 31;50(2):367–70.
- 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 Jan;26(1):69–74.

- Gosselin RC, Honeychurch K, Kang HJ, Dwyre DM. Effects of storage and thawing conditions on coagulation testing. *Int J Lab Hematol*. 2015 Aug;37(4):551–9.
- Guder WG, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, 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.
- Heil W, Grunewald R, Amend M, Heins M. Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma. *Clin Chem Lab Med*. 1998 Jun;36(7):459–62.
- Kim YA, Lewandrowski KB, Lucien F-A, Van Cott EM. The effects of transport temperature and time on routine and specialized coagulation assays: Blood Coagul Fibrinolysis. 2018 Jan;1.
- Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens R a. S, Muszbek L, Factor XIII And Fibrinogen SSC Subcommittee Of The ISTH. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost JTH*. 2011 Jul;9(7):1404–6.
- Ledford-Kraemer M, Moore GW, Bottenus R, Brandt JT, Castellone DD, Daniele C, et al. CLSI Document H60-A: Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant. *Clin Lab Stand Inst [Internet]*. 2014 Apr 4 [cited 2019 Nov 20]; Available from: <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h60/>
- Lessire S, Douxfils J, Baudar J, Bailly N, Dincq A-S, Gourdin M, et al. Is Thrombin Time useful for the assessment of dabigatran concentrations? An in vitro and ex vivo study. *Thromb Res*. 2015 Sep;136(3):693–6.
- Lewis M, Callas P, Jenny N, Tracy R. Longitudinal Stability of Coagulation, Fibrinolysis, and Inflammation Factors in Stored Plasma Samples. *Thromb Haemost*. 2001;86(12):1495–500.
- Linskens EA, Devreese KMJ. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hematol*. 2018 Jun;40(3):292–303.
- 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 Sep 15;87(6):577–81.
- Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M, et al. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol*. 2013 Feb;35(1):1–13.
- Murphy B, Swarts S, Mueller B, van den Geer P, Manning M, Fitchmun M. Protein instability following transport or storage on dry ice. *Nat Methods*. 2013;10(4):278–9.
- Odsæter IH, Lian IA, Bratberg K, Mikkelsen G. Dry ice exposure of plasma samples influences pH and lupus anticoagulant analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Apr;53(5):809–13.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost*. 2009 Oct;7(10):1737–40.
- Plumhoff E, Fisher P, Bowie E, Nichols WL. Reversible prothrombin time prolongation after plasma storage on dry ice. *Thromb Haemost*. 1992;68(2):232.

- Trondsetås L, Mikkelsen G, Lian IA. The effects of dry ice exposure on plasma pH and coagulation analyses. *Clin Chem Lab Med*. 2017 Nov 27;56(1):59–64.
- Vaubourdolle M, Alvarez J-C, Barbé F, Beaudeau J-L, Boissier E, Caillon H, et al. Critical care testing: SFBC recommendations in 2018. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2018 Jan 1;76(1):23–44.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco M-J, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma: *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001 Jun;12(4):229–36.
- Zander J, Bruegel M, Kleinhempel A, Becker S, Petros S, Kortz L, et al. Effect of biobanking conditions on short-term stability of biomarkers in human serum and plasma. *Clin Chem Lab Med*. 2014 May;52(5):629–39.
- Zhao Y, Feng G, Zhang J, Gong R, Cai C, Feng L. Effects of preanalytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and IX activity. *Sci Rep*. 2017 Sep 22;7(1):12179.
- 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 Oct;35(5):566–70.
- Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood transported at ambient temperature. *Thromb Haemost*. 2008 Feb;99(2):416–26.