Stabilité pré-analytique des paramètres de la coagulation : revue des données disponibles

Stability of coagulation parameters: review of available data

Laetitia Mauge^{1,2}

Martine Alhenc-Gelas¹

¹ Service d'hématologie biologique, Hôpital européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France

² Inserm U970 PARCC Équipe 10, Université Paris Descartes, Paris, France
<laetitia.mauge@egp.aphp.fr>

Résumé. La maîtrise de la phase pré-analytique est indispensable pour assurer la qualité des examens biologiques. Certains facteurs de la coagulation sont labiles. Il est donc particulièrement important de fixer des conditions de traitement et de conservation des échantillons sanguins au laboratoire en fonction des connaissances disponibles à ce sujet. Nous présentons la revue de la littérature, des recommandations des sociétés savantes et de données fournisseurs, que nous avons effectuée pour nous aider à prendre, au laboratoire d'hémostase, des décisions documentées sur les conditions optimales de conservation des échantillons sanguins à adopter selon l'analyse à réaliser.

Mots clés : phase pré-analytique, stabilité, hémostase, facteur de la coagulation, conservation

Abstract. Samples for hemostasis testing are vulnerable to the effects of preanalytical variables and quality standards for sample processing and storage must be defined to insure accurate results. This article presents the available information on these preanalytical issues.

Key words: preanalytical phase, stability, hemostasis, coagulation factor, storage

Article reçu le 17 décembre 2013, accepté le 07 janvier 2014

La prise en charge d'un échantillon biologique comporte trois phases : les phases pré-, per- et post-analytiques. La phase pré-analytique comprend la réalisation du prélèvement, l'acheminement, le prétraitement et la conservation des échantillons avant analyse. La maîtrise de cette phase est indispensable pour assurer la qualité des analyses. La norme ISO 15189 demande que les conditions d'acheminement des prélèvements soient spécifiées dans le manuel de prélèvement, et que des critères d'acceptation des échantillons biologiques soient fixés, notamment en termes de délai avant analyse et de conditions de conservation des échantillons. La phase pré-analytique est tout particulièrement importante en hémostase. En effet, on étudie l'activité de protéines dont certaines ne sont pas stables. D'autre part, l'activation de la coagulation doit impérativement être évitée (pas de conservation des échantillons entre 2 et 8 °C). La plupart des examens standards d'hémostase sont effectués sur plasma citraté (0,105 M-0,109 M) ou sur

plasma prélevé sur un mélange CTAD (citrate, théophylline, adénosine, dipyridamole), natif ou conservé congelé. Nous nous sommes intéressés aux problèmes de stabilité des facteurs dans le sang total, dans le plasma natif (maintenu à température ambiante) et à l'influence de la congélation. Des recommandations sur les conditions de préparation des plasmas ont été fixées par les sociétés savantes (GEHT- Groupe d'étude sur l'hémostase et la thrombose, CLSI- *Clinical and laboratory standards institute*) [1, 2]. L'objectif de ce travail était de rassembler et comparer le maximum de données disponibles sur la stabilité des paramètres d'hémostase afin de déterminer les conditions optimales de traitement des échantillons en fonction de l'analyse à réaliser. La recherche des références bibliographiques a été effectuée sur Medline en utilisant les mots clés « coagulation factor, stability, testing », jusqu'à septembre 2013 sans limite d'antériorité. Les résultats de cette recherche et les recommandations des sociétés savantes (GEHT, CLSI) sont rapportés dans les *tableaux 1 à 4*. Les indications fournies par les fabricants des réactifs ont été indiquées lorsque les données de la littérature étaient insuffisantes.

Tirés à part : L. Mauge

Tableau 1. Stabilité des tests de coagulation globale et des D-dimères.

