



Pré-analytique en hémostase :
Propositions concernant la surveillance biologique
d'un traitement par anticoagulant anti-Xa et anti-IIa
(hors héparines).

Actualisation octobre 2023

Rédaction : Céline DESCONCLOIS

Relecture : Elodie BOISSIER, Céline DELASSASSEIGNE et Claire FLAUJAC

Vérification et Approbation : Abla AMARA PETITJEAN, Emmanuel DE MAISTRE, Claire ESPANEL, Jean-Marc GIANNOLI, Isabelle GOUIN-THIBAUT, Inès HARZALLAH, Emmanuelle JEANPIERRE, Amélie LAUNOIS, Véronique LE CAM-DUCHEZ, Sophie LUNEAU, Frédéric LORIDON, Pauline NOYEL.

Table des matières

Abréviations	3
I. Introduction.....	4
II. Anticoagulants oraux directs.....	5
1. Apixaban (dosage par méthode chromogénique anti-Xa)	5
a. Stabilité en sang total.....	5
b. Stabilité en plasma frais	6
c. Stabilité en plasma congelé.....	8
2. Rivaroxaban (dosage par méthode chromogénique anti-Xa)	10
a. Stabilité en sang total.....	10
b. Stabilité en plasma frais	11
c. Stabilité en plasma congelé.....	13
3. Edoxaban (dosage par méthode chromogénique anti-Xa)	15
a. Stabilité en sang total.....	15
b. Stabilité en plasma frais	15
c. Stabilité en plasma congelé.....	16
4. Dabigatran (dosage fonctionnel).....	18
a. Stabilité en sang total.....	18
b. Stabilité en plasma frais	19
c. Stabilité en plasma congelé.....	22
III. Argatroban (dosage fonctionnel)	24
a. Stabilité en sang total.....	24
b. Stabilité en plasma frais et en plasma congelé	24
IV. Danaparoïde sodique et fondaparinux sodique.....	24
Références.....	25

Abréviations

AOD	Anticoagulants oraux directs
COMETH	Coordination Médicale pour l'Etude et le Traitement des maladies Hémorragiques constitutionnelles
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
LC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
SFHT	Société Française de Thrombose et d'Hémostase
TA	Température ambiante
TT	Temps de thrombine

I. Introduction

Le groupe de travail « pré analytique » du Groupe Français d'Etudes sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT) a émis en 2018, après analyse de la littérature, des recommandations qui précisent, pour les examens d'hémostase utilisés pour la surveillance biologique des anticoagulants oraux directs (AOD), 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. Ce document, sous l'égide de la Société Française de Thrombose et d'Hémostase (SFTH), résultant de la fusion entre le GFHT et la COMETH (Coordination Médicale pour l'Etude et le Traitement des maladies Hémostatiques constitutionnelles), propose une actualisation de ces données à l'aune des publications parues depuis 2018 et une extension aux autres anticoagulants avec activité anti-IIa et anti-Xa, hors héparine non fractionnée (HNF) et héparine de bas poids moléculaire (HBPM) qui ont fait l'objet d'une actualisation en janvier 2023.

Les méthodes de travail utilisées ont été décrites dans les précédents documents et ne seront pas redétaillées.

Le groupe de travail a choisi de présenter une revue des données bibliographiques dans un texte long présentant l'argumentaire des recommandations. La bibliographie est disponible en annexe (*lien hypertexte vers le fichier de biblio*). Ces données sont regroupées dans un tableau de synthèse reprenant les 3 niveaux de recommandations retenues :

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

Acceptable : données reposant sur une majorité d'articles ayant fait l'objet d'interprétations variables selon les publications ou, à défaut, un article pour lequel les critères d'interprétation ne sont pas aussi solides que dans la catégorie « Recommandé » (exemple : effectif plus faible, méthodologie statistique utilisée, ...) (avis d'experts).

