



**Pré-analytique en hémostase :
Propositions concernant la surveillance biologique
d'un traitement par héparine non fractionnée (HNF)
ou par héparine de bas poids moléculaire (HBPM)**

Actualisation Juin 2022

Rédaction : Elodie Boissier et Céline Desconclois

Relecture : Céline Delassasseigne Claire Flaujac et Marie-Françoise Hurtaud

Vérification et Approbation : Emmanuel Demaistre, Claire Espanel Jean-Marc Giannoli, Isabelle Gouin-Thibault, Inès Harzallah, Emmanuelle Jeanpierre, Amélie Launois, Véronique Le Cam-Duchez, Lena Le Flem, Frédéric Loridaon, Laetitia Mauge, Pauline Noyel, Pierre Toulon, Antoine Tournoy

Table des matières

Abréviations	3
1. Introduction.....	4
2. Temps de céphaline avec activateur (TCA) avec héparine non fractionnée (HNF).....	4
a. Stabilité du TCA avec HNF en sang total citraté	4
b. Stabilité du TCA avec HNF en sang total CTAD.....	6
c. Stabilité du TCA avec HNF en plasma citraté	8
d. Stabilité du TCA avec HNF en plasma CTAD	10
e. Stabilité du TCA avec HNF en plasma citraté et CTAD conservé en aliquote congelé	10
3. Activité anti-Xa héparine non fractionnée (HNF).....	11
a. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en sang total citraté.....	11
b. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en sang total CTAD	13
c. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en plasma citraté.....	15
d. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en plasma CTAD.....	15
e. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en plasma conservé en aliquote congelé	16
4. Activité anti-Xa héparine de bas poids moléculaire (HBPM)	16
a. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en sang total citraté	16
b. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en sang total CTAD	16
c. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en plasma citraté.....	16
d. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en plasma CTAD	17
e. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en plasma conservé en aliquote congelé	17
5. Références.....	18

Abréviations

BCSH	British Committee for Standards in Haematology
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAD	Citrate Théophylline Adénosine Dipyridamole
DGKL	Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriummedizin
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GFHT	Groupe Français d'études sur l'Hémostase et la Thrombose
ICSH	International Council for Standardization in Haematology
HBPM	Héparine de bas poids moléculaire
HNF	Héparine non fractionnée
PF4	Facteur 4 plaquettaire
TA	Température ambiante
TCA	Temps de céphaline avec activateur

1. Introduction

L'étape pré-analytique de la surveillance biologique d'un traitement par héparine non fractionnée (HNF) ou par héparine de bas poids moléculaire (HBPM) est particulièrement délicate en raison d'une possible neutralisation par le facteur 4 plaquettaire (PF4) libéré par les granules alpha des plaquettes activées, pouvant induire une sous-estimation de l'activité anticoagulante. Ce phénomène intervient dès l'étape de prélèvement (Ray 2008).

Le mélange Citrate/Théophylline/Adénosine/Dipyridamole (CTAD) est utilisé comme anticoagulant alternatif au citrate de sodium dans les tubes de prélèvements car il contient en plus du citrate des inhibiteurs de l'activation plaquettaire, permettant de minimiser la libération de PF4 qui neutralise l'activité de l'HNF en s'y liant (Contant et al. 1983; van den Besselaar et al. 1987). Le dipyridamole étant sensible à la lumière, il est préconisé de conserver les tubes CTAD à l'obscurité. Cependant, même après 41 jours d'exposition à la lumière, les tubes CTAD permettent une moindre diminution du TCA réalisé dans le cadre d'une surveillance d'un traitement par HNF par rapport à des tubes contenant uniquement du citrate (tubes citratés) (van den Besselaar 2010).

La surveillance biologique permettant l'adaptation des doses d'HNF peut se faire par la mesure de l'activité anti-Xa et/ou celle du TCA. Cependant la mesure de l'activité anti-Xa plasmatique par méthode chromogénique est à privilégier. Cette technique présente l'avantage d'une moindre variabilité que le TCA, que ce soit entre réactifs ou en fonction des variations des protéines plasmatiques ou de la coagulation pouvant interférer (Garcia et al. 2012; Gouin-Thibault et al. 2012). Elle est à l'heure actuelle disponible dans la plupart des laboratoires.

Depuis les recommandations pré-analytiques GFHT de 2017 sur la surveillance biologique de l'HNF et HBPM, deux nouvelles études originales ont été publiées (Billoir et al. 2019; Toulon et al. 2020).

2. Temps de céphaline avec activateur (TCA) avec héparine non fractionnée (HNF)

a. Stabilité du TCA avec HNF en sang total citraté

Le Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) préconise une centrifugation de l'échantillon prélevé sur tube citraté dans l'heure qui suit le prélèvement et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures (Adcock et al. 2008). De manière identique, le British Committee for Standards in Haematology (BCSH) préconise une centrifugation dans les 1 à 2h après le prélèvement, et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures (Kitchen et al. 2014). L'International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommande une centrifugation dans l'heure suivant le prélèvement et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures (Kitchen et al. 2021).

A notre connaissance, 5 études rapportent la stabilité du TCA en sang total citraté pour la surveillance de l'HNF (Tableau 1).

En 1998, une diminution de 25 % du TCA, considérée comme cliniquement significative par les auteurs, est observée dès 2h de conservation à température ambiante (n=3). A 4°C, les TCA sont stables à 4h

(variation 6.2%) (n=8) (Adcock et al. 1998). Les auteurs préconisent d'analyser l'échantillon dans l'heure qui suit le prélèvement si conservation à température ambiante et dans les 4h si conservation à 4°C.

Dans une seconde étude, le TCA est significativement diminué après 100 min (soit 1,6 heures) de conservation à température ambiante (44 échantillons, n=11 patients traités par HNF) (Ray 2008). La différence médiane est de -2,7% (-5,7 ; 1,9%), sans impact clinique selon les auteurs. Il n'y a pas de mesure au-delà de 100 min. Les auteurs concluent que l'échantillon peut être analysé jusqu'à 100 min après le prélèvement.