Paramètre	Type d'échantillon	Stabilité sur sang total à TA		Type d'échantillon	Stabilité sur plasma citraté à TA		Température de stockage	Stabilité sur plasma citraté congelé	
		CLSI H25-A5 [2]	Autres références		CLSI H25-A5 [2]	Autres références		CLSI H25-A5 [2]	Autres références
TP	Sang total citraté 0,109 mM	24 h	Au moins 24 h [3] Au moins 48 h [5]	Plasma citraté et CTAD/non décanté/rebouché	24 h	Au moins 24 h [5, 9, 10] 8 h (Stago)	< - 20 °C	2 semaines	16 mois [12]
							< - 70 °C	12 mois	Au moins 24 mois [12]
TCA	Sang total citraté 0,109 mM	4 h	Au moins 6 h [6] Au moins 8 h [5] Au moins 24 h [3]	Plasma citraté et CTAD/non décanté/rebouché	4 h	Au moins 6 h [9] Au moins 8 h [5, 10]	< - 20 °C	2 semaines	12 mois [12]
							< - 70 °C	6 à 12 mois	Au moins 24 mois [12]
TT	Sang total citraté	4 h		Plasma citraté rebouché 0,109 M	4 h	Au moins 24 h [10, 11]	< - 20 °C	Au moins 10 mois [12]	
							< - 70 °C	Au moins 24 mois [12]	
DD	Sang total citraté 0,109 mM	4 h	Au moins 24 h [3, 6]	Plasma citraté rebouché 0,109 M	4 h	Au moins 24 h [10, 11]	< - 20 °C	Au moins 24 mois [12]	
							< - 70 °C	Au moins 24 mois [12]	

Stabilité des paramètres dans le sang total conservé à température ambiante

La stabilité des paramètres en sang total conditionne les délais optimaux et tolérables d'acheminement des échantillons au laboratoire. Des délais courts sont une limite à la prise en charge des prélèvements provenant de sites extérieurs, voire de prélèvements sur site.

Dans les recommandations du CLSI, les délais maximaux de conservation en sang total à température ambiante sont de 4 h pour de nombreux tests, mesure du taux de prothrombine (TP) exceptée (*tableaux 1 à 3*) [2]. Plusieurs études démontrent une stabilité plus longue que celle indiquée par le CLSI pour de nombreux paramètres : fibrinogène, facteurs extrinsèques et intrinsèques, facteur Willebrand (VWF) inhibiteurs de la coagulation et D-dimères (DD) [3, 4]. Concernant le temps de céphaline plus activateur (TCA), les études de Adcock *et al.* [5] Salvagno *et al.* [6], et Zurcher *et al.* [3] démontrent la stabilité du paramètre pendant 6 à 8 h de conservation mais ne permettent pas de conclure pour un délai de 24 h. Concernant la surveillance des traitements par héparines, l'héparine non fractionnée (HNF) est peu stable dans le sang total car les plaquettes sont susceptibles de relarguer du facteur 4 qui entraîne la neutralisation des chaînes à activité antithrombine qu'elle contient [5]. Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) qui comportent plus de chaînes à activité anti-Xa que de chaînes à activité antithrombine sont moins neutralisées que l'HNF. Ce phénomène explique la stabilité de l'HNF limitée à 2 h en sang total citraté observée par Kitchen *et al.* [7] et la meilleure stabilité des HBPM [8]. Lorsque des tubes citratés

sont utilisés, il est donc impératif de réaliser la centrifugation dans ce délai maximal de 2 h. L'utilisation du CTAD améliore très significativement la stabilité de l'HNF dans le sang total, avec un délai maximal de 6 h entre le prélèvement et la réalisation de l'analyse [7]. Cela permet de limiter le risque important de sous-estimation des héparinémies lié au dépassement du délai, qui concerne de nombreux établissements hospitaliers et les laboratoires exécutants prenant en charge les échantillons de laboratoires correspondants extérieurs.

Stabilité des paramètres en plasma citraté conservé à température ambiante

La stabilité des paramètres en plasma citraté conservé à température ambiante conditionne le délai de réalisation de l'analyse après centrifugation du sang total, ainsi que la possibilité de vérification ou de rajout d'analyse complémentaire. Dans les recommandations du CLSI, les délais de conservation du plasma à température ambiante sont limités à 4 h après le prélèvement pour de nombreux paramètres de la coagulation, sauf le TP. Quelques études rapportent une stabilité supérieure à 4 h pour le TCA, le temps de thrombine (TT), les DD, le fibrinogène, les facteurs extrinsèques et l'antithrombine (*tableaux 1 à 3*) [5, 9-11]. Aucune information n'est disponible dans la littérature pour les facteurs intrinsèques et les protéines C et S. Nous avons donc indiqué pour ces paramètres les stabilités indiquées par les fournisseurs de réactifs. D'après Adcock *et al.*, en plasma citraté,

Tableau 2. Stabilité des facteurs de la coagulation.