Non conforme : données non recommandées faisant l'objet d'un consensus après la lecture des différents articles montrant une modification significative des résultats ou, à défaut, reposant sur au moins un article pour lequel la méthodologie et les critères d'interprétation sont solides et robustes (avis d'experts).

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

II. Anticoagulants oraux directs

Les AOD ne requérant pas de surveillance biologique systématique, les conditions de réalisation de leurs dosages, et notamment les délais avant réalisation ont fait l'objet de peu d'études. Les recommandations proposées par le GFHT en 2018 reposaient donc sur une bibliographie pauvre. Depuis deux nouvelles études originales ont été publiées (Thuile et al. 2021; Raynor et al. 2023) mais de nombreux points restent encore en « données insuffisantes ».

1. Apixaban (dosage par méthode chromogénique anti-Xa)

a. Stabilité en sang total

L'International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommande un traitement de l'échantillon dans les 4h après prélèvement, sans que cette pratique soit argumentée par les auteurs (Gosselin et al. 2018). Les mises à jour de 2019 et 2021 n'apportent pas d'autre précision sur le versant pré-analytique (Gosselin et al. 2019 ; Douxfils et al. 2021).

L'unique étude antérieure à 2018 évaluant spécifiquement la stabilité en sang total, sur 5 plasmas issus de patients traités par apixaban rapportait une stabilité d'au moins 2h (durée maximale étudiée) à température ambiante (TA) (McGrail et al. 2016).

En 2021, l'équipe de Thuile (Thuile et al. 2021) a étudié 20 échantillons de patients traités par apixaban conservés jusqu'à 24h à TA en sang total. L'effectif quoique nettement plus important que celui de Mc Grail décrit ci-dessus reste restreint et l'étendue des valeurs assez limitée avec en particulier aucune valeur en deçà de 49 ng/mL. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 24h avec comme critère d'acceptabilité une variation < 22 % (critère basé sur les performances locales : $2.77 \times CV$ maximum local = 8.0%), et des résultats équivalents en utilisant une variation limite de 15%. D'un point de vue statistique, l'analyse par test apparié montre une différence significative dès 4h ($p < 0.01$) ; ainsi qu'à 8h ($p < 0.01$) et 24h ($p < 0.001$).

En 2023, une étude française bi-centrique (Raynor et al. 2023) a évalué la stabilité sur sang total à 4h et 6h de 37 patients traités par apixaban. A 6h, tous les échantillons présentent une variation <15%, avec pour les 15 prélèvements ayant des taux inférieurs au seuil décisionnel de 50 ng/mL une valeur de l'intervalle de confiance à 95% du pourcentage de variation <12%. Les auteurs concluent à une stabilité jusqu'à 6h à TA.

Pour la mesure de la concentration d'apixaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique, la SFTH recommande que le sang total prélevé sur tube primaire citraté et conservé à température ambiante soit centrifugé dans les 6 heures qui suivent le prélèvement. Une conservation jusqu'à 24 heures à température ambiante est acceptable. Les données sont absentes au-delà. Le délai d'analyse sera précisé au chapitre 1.b (stabilité en plasma frais).

Tableau 1 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance de l'apixaban par méthode chromogénique anti-Xa sur sang total

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	Conclusions
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	5 patients traités par apixaban	20-25°C	0,5h, 1h et 2h. Chromogénique anti-Xa, Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	Pas de différence à 2h (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : stable 2h (temps maximum étudié)
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	20 patients traités par apixaban 49-362 ng/ml	T° ambiante	0h, 4h, 8h et 24h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory	A 24h, aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées). D'un point de vue statistique : différence significative avec p< 0.01 à 4h et 8h et < 0.001 à 24h. Conclusion des auteurs : stable 24h (temps maximum étudié)
Raynor A. Stability of Rivaroxaban and Apixaban Anti-Xa Activities in Whole Blood Samples: A French Bicentric Study. Thrombosis and Haemostasis 2023	37 patients traités par apixaban, dont 15 < 50 ng/ml 17-387 ng/ml	T° ambiante	<2h, 4h et 6h Chromogénique anti-Xa, STA-Liquid anti-Xa Stago ou Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	A 6h, aucune valeur avec variation > 15% et biais médian 0% [- 5 à 4]. Conclusion des auteurs : stable 6h (temps maximum étudié)

b. Stabilité en plasma frais

Selon 2 études de 2014, dédiées à la comparaison de méthodes de dosages, réalisées sur 3 et 6 plasmas enrichis, l'apixaban (mesuré par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)) est stable au moins 24h (Schmitz et al. 2014), et jusqu'à 14 jours (Gous et al. 2014), à TA et à +2-8°C.