En 2009, une étude sur 5 échantillons (donneurs sains) surchargés *in vitro* en HNF retrouve un raccourcissement significatif (-23%) du TCA après conservation 5h à température ambiante (van den Besselaar 2010).

Plus récemment en 2019, les TCA moyens de 31 échantillons citratés conservés 4h ou 6h à température ambiante représentent respectivement 107±9% et 112±14% du TCA de référence déterminé 1h après le prélèvement (Billoir et al. 2019). A 4h, 4 patients sont au-delà du biais de 15% : 3 au-dessus (116, 118 et 137 %) et un en dessous (84%). Ces variations sont considérées comme cliniquement non significatives par les auteurs. C'est la seule étude qui a observé un allongement (et non un raccourcissement) du TCA héparine après conservation du sang total plusieurs heures à T° ambiante. L'analyse de la libération du PF4 réalisée sur 14 échantillons par technique ELISA n'a montré aucune différence jusqu'à 6 heures (délai maximal étudié). Les auteurs considèrent qu'un délai de 4h est acceptable.

Enfin, une dernière étude réalisée sur 123 échantillons issus de 56 patients retrouve une diminution statistiquement significative après conservation 4h à T° ambiante : la médiane des TCA passe de 54,5 sec à 46,6 sec, avec un biais moyen de -7,9 sec. Si on considère la cible thérapeutique [ratio 1,5 à 3], 29 échantillons (23,6%) changent de zone, ce qui aurait entraîné une modification de la dose d'anticoagulant chez 10 d'entre eux (Toulon et al. 2020). Les auteurs préconisent d'analyser l'échantillon dans les 1 à 2h qui suivent le prélèvement.

La nature du réactif peut également influencer le résultat du TCA. Ces variations inter-réactifs ont été observées en particulier par l'équipe de Marlar *et al* (Marlar et al. 2017). Le résultat du TCA peut varier en fonction du réactif utilisé et même en fonction du lot de réactif. Toutefois aucune publication ne fait état d'influence du réactif sur la stabilité en sang total de la mesure du TCA chez les patients sous HNF.

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par le TCA, le GFHT recommande que le sang total prélevé sur tube citraté conservé à température ambiante soit centrifugé dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Le délai d'analyse sera précisé au chapitre 2c (stabilité en plasma citraté).

Tableau 1 : Résumé des études de stabilité du TCA pour la surveillance de l'HNF sur sang total citraté

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	Conclusions
Adcock D. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. Blood Coagul Fibrinolysis. 1998	8 patients sous HNF puis 3 patients sous HNF	4°C sur glace 20-22°C	<1h, 4h, 6h, 8h, 24h (n=8) <1h, 1h, 2h, 3h, 4h, 8h, 24h (n=3) Actin FS Siemens	Diminution cliniquement significative dès 2h à T° ambiante (-25%) Conclusion des auteurs : si conservation à T° ambiante, centrifugation et analyse ≤1h si conservation à 4°C, centrifugation et analyse ≤4h
Ray M. Stability of the activated partial thromboplastin time used to monitor unfractionated heparin. J Thromb Haemost. 2008	11 patients sous HNF	T° ambiante	0,5h et 1,6h Platelin LS Biomerieux	Sur citrate, après 1,6h : diminution statistiquement significative de -2,7 % mais sans impact clinique Conclusion des auteurs : ok jusqu'à 1,6h car différence sans impact clinique
van den Besselaar AMHP. Photochemical decomposition of dipyridamole in aqueous solution and the utilization of citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole anticoagulant for monitoring of heparin. International Journal of Laboratory Hematology. 2010	5 (donneurs sains avec HNF ajoutée <i>in vitro</i>)	T° ambiante	0h (surcharge en HNF) 1h 3h 5h Non précisé	Après 5h sur citrate, diminution moyenne de -22,7% (-41,6/-8,6%) vs 0h. Après 5h sur CTAD, diminution moyenne de -6,2% (-20.5/-0.9%) vs 0h. Conclusion des auteurs : délai de 5h non acceptable sur citrate. Privilégier les tubes CTAD
Billoir P. Is citrate theophylline adenosine dipyridamole (CTAD) better than citrate to survey unfractionated heparin treatment? Has delayed centrifugation a real impact on this survey? J Thromb Thrombolysis. 2019	31 patients sous HNF	Conditions usuelles non précisées	1h 2h 3h 4h 5h 6h PTT-Automate Diagnostica Stago	Moyenne TCA 1h = 66,9 +/- 19,7 sec Moyenne TCA 4h = 71,4 +/- 18,9 sec soit 107 +/- 9% Moyenne TCA 6h = 74,1 +/- 19,9 sec soit 112 +/- 14% Biais moyen entre 1h et 4h : -4,0 +/- 5,3 sec soit -6% Biais moyen entre 1h et 6h : -7,2 +/- 7,8 sec soit -11% A 4h, 4 patients au-delà du biais de 15%. Pas de différence sur la concentration en PF4 (n=14) Conclusion des auteurs : ok jusqu'à 4h
Toulon P. Monitoring unfractionated heparin therapy. 4 hour-stability of anti-Xa activity in unspun citrated tubes. Thrombosis Research 2020	56 patients sous HNF	18 à 25°C	<1h et 4h HemosIL SynthASIL IL	Différence statistiquement significative après 4h à T° ambiante : la médiane des TCA passe de 54,5 sec à 46,6 sec (p<0,0001), soit un biais moyen de -7,9 sec, soit -0,25 en ratio (-12,1%) ce qui est supérieur à l'incertitude de mesure de la méthode (7%) et aux limites Ricos (2.3%), mais inférieur au CV maximal recommandé GFHT (90th percentile 14.6%) . Si on considère la cible thérapeutique [ratio 1,5-3], 29 échantillons (23,6%) changent de zone après 4h, dont 10 auraient induit une modification de posologie. Conclusion des auteurs : le délai maximum doit être de 1-2h

b. Stabilité du TCA avec HNF en sang total CTAD

Si l'échantillon ne peut être centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement, en 2008 le CLSI, se référant aux études publiées à l'époque et décrites ci-après (Contant et al. 1983; van den Besselaar et al. 1987) préconise l'utilisation de tubes CTAD, permettant d'allonger le délai de réalisation de l'analyse jusqu'à 4 heures après prélèvement (Adcock et al. 2008).