Paramètre	Type d'échantillon	Stabilité sur sang total à TA		Type d'échantillon	Stabilité sur plasma citraté à TA		Température de stockage	Stabilité sur plasma citraté congelé	
		CLSI H25-A5 [2]	Autres références		CLSI H25-A5 [2]	Autres références		CLSI H25-A5 [2]	Autres références
Fibrinogène	Sang total citraté 0,109 mM	24 h	Au moins 24 h [6] Au moins 48 h [3]	Plasma citraté rebouché 0,109 M	4 h	Au moins 24 h [9-11]	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 24 mois [12] Au moins 24 mois [12]	
FII	Sang total citraté	4 h	Au moins 24 h [4] Au moins 48 h [3]	Plasma citraté et CTAD/non décanté/rebouché	4 h	Au moins 24 h [9] 3 h Siemens 4 h Stago	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 12 mois [12] Au moins 24 mois [12]	
FV	Sang total citraté	4 h	Au moins 8 h [3]	Plasma CTAD non décanté	4 h	Au moins 24 h [9] 3 h (Siemens) 4 h (Stago)	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 24 mois [12] Au moins 24 mois [12]	
FVII	Sang total citraté	4 h	Au moins 24 h [3, 4]	Plasma citraté	4 h	3 h (Siemens) 4 h (Stago)	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 6 mois [12] Au moins 24 mois [12]	
FX	Sang total citraté	4 h	Au moins 24 h [4] Au moins 48 h [3]	Plasma CTAD non décanté	4 h	Au moins 24 h [9] 3 h (Siemens) 4 h (Stago)	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 4 mois [12] Au moins 24 mois [12]	
FVIII	Sang total citraté	4 h	Au moins 4 h [3]	Plasma citraté	4 h	8 h (Siemens)	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 6 mois [12] Au moins 18 mois [12]	
FIX	Sang total citraté	4 h	Au moins 24 h [4] Au moins 48 h [3]	Plasma citraté	4 h	8 h (Siemens)	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 8 mois [12] Au moins 24 mois [12]	
FXI	Sang total citraté	4 h	Au moins 48 h [3]	Plasma citraté	4 h	8 h (Siemens)	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 6 mois [12] Au moins 18 mois [12]	
FXII	Sang total citraté	4 h		Plasma citraté	4 h	8 h (Siemens)	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 18 mois [12] Au moins 24 mois [12]	
VWF : Ag et Rco	Sang total citraté	4 h	Au moins 48 h [3]	Plasma citraté	4 h	6 h	< - 20 °C < - 70 °C	Au moins 24 mois [12] (VWF : Ag) Au moins 24 mois [12] (VWF : Ag)	

l'activité de l'HNF évaluée d'après le TCA est inchangée pendant les 6 h qui suivent le prélèvement, centrifugé immédiatement sans décantation [5] ; ces données demandent à être confirmées dans d'autres études compte tenu du fait que, dans ces conditions, les plaquettes restent en contact avec le plasma et sont susceptibles de libérer le facteur 4 qu'elles contiennent. Pour les HBPM, aucune variation de l'activité anti-Xa n'est observée après 24 h de conservation [8] (tableau 4).

Influence de la congélation sur la stabilité des paramètres

La stabilité des paramètres sur plasma congelé conditionne le délai de réalisation des analyses non urgentes faites en série (étude des inhibiteurs de la coagulation, par exemple). Les recommandations du CLSI sont basées sur un travail réalisé par Woodhams *et al.*, qui ont testé deux températures de conservation : - 20 °C et - 70 °C [12]. Les délais

Tableau 3. Stabilité des inhibiteurs de la coagulation.

Paramètre	Type d'échantillon	Stabilité sur sang total à TA		Type d'échantillon	Stabilité sur plasma citraté à TA		Température de stockage	Stabilité sur plasma citraté congelé	
		CLSI H25-A5 [2]	Autres références		CLSI H25-A5 [2]	Autres références		CLSI H25-A5 [2]	Autres références
Antithrombine	Sang total citraté	4 h	Au moins 48 h [3]	Plasma CTAD non décanté	4 h	Au moins 24 h [9, 11] 8 h (Stago)	< - 20 °C	Au moins 24 mois [12] 1 mois (Stago)	
							< - 70 °C	Au moins 24 mois [12]	
Protéine C	Sang total citraté	4 h	Au moins 48 h (Ag et Act) [3]	Plasma citraté	4 h	8 h (Act) (Stago) 6 h (Ag) (Biomérieux)	< - 20 °C	Au moins 24 mois (PC act) [12] 1 mois (Stago et Biomérieux)	
							< - 70 °C	Au moins 24 mois (PC act) [12]	
Protéines S	Sang total citraté	4 h	Au moins 8 h (PS Ag) [3]	Plasma citraté	4 h	4 h (PS libre) (Stago) 8 h (PS totale) (Stago)	< - 20 °C	Au moins 12 mois (PS act) [12] 1 mois (PS totale et libre) (Stago)	
		4 h	Au moins 48 h (PS libre) [3]				< - 70 °C	Au moins 18 mois [12]	

Tableau 4. Stabilité pour la surveillance des traitements anticoagulants.