Avant 2018, une seule étude avait été réalisée sur plasmas issus de 10 patients traités par apixaban. Elle décrit une stabilité d'au moins 8h (durée maximale étudiée) à TA, et d'au moins 48h (durée maximale étudiée) à +5°C (McGrail et al. 2016). Les recommandations de l'ICSH de 2018 reposent sur cette étude et préconisent une analyse dans les 8h après prélèvement, et au-delà une conservation réfrigérée pendant 48h maximum (Gosselin et al. 2018). Mais une seconde étude publiée après ces recommandations et réalisée sur 45 échantillons rapporte une stabilité d'au moins 7 jours (durée maximale étudiée) sur plasma centrifugé dans les 4h après prélèvement et conservé à TA sur tube primaire non décanté (Boissier et al. 2018).

En 2021, l'équipe de Thuile (Thuile et al. 2021) a étudié 20 échantillons de patients traités par apixaban, dont le plasma frais a été décanté, aliquoté et conservé jusqu'à 24h à +4°C ou à TA. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 24h avec comme critère d'acceptabilité une variation <22% (critère basé sur les performances locales : 2.77*CV maximum local = 8.0%), et des résultats équivalents en utilisant une variation limite de 15%, ce qui confirment les études précédentes.

Pour la mesure de la concentration d'apixaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique, la SFTH recommande que le plasma issu d'un tube primaire citraté centrifugé et conservé à température ambiante soit analysé dans les 7 jours qui suivent le prélèvement. Les données sont insuffisantes au-delà.

Tableau 2 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance de l'apixaban par méthode chromogénique anti-Xa sur plasma frais

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Conservation du plasma	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014	3 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	Non précisé	4°C TA	24h	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 24h à +4°C et à TA (temps maximum étudié)
Gous T. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry. Ther Drug Monit 2014	6 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	Non précisé	4°C TA	14 jours	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 14 jours à +4°C et à TA (temps maximum étudié)
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	10 patients traités par apixaban	1h Chromogénique anti-Xa, Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	Plasma décanté et divisé en 9 aliquots	5°C 20-25°C	0h, 8h, 24h et 48h 0h, 2h, 4h, 6h et 8h	Pas de différence à 8h à TA et 48h à +5°C (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : stable 8h à TA et 48h à +5°C (temps maximum étudiés)
Boissier E. Rivaroxaban and Apixaban Anti-Xa Measurements: Impact of Plasma Storage for 7 Days at Room Temperature. Thrombosis and Haemostasis 2018	45 patients traités par apixaban 13-440 ng/ml	<4h Chromogénique anti-Xa, STA-Liquid anti-Xa Stago ou Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	Tube primaire bouché	TA	48h et 7 jours	Pas de différence significative à 48h. A 7 jours, un seul point en dehors des critères d'acceptabilité (77% pour cible 80-120% de la valeur de base), mais valeur très basse, proche de la limite de quantification (13 ng/ml) Conclusion des auteurs : stable 7 jours à TA (temps maximum étudié)
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	20 patients traités par apixaban 49-362 ng/ml	<1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory	Plasma décanté, poolé et divisé en 7 aliquots en tube plastique	+4°C TA	0h, 4h, 8h et 24h	A 24h, aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées). D'un point de vue statistique : à +4°C différence significative avec p< 0.01 à 4h et 8h et < 0.001 à 24h ; à TA différence significative avec p< 0.05 à 4h, p< 0.01 à 24h, pas de différence à 8h (p>0.05). Conclusion des auteurs : stable 24h (temps maximum étudié)