A notre connaissance, 5 études rapportent la stabilité du TCA en sang total CTAD pour la surveillance de l'HNF, toutes comparent les délais CTAD vs citrate et 2 s'y consacrent exclusivement. (Contant et al. 1983; van den Besselaar et al. 1987). (Tableau 2).

En 1983, l'étude de 40 échantillons de patients traités par HNF comparant des TCA réalisés sur tubes citratés et CTAD montre des TCA significativement plus courts sur citrate que sur CTAD, la différence étant plus marquée sur les échantillons analysés plus de 2h après prélèvement (Contant et al. 1983). Ces résultats sont confirmés par l'étude de van den Besselaar *et al* en 1987, qui constate après conservation à température ambiante du sang total un raccourcissement du TCA plus important sur tube citraté que sur CTAD (van den Besselaar et al. 1987). Ces résultats sont concordants avec ceux de Ray *et al* qui, dès 30 min de conservation, retrouvent des TCA significativement plus courts sur citrate que sur CTAD (n=11 ; différence médiane -9,3 sec) (Ray 2008). La libération de PF4 est significativement réduite dans les prélèvements sur tubes CTAD, dès 30 minutes, ce qui fait suggérer aux auteurs que la majorité du PF4 libéré dans les tubes citratés apparaît dès la ponction veineuse. Après 100 min (1,6h) de conservation du sang total en CTAD, les TCA ne sont pas significativement différents de la valeur de référence déterminée à 30 min (à la différence des valeurs obtenues sur tube citrate). En 2010, van den Besselaar étudie la stabilité de 5 échantillons de sang total surchargés en HNF conservés 5h à température ambiante. Les TCA sont modérément raccourcis (-6%) sur CTAD et significativement raccourcis sur citrate (-23%) (van den Besselaar 2010). Les auteurs de ces 4 études préconisent de privilégier l'emploi de tubes CTAD par rapport au citrate.

En revanche, une étude récente conclut à l'absence de différence entre les TCA réalisés sur tubes citratés (moyenne 57,5 +/-20,8 sec) et ceux réalisés sur tubes CTAD (58,5 +/-21,2 sec) sur 93 échantillons de patients traités par HNF testés selon les conditions usuelles du laboratoire (temps moyen avant centrifugation 119 min soit 2h, temps maximum 251 min soit 4,2h) (Billoir et al. 2019). Cependant, la comparaison statistique n'a pas été réalisée sur l'ensemble des points. Pour le sous-groupe des 42 échantillons centrifugés après 2 heures, le biais moyen (Bland-Altman) entre citrate et CTAD est de -1.2 ± 10.9 sec soit -2%. Les auteurs concluent à l'absence de différence entre tubes citratés et tubes CTAD.

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par le TCA, **le GFHT recommande que le sang total prélevé sur tube CTAD conservé à température ambiante soit centrifugé dans les 2 heures** qui suivent le prélèvement. **Un délai de 5 heures est acceptable** (accord d'experts). Le délai d'analyse sera précisé au chapitre 2d (stabilité en plasma CTAD).

Tableau 2 : Résumé des études de stabilité du TCA pour la surveillance de l'HNF sur sang total CTAD

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	Conclusions
Contant G. Heparin inactivation during blood storage: Its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole -C.T.A.D. mixture-. Thrombosis Research. 1983	40 patients sous HNF	20-25°C	<1h 1-2h >2h Cephalin Kaolin Diagnostica Stago	TCA significativement plus courts sur citrate que sur CTAD, avec une différence plus marquée sur les échantillons analysés au-delà de 2h. Conclusion des auteurs : Privilégier les tubes CTAD
van den Besselaar AM. Monitoring heparin therapy by the activated partial thromboplastin time--the effect of pre-analytical conditions. Thromb Haemost. 1987	Données manquantes	Données manquantes	Données manquantes	Citrate : diminution du TCA de 15 à 29% après conservation à T° ambiante et de 6 à 19% après conservation à 4°C. CTAD même conditions : diminution du TCA de 0 à 11% après conservation à T° ambiante et de 7 à 19% après conservation à 4°C. Conclusion des auteurs : Utiliser des tubes CTAD, à T° ambiante
Ray M. Stability of the activated partial thromboplastin time used to monitor unfractionated heparin. J Thromb Haemost. 2008	11 patients sous HNF	T° ambiante	0,5h et 1,6h Platelin LS Biomérieux	Sur CTAD, après 1,6h, pas de différence. A 0,5h, TCA sur citrate significativement plus faible que sur CTAD : différence médiane -9,3 sec. <i>Idem</i> à 100 min. Conclusion des auteurs : Stabilité sur CTAD ok jusqu'à 1,6h Utiliser des CTAD
van den Besselaar AMHP. Photochemical decomposition of dipyridamole in aqueous solution and the utilization of citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole anticoagulant for monitoring of heparin. International Journal of Laboratory Hematology. 2010	5 (donneurs sains avec HNF ajoutée <i>in vitro</i>)	T° ambiante	0h (surcharge en HNF) 1h 3h 5h Non précisé	Après 5h sur citrate, diminution moyenne de -22,7% (-41,6/-8,6%) vs 0h. Après 5h sur CTAD, diminution moyenne de -6,2% (-20,5/-0,9%) vs 0h. Conclusion des auteurs : Stabilité sur CTAD ok jusqu'à 5h Privilégier les tubes CTAD
Billoir P. Is citrate theophylline adenosine dipyridamole (CTAD) better than citrate to survey unfractionated heparin treatment? Has delayed centrifugation a real impact on this survey? J Thromb Thrombolysis. 2019	93 patients sous HNF	Conditions usuelles non précisées	2h +/- 0,7h (0,9 à 4,2h) PTT-Automate Diagnostica Stago	Moyenne TCA sur citrate = 57,5 +/-20,8 sec Moyenne TCA CTAD = 58,5 +/-21,2 sec Pas d'analyse statistique de la différence. 42 échantillons analysés au-delà de 2h : biais moyen CITRATE – CTAD = -1,24±10,9 sec soit -2% Conclusion des auteurs : Stabilité sur tube CTAD jusqu'à 4h Pas de différence entre citrate et CTAD

c. Stabilité du TCA avec HNF en plasma citraté

Deux études retrouvent des différences significatives dès 6h de conservation, que ce soit à température ambiante ou à 4°C (Adcock et al. 1998; Awad et al. 2006) (Tableau 3). De façon concordante, Heil *et al* montrent une stabilité inférieure à 8 heures (premier point testé) lorsque le plasma est conservé à température ambiante, mais en revanche allant jusqu'à 24h quand l'échantillon est conservé à 6°C (Heil et al. 1998). La libération de PF4 semble être réduite quand le plasma est conservé à température réfrigérée (Adcock et al. 1998; Heil et al. 1998).