Paramètre	Type d'échantillon	Stabilité sur sang total à TA		Type d'échantillon	Stabilité sur plasma citraté à TA		Température de stockage	Stabilité sur plasma citraté congelé	
		CLSI H25-A5 [2]	Autres références		CLSI H25-A5 [2]	Autres références		CLSI H25-A5 [2]	Autres références
TP-INR	Sang total citraté 0,109 mM	24 h	Au moins 24 h [6] Au moins 48 h [4]						
HNF	Sang total citraté	1 h	2 h [7]	Plasma citraté	4 h	Au moins 6 h [5]			
	Sang total CTAD	4 h	6 h [7]						
HBPM	Sang total citraté	1 h	Au moins 4-6 h [8]	Plasma citraté décanté, rebouché	4 h	Au moins 24 h [8]	< - 20 °C		Au moins 24 h [8]

indiqués sont compatibles avec les exigences des laboratoires en termes de délai de rendu de résultats. Les données de la littérature sont pauvres ; nous n'avons trouvé qu'une seule autre étude qui s'intéresse uniquement aux D-dimères et au FVII et qui montre une stabilité de 9 ans de ces paramètres pour des échantillons de plasma citraté conservés à - 80 °C [13].

Conclusion

La littérature apparaît relativement pauvre et les quelques études dont nous avons rapporté les résultats manquent d'homogénéité tout à la fois dans leur conception et dans

les modalités d'analyse des résultats. Les conclusions apparaissent cependant assez concordantes et permettent de progresser dans les connaissances concernant la stabilité de certains paramètres de l'hémostase. Certaines études publiées récemment permettent de remettre en cause les recommandations du CLSI éditées en 2008. Des études complémentaires bien conduites restent nécessaires, en particulier pour les paramètres pour lesquels l'incertitude subsiste par manque de données, ou parce que les résultats des études réalisées ne permettent pas de conclure.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Polack B, Schved JF, Boneu B. Preanalytical recommendations of the 'Groupe d'Étude sur l'Hémostase et la Thrombose' (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. *Haemostasis* 2001 ; 31 : 61-8.
2. Clinical and laboratory standards institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays ; approved guideline. 5^e édition. CLSI Document H21-A5. ed. Wayne : PCaLSI, 2008.
3. Zurcher 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 ; 99 : 416-26.
4. Christensen TD, Jensen C, Larsen TB, Maegaard M, Christiansen K, Sorensen B. International normalized ratio (INR), coagulation factor activities and calibrated automated thrombine generation - influence of 24h storage at ambient temperature. *Int Jnl Lab Hem* 2010 ; 32 : 206-14.
5. Adcock D, Kressin D, Marlar RA. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998 ; 9 : 463-70.
6. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2009 ; 31 : 462-7.
7. Kitchen S, Preston FE. Standardization and control of heparin testing. In : Rowan RM, van Assendelft OW, Preston FE, eds. *Advanced laboratory methods in haematology*. New York : Hodder Arnold Publication, 2002 : 293-315.
8. Birri N, Baumgartner D, Tiziana C, Huynh A, Weller K, PAVICIC M, et al. Stability of low molecular weight heparin anti-factor Xa activity in citrated whole blood and plasma. *Br J Haematol* 2011 ; 155 : 629-31.
9. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem* 2012 ; 45 : 464-9.
10. 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 Jnl Lab Hem* 2013 ; 35 : 566-70.
11. Heil W, Grunewald R, Amend M, Heins M. Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma. *Clin Chem Lab Med* 1998 ; 36 : 459-62.
12. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001 ; 12 : 229-36.
13. Betsou F, Roussel B, Guillaume N, Lefrere J. Long-term stability of coagulation variables : protein S as a biomarker for preanalytical storage-related variations in human plasma. *Thromb Haemost* 2009 ; 101 : 1172-5.