c. Stabilité en plasma congelé

Sur une série de 5 plasmas issus de patients traités par apixaban, une stabilité d'au moins 30 jours à -20°C (durée maximale étudiée) est rapportée (McGrail et al. 2016). En 2021, Thuile et al, rapportent une stabilité d'au moins 90 jours à -20°C (Thuile et al. 2021). A -80°C, les seules données disponibles sont issues d'une seule étude sur 3 plasmas enrichis analysés par LC-MS, rapportant une stabilité de 72 jours (durée maximale étudiée) (Schmitz et al. 2014).

Les études sur plasmas enrichis analysés par LC-MS rapportent l'absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation sur l'apixaban (Schmitz et al. 2014 ; Gous et al. 2014). Cette notion est reprise dans les recommandations de l'ICSH (Gosselin et al. 2018). En 2016, la première étude réalisée sur 5 plasmas de patients analysés par méthode chromogénique anti-Xa retrouve un impact significatif de 3 cycles successifs de congélation/décongélation dès le premier cycle (McGrail et al. 2016) alors que l'étude de Thuile de 2021 portant sur 20 plasmas montre l'absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation (Thuile et al. 2021).

Pour la mesure de la concentration d'apixaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique, **une conservation du plasma citraté jusqu'à 30 jours à une température minimale de -20°C est recommandée et un cycle unique de congélation/décongélation est recommandé.** Une conservation jusqu'à 90 jours à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et jusqu'à 72 jours à $\leq -80^{\circ}\text{C}$ est acceptable ainsi que la réalisation de 3 cycles de congélation/décongélation.

L'absence totale de données au-delà de 90 jours à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ et de 72 jours à $\leq -80^{\circ}\text{C}$ ne permet pas d'émettre d'autres conclusions même si la durée de conservation est probablement plus longue, en particulier à des températures $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Tableau 3 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance de l'apixaban par méthode chromogénique anti-Xa sur plasma congelé

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014	3 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	-80°C	72 jours	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 72 jours à -80°C (temps maximum étudié)
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	5 patients traités par apixaban	1h Chromogénique anti-Xa, Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	-20°C	30 jours	Pas de différence au bout d'un mois à -20°C (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : stable 1 mois à -20°C. (temps maximum étudié)

<p>Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021</p>	<p>20 patients traités par apixaban 49-362 ng/ml</p>	<p><1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory</p>	<p>-20°C</p>	<p>90 jours</p>	<p>Aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées) à 90 jours que ce soit après 1 ou 3 cycles de congélation/décongélation. Conclusion des auteurs : stable 90 jours à -20°C (temps maximum étudié)</p>
<p>Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014</p>	<p>3 plasmas enrichis</p>	<p>Non applicable, plasmas enrichis LC-MS</p>	<p>-20°C</p>	<p>3 cycles congélation/décongélation</p>	<p>Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation</p>
<p>Gous T. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry. Ther Drug Monit 2014</p>	<p>6 plasmas enrichis</p>	<p>Non applicable, plasmas enrichis LC-MS</p>	<p>-20°C</p>	<p>3 cycles congélation/décongélation</p>	<p>Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation</p>
<p>McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016</p>	<p>5 patients traités par apixaban</p>	<p>1h Chromogénique anti-Xa, Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed</p>	<p>-20°C</p>	<p>3 cycles de congélation/décongélation</p>	<p>Différence statistique dès le premier cycle de congélation/décongélation Conclusion des auteurs : Pas de recongélation.</p>
<p>Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021</p>	<p>20 patients traités par apixaban 49-362 ng/ml</p>	<p><1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory</p>	<p>-20°C</p>	<p>30 jours 1 cycle, 60 jours 2 cycles, 90 jours 3 cycles</p>	<p>Aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées) à 90 jours que ce soit après 1 ou 3 cycles de congélation/décongélation. D'un point de vue statistique : à 30 jours différence significative avec p< 0.05, mais pas de différence significative à 60 et 90 jours (p>0.05). Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation</p>