Très récemment, une étude menée sur 67 échantillons issus de 56 patients retrouve une diminution statistiquement significative ($p = 0,0002$) du TCA après 4h de conservation à température ambiante des tubes centrifugés dans l'heure, bouchés, non décantés, vs 1h. Le biais moyen est de -3,5 sec (95% IC = -

8,9 ± 2 %), il est plus faible que vs le tube apparié non centrifugé conservé 4h (biais moyen non publié, différence des médiane -7,7 sec). Les auteurs n'analysent pas l'impact clinique de ces variations et concluent que le délai maximum de réalisation de l'analyse doit être de 1 à 2h. (Toulon et al. 2020)

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par le TCA, le GFHT préconise que le plasma citraté, conservé à température ambiante ou à +4°C, soit analysé dans les 4 heures qui suivent le prélèvement, sous réserve d'une centrifugation du sang total dans l'heure qui suit le prélèvement. Les données sont insuffisantes en cas de centrifugation au-delà de 1h.

Tableau 3 : Résumé des études de stabilité du TCA pour la surveillance de l'HNF sur plasma frais citraté

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Conservation du plasma	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
Adcock D. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. Blood Coagul Fibrinolysis. 1998	14 patients sous HNF	Données manquantes	Tube primaire bouché	4°C sur glace 20-22°C	<1h, 4h, 6h, 8h, 24h	Pas de différence significative à 6h sur la moyenne mais différences min et max importantes. Conclusion des auteurs : à T° ambiante, centrifugation et analyse ≤1h à 4°C, centrifugation et analyse ≤4h
Heil W. Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma. Clin Chem Lab Med. 1998	20 patients sous HNF	<1h Neothromtin Behringwerke	Tube primaire bouché	6°C 21°C	0h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h, 168h	Conclusion des auteurs : à 21°C, diminution significative de 13% dès 8h à 6°C, stabilité jusqu'à 24h
Awad MA. Stability of activated partial thromboplastin time (APTT) test under different storage conditions. Hematology. 2006	37 patients sous HNF	Immédiat Kit Dade Behring	Aliquot bouché	T° ambiante 4°C	0h, 6h, 12h, 24h	Augmentation significative dès 6h à T° ambiante et à 4°C Conclusion des auteurs : dosage immédiat
Toulon P. Monitoring unfractionated heparin therapy. 4 hour-stability of anti-Xa activity in unspun citrated tubes. Thrombosis Research 2020	56 patients sous HNF (67 échantillons)	<1h HemosIL SynthASil IL	Tube primaire bouché	18-25°C	4h	Différence statistiquement significative après 4h à T° ambiante : le TCA passe de 56,6 sec à 53,0 sec (p=0,0002), soit un biais moyen de -3,5 sec (95% IC = -8,9 ± 2 %) Impact clinique ? Conclusion des auteurs : délai maximum de 1-2h

d. Stabilité du TCA avec HNF en plasma CTAD

A notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à déterminer la stabilité du TCA pour le suivi biologique de l'HNF en plasma sur tube CTAD. Par défaut, les données obtenues sur sang total CTAD s'appliquent.

En l'absence de données permettant d'établir des recommandations, pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par le TCA, **une conservation du plasma CTAD jusqu'à 5 heures après prélèvement est acceptable sous réserve d'une centrifugation dans les 2 heures** (accord d'experts).

e. Stabilité du TCA avec HNF en plasma citraté et CTAD conservé en aliquote congelé

A notre connaissance, la seule étude sur le sujet rapporte une augmentation significative du TCA dès conservation 6h à -40°C (Awad et al. 2006).

Cependant, le CLSI accepte une congélation du plasma à au moins -20°C pendant 2 semaines si l'échantillon est centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement et si le plasma est décanté dans les 4 heures après le prélèvement (Adcock et al. 2008). L'ICSH précise que le prélèvement doit être double-centrifugé avant congélation (Kitchen et al. 2021).

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par le TCA, **une conservation du plasma jusqu'à 2 semaines à une température minimale de -20°C est acceptable**, sous réserve que l'échantillon soit centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement, que le plasma soit décanté dans les 4 heures après le prélèvement et qu'il soit double-centrifugé. **Il n'y a pas de données au-delà de 2 semaines, pour les températures en deçà de -20°C et pour le plasma congelé à partir de tubes CTAD.**

3. Activité anti-Xa héparine non fractionnée (HNF)

Un paramètre important à prendre en compte dans l'interprétation des résultats des études de stabilité des activités anti-Xa héparine est la présence ou non de sulfate de dextran dans le réactif utilisé. En effet, le sulfate de dextran pourrait permettre de dissocier l'héparine liée au PF4 et ainsi allonger les délais de réalisation. Cependant, il n'existe pas de publications évaluant le rôle du sulfate de dextran sur la stabilité de l'activité anti-Xa HNF.

L'article de Smahi *et al* (Smahi et al. 2020) rapporte une étude comparant 4 réactifs de mesure de l'activité anti Xa de plasmas surchargés en héparine, par technique chromogénique, dont 3 contiennent du sulfate de dextran. Des différences significatives ont été notées entre les 4 réactifs avec en particulier des valeurs plus basses avec le réactif sans dextran (impact clinique). Aucune étude de stabilité n'a été effectuée.

a. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en sang total citraté

Le CLSI préconise une centrifugation de l'échantillon prélevé sur tube citraté dans l'heure qui suit le prélèvement, et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures (Adcock et al. 2008). Cependant, ces recommandations ne s'appuient pas sur des études ayant évalué spécifiquement la stabilité de l'activité anti-Xa HNF mais extrapolent les données issues du TCA. De manière identique, le BCSH préconise une centrifugation dans les 1 à 2 heures après prélèvement, et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures (Kitchen et al. 2014). La société allemande de biologie clinique (Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL)) recommande la réalisation de l'activité anti-Xa HNF dans les 4 heures qui suivent le prélèvement sur tube citraté conservé à température ambiante (Guder et al. 2010). L'ICSH recommande une centrifugation dans l'heure suivant le prélèvement et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures (Kitchen et al. 2021).

Dès 1983, Contant *et al* notent une diminution significative de la concentration d'HNF (mesurée par activité anti-IIa) sur des échantillons surchargés *in vitro* en HNF et conservés 5h (premier point testé) à température ambiante (Contant et al. 1983). Ces résultats sont confirmés par Adcock *et al* en 1998, qui concluent à une stabilité maximale de 1h à température ambiante sur 3 échantillons testés, les résultats étant significativement diminués dès 2h, l'impact clinique n'est pas analysé (Adcock et al. 1998). Ray *et al* retrouvent également une diminution statistiquement significative ($p < 0.05$) de $-0,01$ UI/ml ($0,04 \pm 0,01$ UI/ml) après 100 minutes de conservation (seul point testé), mais sans impact clinique selon les auteurs (Ray 2008).

Plus récemment, une centrifugation différée à 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h, chez 31 patients, a révélé une variation considérée comme non cliniquement significative à 4h, avec cependant 5 patients au-delà du biais acceptable de 15 %, mais interprétés par les auteurs comme en deçà de la déviation standard des méthodes anti-Xa (valeur non précisée) (Billoir et al. 2019). A 6h, le biais global moyen vs 1h est plus faible mais la déviation standard plus importante ($98.5 \pm 25.4\%$). Le réactif utilisé pour mesurer l'activité anti-Xa ne contient pas de sulfate de dextran. Les concentrations de PF4 ne sont pas significativement différentes à 4h et à 6h ($n=14$). Les auteurs concluent qu'une centrifugation différée jusqu'à 4h après le prélèvement est acceptable.

Toujours en 2019, une autre équipe française a étudié l'impact d'une centrifugation différée 4h après le prélèvement sur l'activité anti-Xa HNF sur 123 échantillons issus de 56 patients (Toulon et al. 2020). L'activité anti-Xa médiane à 4h est significativement diminuée par rapport à < 1h (0,35 *versus* 0,40 UI/mL respectivement). Si l'on considère une zone thérapeutique cible entre 0,3 et 0,7 UI/ml, pour 12 patients (10%), les différences de résultats auraient modifié l'interprétation entre zone subthérapeutique et thérapeutique (n=11) ou suprathérapeutique et thérapeutique (n=1), ce qui aurait pu entraîner une augmentation de la dose d'anticoagulant chez 2 d'entre eux. Cependant le biais moyen (Bland et Altman) est de -0,05 UI/mL (-12%), inférieur à l'incertitude de mesure de la méthode (16 % pour une valeur à 0,5 UI/mL selon les auteurs). Le réactif utilisé pour mesurer l'activité anti-Xa contient du sulfate de dextran. (Tableau 4).

En conclusion, ces deux nouvelles études retrouvent une diminution statistiquement significative pour une centrifugation différée 4h après le prélèvement mais avec cliniquement peu d'impact selon les auteurs. L'impact du sulfate de dextran sur la stabilité de l'activité anti-Xa sur sang total reste à évaluer.

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par activité anti-Xa, le GFHT recommande que le sang total prélevé sur tube citaté conservé à température ambiante soit centrifugé dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Un délai de 4 h est acceptable.

Tableau 4 : Résumé des études de stabilité de l'activité anti-Xa pour la surveillance de l'HNF en sang total citraté.

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	CONCLUSION
Contant G. Heparin inactivation during blood storage: Its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole -C.T.A.D. mixture-. Thrombosis Research. 1983	39 patients sous HNF	4°C 20-25°C	<30 min 5h Anti-IIa	△ Activité anti-IIa △ Dès 30 min, [HNF] CTAD significativement plus élevée que [HNF] citrate => l'inactivation de l'héparine intervient très précocement. Après 5h sur CTAD, diminution non significative Après 5h sur citrate, diminution significative Conclusion des auteurs : privilégier les tubes CTAD
Adcock D. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. Blood Coagul Fibrinolysis. 1998	3 patients sous HNF	20-22°C	0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 8h, 24h Anti-Xa ACA DuPont	Conclusion des auteurs : Stable 1h Diminution significative dès 2h à T° ambiante. Impact clinique non analysé
Ray M. Stability of the activated partial thromboplastin time used to monitor unfractionated heparin. J Thromb Haemost. 2008	11 patients sous HNF	T° ambiante	0,5h et 1,6h Rotachrom Heparin assay Diagnostica Stago	Sur citrate, après 1,6h : diminution statistiquement significative -0,01 UI/ml (0,04±0,01 UI/ml) (p<0.05) mais sans impact clinique Sur CTAD, après 1,6h, pas de différence A 0,5h, Anti-Xa HNF sur citrate significativement plus faible que sur CTAD : différence médiane - 0,07 UI/mL. <i>Idem</i> à 1,6h. Conclusion des auteurs : Privilégier CTAD. Sur citrate, ok jusqu'à 1,6h car différence sans impact clinique
Billoir P. Is citrate theophylline adenosine dipyridamole (CTAD) better than citrate to survey unfractionated heparin treatment? Has delayed centrifugation a real impact on this survey? J Thromb Thrombolysis. 2019	31 patients sous HNF	Conditions usuelles non précisées	1h 2h 3h 4h 5h 6h STA R Liquid anti-Xa Diagnostica Stago	Moyenne Anti-Xa 1h = 0,37+/-0,21 UI/ml Moyenne Anti-Xa 4h = 0,37+/-0,20 UI/ml soit 106%+/-26 Moyenne Anti-Xa 6h = 0,35+/-0,22 UI/ml soit 99%+/-25 5 patients avec biais global >15% au biais global moyen mais inférieur au CV de reproductibilité de la méthode (pas d'impact clinique selon auteurs) Biais moyen entre 1h et 4h : -1,10 ⁻⁹ +/- 0,058 UI/mL Biais moyen entre 1h et 6h : 0,016 +/-0,066 UI/mL Pas de différence sur concentration PF4 (n=14) Conclusion des auteurs : pas d'impact clinique jusqu'à 6h mais conclusion finale ok jusqu'à 4h
Toulon P. Monitoring unfractionated heparin therapy. 4 hour-stability of anti-Xa activity in unspun citrated tubes. Thrombosis Research 2020	123 HNF (56 patients)	18 à 25°C	<1h et 4h Biophen Heparin LRT	Différence statistiquement significative après 4h à T° ambiante : l'anti Xa médiane passe de 0,40 à 0,35 UI/mL (p<0,0001) Biais moyen = -0,05 UI/mL, soit - 11,9%, inférieur à l'incertitude de mesure de la méthode (16% pour une valeur à 0,5UI/mL selon les auteurs). Si on considère la cible thérapeutique 0,3-0,7UI/mL, 12 échantillons (10%) changent de zone après 4h (11 passent en dessous de 0,3 et 1 passe en dessus de 0,7, mais valeurs très proches des bornes donc seulement 2 cas auraient eu un changement de posologie. Conclusion des auteurs : diminution statistiquement significative après 4h, mais impact clinique faible

b. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en sang total CTAD

Le CLSI préconise que l'échantillon prélevé sur tube CTAD soit analysé dans les 4 heures qui suivent le prélèvement (Adcock et al. 2008). Cependant, ces recommandations ne s'appuient pas sur des études ayant évalué spécifiquement la stabilité de l'activité anti-Xa HNF mais extrapolent les données issues du TCA. Le BCSH mentionne l'utilisation des tubes CTAD comme alternative aux tubes citratés pour limiter la neutralisation de l'héparine par le PF4, mais sans mentionner de délai (Kitchen et al. 2014).

Dès 1983, Contant *et al* notent une diminution non significative de la concentration d'héparine (mesurée par activité anti-IIa) sur des échantillons surchargés *in vitro* en HNF, conservés 5h (premier point testé) à température ambiante (Contant et al. 1983).

En 2008, Ray *et al* ne retrouve pas de variation après 1,6h (*versus* 0,5h) à température ambiante sur CTAD (n=11) (Ray 2008). En revanche, à 0,5h et à 1,6h, l'activité anti-Xa est significativement plus faible sur les tubes citratés (différence médiane : -0,07 UI/mL), par comparaison aux tubes CTAD prélevés et centrifugés dans les mêmes conditions, ce qui confirme l'hypothèse d'une inhibition de l'activation plaquettaire et d'une diminution de relargage du PF4 avec l'utilisation des tubes CTAD.

Plus récemment, en 2019, les activités anti-Xa moyennes mesurées simultanément sur citrate et sur CTAD chez 93 patients traités par HNF sont respectivement de 0,18+/-0,16 UI/mL et 0,21+/-0,16 UI/mL (délai moyen avant centrifugation 119 min soit 2h ; délai maximum 251 min soit 4.2h) (Billoir et al. 2019). La comparaison statistique des 2 moyennes n'a pas été réalisée sur l'ensemble des points. Sur les 42 échantillons centrifugés après 2 heures, le biais moyen (citrate – CTAD) est de -0,025 ± 0,041 UI/mL soit -12%. D'après le graphique de Bland et Altman, seuls 15 échantillons ont une activité anti-Xa > 0.1 UI/mL et 7 > 0.2 UI/ml. L'absence de comparaison statistique et le faible nombre d'échantillons ayant une concentration significative d'héparine ne permettent pas de conclure sur l'absence ou non de l'intérêt du CTAD par rapport au citrate. (Tableau 5).

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par mesure de l'activité anti-Xa, **le GFHT recommande que le sang total prélevé sur tube CTAD conservé à température ambiante soit centrifugé dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Un délai de 5 heures est acceptable (accord d'experts).**

Tableau 5 : Résumé des études de stabilité de l'activité anti-Xa pour la surveillance de l'HNF en sang total CTAD.

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	CONCLUSION
Contant G. Heparin inactivation during blood storage: Its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole -C.T.A.D. mixture-. Thrombosis Research. 1983	Echantillons surchargés <i>in vitro</i> en HNF (n=5) et patients sous HNF (n=39)	4°C 20-25°C	<30 min 5h Anti-IIa	△ Activité anti-IIa △ Dès 30 min, [HNF] CTAD significativement plus élevée que [HNF] citrate => l'inactivation de l'héparine intervient très précocement. Après 5h sur CTAD, diminution non significative Après 5h sur citrate, diminution significative Conclusion des auteurs : Stabilité jusqu'à 5h sur tube CTAD Privilégier les tubes CTAD
Ray M. Stability of the activated partial thromboplastin time used to monitor unfractionated heparin. J Thromb Haemost. 2008	11 patients sous HNF	T° ambiante	0,5h et 1,6h Rotachrom Heparin assay Diagnostica Stago	Sur citrate, après 1,6h : diminution statistiquement significative de -0,01 UI/ml (0,04±0,01 UI/ml) (p<0.05) mais sans impact clinique Sur CTAD, après 1,6h, pas de différence A 0,5h, Anti-Xa HNF sur citrate significativement plus faible que sur CTAD : différence médiane - 0,07 UI/mL. <i>Idem</i> à 1,6h. Conclusion des auteurs : Stabilité sur tube CTAD jusqu'à 1,6h Privilégier CTAD.
Billoir P. Is citrate theophylline adenosine dipyridamole (CTAD) better than citrate to survey unfractionated heparin treatment? Has delayed centrifugation a real impact on this survey? J Thromb Thrombolysis. 2019	93 patients sous HNF (seulement 7 échantillons > 0,2 UI/mL à plus de 2h)	Conditions usuelles non précisées	2h +/- 0,7h 0,9 à 4,2h PTT-Automate Diagnostica Stago	Moyenne Anti-Xa sur citrate = 0,18 +/-0,16 UI/mL Moyenne Anti-Xa CTAD = 0,21 +/-0,16 UI/mL Pas d'analyse statistique de la différence 42 échantillons analysés au-delà de 2h (<i>mais seulement 15 échantillons >0,1 UI/mL</i>) : Biais moyen CITRATE - CTAD = -0,025±0.041 UI/mL soit -12%. Conclusion des auteurs : Stabilité sur tubes CTAD jusqu'à 4h Pas de différence entre CTAD et citrate

c. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en plasma citraté

Le CLSI et le BCSH préconisent une conservation maximale du plasma citraté de 4h, sous réserve que l'échantillon ait été centrifugé dans l'heure qui suit le prélèvement (Adcock et al. 2008) ou dans les 1h à 2h après le prélèvement (Kitchen et al. 2014). Cependant, ces recommandations ne s'appuient pas sur des études ayant évalué spécifiquement la stabilité de l'activité anti-Xa HNF mais extrapolent les données issues du TCA. L'ICSH recommande une centrifugation dans l'heure suivant le prélèvement et la réalisation de l'analyse dans les 4 heures (Kitchen et al. 2021).

La seule étude portant sur la stabilité de l'activité anti-Xa HNF étudie deux réactifs anti-Xa (activité chromogénique). Sur 67 échantillons de plasma citraté l'activité anti-Xa dosée avec le réactif Heparin LRT d'Hyphen Biomed rapporte une diminution significative après conservation du plasma centrifugé dans l'heure, 4h à température ambiante *versus* 1h (Toulon et al. 2020). Le biais moyen est de -0,02 (-0,06 ± 0,03) UI/mL (-5%). Sur 62 échantillons, traités dans les mêmes conditions, l'activité anti-Xa dosée avec le réactif HemosIL Liquid Anti-Xa de Werfen, le biais moyen est de -0,04 (-0,16 ± 0,08) UI/mL (-11%). Avec ce réactif, huit échantillons (13%) changent de zone cible, mais l'impact clinique est négligeable, les valeurs étant proches des seuils des cibles thérapeutiques et n'auraient pas entraîné de modification de posologie selon les auteurs. Pour cette équipe, un délai maximal de conservation du plasma citraté de 4h est acceptable

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par activité anti-Xa, **le GFHT recommande que le plasma citraté, conservé à température ambiante, soit analysé dans les 4 heures qui suivent le prélèvement, sous réserve d'une centrifugation dans l'heure après prélèvement.** Les données sont insuffisantes en cas de centrifugation au-delà de 1h.

d. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en plasma CTAD

A notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à déterminer la stabilité de l'activité anti-Xa HNF sur plasma CTAD. Par défaut, les données obtenues sur sang total CTAD s'appliquent.

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HNF par activité anti-Xa HNF sur tube CTAD, en l'absence de données, **le GFHT ne fait pas de recommandation pour la conservation du sang total. Un délai de conservation des prélèvements à température ambiante est acceptable jusqu'à 5 heures après le prélèvement** (accord d'experts).

e. Stabilité de l'activité anti-Xa HNF en plasma conservé en aliquote congelé

A notre connaissance en 2022, il n'existe qu'une seule étude portant sur la stabilité de l'activité anti-Xa HNF en plasma citraté congelé : chez 61 patients, aucune différence significative n'est retrouvée après 1 semaine à -70°C (centrifugation dans les 2 heures après prélèvement) (Gosselin and Dwyre 2015).

L'activité anti-Xa HNF semble stable 7 jours à au moins -70°C, sous réserve d'une centrifugation dans les 2h suivant le prélèvement et que le prélèvement soit double-centrifugé.

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

a. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en sang total citraté

Le CLSI préconise la centrifugation et l'analyse dans les 4 heures qui suivent le prélèvement (Adcock et al. 2008). Le BCSH ne mentionne pas de délai.

La seule étude portant sur le sujet ne retrouve pas de différence statistiquement significative après 4 à 6 h de conservation à température ambiante (n= 60 ; 30 nadroparine ; 20 énoxaparine ; 10 daltéparine). Après 24h, une diminution est observée, statistiquement significative mais sans impact clinique selon les auteurs (Birri et al. 2011).

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HBPM par mesure de l'activité anti-Xa, le GFHT recommande que le sang total prélevé sur tube citraté conservé à température ambiante soit centrifugé dans les 4 heures qui suivent le prélèvement. Un délai de 6 heures est acceptable. Il n'y a pas de données disponibles au-delà.

b. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en sang total CTAD

A notre connaissance en 2022, aucune étude ne s'est attachée à déterminer la stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en sang total CTAD.

En l'absence de données, le GFHT n'émet pas de préconisation quant à la durée de conservation du sang total prélevé sur tube CTAD pour la surveillance biologique d'un traitement par HBPM par activité anti-Xa. Il semble raisonnable d'extrapoler les données obtenues sur tube citraté (accord d'experts).

c. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en plasma citraté

Le CLSI préconise la centrifugation et l'analyse dans les 4 heures qui suivent le prélèvement (Adcock et al. 2008). Le BCSH ne mentionne pas de délai.

En 2010, une étude portant sur 86 échantillons issus de 56 patients traités par énoxaparine retrouve une augmentation statistiquement significative de l'activité anti-Xa HBPM après conservation du plasma 24h à température ambiante : biais moyen $0,15 \pm 0,21$ UI/ml. Si l'on considère une zone cible d'activité anti-Xa entre 0,6 et 1,0 UI/ml 40%, des échantillons changeaient de zone (Rojnuckarin et al. 2010). En revanche en 2011, sur 60 échantillons issus de patients traités par nadroparine (n=30), énoxaparine (n=20) ou daltéparine (n=10), aucune différence significative n'est détectée après conservation du plasma 4-6h et 24h (Birri et al. 2011). (Tableau 6).

Tableau 6 : Résumé des études de stabilité de l'activité anti-Xa pour la surveillance de l'HBPM en plasma citraté.

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	CONCLUSION
Rojnuckarin P. Stability of plasma anti-Xa activity in low-molecular-weight heparin monitoring. Clin Appl Thromb Hemost. 2010	86 échantillons 56 patients sous énoxaparine	<5h (transport < 4h et centrifugation <1h après arrivée au labo)	T° ambiante	< 4h 24h	Moyenne Anti-Xa <4h : 0,78 +/-0,36 UI/mL Moyenne Anti-Xa 24h : 0,93 +/-0,42 UI/mL Conclusion des auteurs : Augmentation significative à 24h. 40% des échantillons changent de zone si cible 0,6 – 1 UI/ml
Birri N. Stability of low molecular weight heparin anti-factor Xa activity in citrated whole blood and plasma. Br J Haematol. 2011	60 patients sous HBPM 30 nadroparine 20 énoxaparine 10 daltéparine	Non précisé	T° ambiante	0h 4-6h 24h	4-6h : pas de différence significative 24h : pas de différence significative Conclusion des auteurs : stable jusqu'à 24h

Pour la surveillance biologique d'un traitement par HBPM par activité anti-Xa, **le GFHT recommande que le plasma citraté conservé à température ambiante soit analysé dans les 6 heures qui suivent le prélèvement. Les données sont insuffisantes ou contradictoires au-delà.**

d. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en plasma CTAD

A notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à déterminer la stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en plasma CTAD.

En l'absence de données, **le GFHT n'émet pas de préconisation quant à la durée de conservation du plasma CTAD pour la surveillance biologique d'un traitement par HBPM par activité anti-Xa. Il semble raisonnable d'extrapoler les données obtenues sur tube citraté (accord d'experts).**

e. Stabilité de l'activité anti-Xa HBPM en plasma conservé en aliquote congelé

Aucune différence significative d'activité anti-Xa HBPM n'est retrouvée sur plasma citraté conservé 24h à -20°C (n=60) (Birri et al. 2011) et une semaine à -70°C (n=59) (Gosselin and Dwyre 2015). En revanche Rojnuckarin *et al* constate une augmentation significative de l'activité anti-Xa HBPM sur 39 plasmas conservé 6 à 12 mois à -70°C sans que l'impact clinique soit analysé (Rojnuckarin et al. 2010).

L'activité anti-Xa HBPM apparaît stable 24h à au moins -20°C et 7 jours à au moins -70°C, sous réserve d'une centrifugation dans les 4 heures qui suivent le prélèvement.

5. Références

- Adcock D, Kressin D, Marlar RA. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998 Sep;9(6):463–70.
- 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. Approved guideline-Fifth Edition Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008;28(5).
- Awad MA, Sharaf Eldeen OA, Ibrahim HA. Stability of activated partial thromboplastin time (APTT) test under different storage conditions. *Hematology*. 2006 Oct;11(5–6):311–5.
- van den Besselaar AM, Meeuwisse-Braun J, Jansen-Grüter R, Bertina RM. Monitoring heparin therapy by the activated partial thromboplastin time--the effect of pre-analytical conditions. *Thromb Haemost*. 1987 Apr 7;57(2):226–31.
- van den Besselaar AMHP. Photochemical decomposition of dipyridamole in aqueous solution and the utilization of citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole anticoagulant for monitoring of heparin. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2010 Apr;32(2):265–7.
- Billoir P, Clavier T, Guilbert A, Barbay V, Chrétien MH, Fresel M, et al. Is citrate theophylline adenosine dipyridamole (CTAD) better than citrate to survey unfractionated heparin treatment? Has delayed centrifugation a real impact on this survey? *J Thromb Thrombolysis*. 2019 Aug;48(2):277–83.
- Birri N, Baumgartner D, Conte T, Huynh A, Weller K, Pavicic M, et al. Stability of low molecular weight heparin anti-factor Xa activity in citrated whole blood and plasma: Correspondence. *British Journal of Haematology*. 2011 Dec;155(5):629–31.
- Contant G, Gouault-Heilmann M, Martinoli JL. Heparin inactivation during blood storage : Its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole -C.T.A.D. mixture-. *Thrombosis Research*. 1983 Jul;31(2):365–74.
- Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. Parenteral anticoagulants: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012 Feb;141(2 Suppl):e24S-e43S.
- Gosselin RC, Dwyre DW. Determining the effect of freezing on coagulation testing: comparison of results between fresh and once frozen-thawed plasma. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2015 Jan;26(1):69–74.
- Gouin-Thibault I, Sié P, Siguret V. Héparine, dérivés hépariniques et antagoniste de la vitamine K. Maniement, surveillance biologique, gestion des complications. Mise au point, pour la commission pharmacologie et thérapeutique du Groupe d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT). 2012;
- 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.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen A, Lippi G, Mackie I, et al. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol*. 2021 Dec;43(6):1272–83.
- Kitchen S, Gray E, Mackie I, Baglin T, Makris M. Measurement of non-Coumarin anticoagulants and their effects on tests of Haemostasis: Guidance from the British Committee for Standards in Haematology. *British Journal of Haematology*. 2014;12.
- Marlar RA, Clement B, Gausman J. Activated Partial Thromboplastin Time Monitoring of Unfractionated Heparin Therapy: Issues and Recommendations. *Semin Thromb Hemost*. 2017 Apr;43(3):253–60.
- Ray M. Stability of the activated partial thromboplastin time used to monitor unfractionated heparin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008 Oct;6(10):1817–9.
- Rojnuckarin P, Akkawat B, Juntiang J. Stability of plasma anti-Xa activity in low-molecular-weight heparin monitoring. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2010 Jun;16(3):313–7.
- Smahi M, De Pooter N, Hollestelle MJ, Toulon P. Monitoring unfractionated heparin therapy: Lack of standardization of anti-Xa activity reagents. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Oct;18(10):2613–21.
- Toulon P, Appert-Flory A, Fischer F, Buvat S, Jambou D, Mahagne MH. Monitoring unfractionated heparin therapy. 4 hour-stability of anti-Xa activity in unspun citrated tubes. *Thromb Res*. 2020;186:7–12.