2. Rivaroxaban (dosage par méthode chromogénique anti-Xa)

a. Stabilité en sang total

L'ICSH recommande un traitement de l'échantillon dans les 4h après prélèvement, sans que cette pratique ne soit argumentée par les auteurs (Gosselin et al. 2018), les mises à jour de 2019 et 2021 n'apportent pas d'autre précision sur le versant pré-analytique (Gosselin et al. 2019 ; Douxfils et al. 2021).

L'unique étude antérieure à 2018 évaluant spécifiquement la stabilité en sang total, sur 5 plasmas issus de patients traités par rivaroxaban rapportait une stabilité d'au moins 2h (durée maximale étudiée) à TA (McGrail et al. 2016).

En 2021, l'équipe de Thuile (Thuile et al. 2021) a étudié 12 échantillons de patients traités par rivaroxaban conservés jusqu'à 24h à TA en sang total. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 24h avec comme critère d'acceptabilité une variation <22 % (critère basé sur les performances locales : $2.77 * CV_{\text{maximum local}} = 8.0\%$), et des résultats équivalents en utilisant une variation limite de 15%.

En 2023, une étude française bi-centrique (Raynor et al. 2023) a évalué la stabilité sur sang total à 4 et 6h de 35 patients traités par rivaroxaban. A 6h, tous les échantillons, sauf un avec une valeur proche de la limite de quantification (36 ng/mL), présentent une variation <15%. Pour les 21 prélèvements ayant des taux inférieurs au seuil décisionnel de 50 ng/ml, la valeur de l'intervalle de confiance à 95% du pourcentage de variation est <12%. Les auteurs concluent à une stabilité jusqu'à 6h à TA.

Pour la mesure de la concentration de rivaroxaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique anti-Xa, **la SFTH recommande que le sang total prélevé sur tube primaire citraté et conservé à température ambiante soit centrifugé dans les 6 heures qui suivent le prélèvement.** Une conservation jusqu'à 24 heures à température ambiante est acceptable. Les données sont absentes au-delà. Le délai d'analyse sera précisé au chapitre 2.b (stabilité en plasma frais).

Tableau 4 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance du rivaroxaban par méthode chromogénique anti-Xa sur sang total

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	Conclusions
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	5 patients traités par rivaroxaban	20-25°C	0.5h, 1h et 2h. Chromogénique anti-Xa, Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	Pas de différence à 2h (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : stable 2h (temps maximum étudié)
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	12 patients traités par rivaroxaban 31-215 ng/ml	T° ambiante	0h, 4h, 8h et 24h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory	A 24h, aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées). D'un point de vue statistique : différence significative avec p< 0.01 à 4h, p<0.05 à 8h et p< 0.001 à 24h. Conclusion des auteurs : stable 24h (temps maximum étudié)
Raynor A. Stability of Rivaroxaban and Apixaban Anti-Xa Activities in Whole Blood Samples: A French Bicentric Study. Thrombosis and Haemostasis 2023	35 patients traités par rivaroxaban, dont 21 < 50 ng/ml 20-583 ng/ml	T° ambiante	<2h, 4h et 6h Chromogénique anti-Xa, STA-Liquid anti-Xa Stago ou Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	A 6h, un seul échantillon avec variation > 15% (-22.2%), valeur proche de la limite de quantification (36 ng/ml), et biais médian -1% [- 3 à 0]. Conclusion des auteurs : stable 6h (temps maximum étudié)

b. Stabilité en plasma frais

Selon 2 études de 2014, dédiées à la comparaison de méthodes de dosages, réalisées sur 3 et 6 plasmas enrichis, le rivaroxaban (mesuré par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)) est stable au moins 24h (Schmitz et al. 2014), et jusqu'à 14 jours (Gous et al. 2014), à TA et à +2-8°C.

Avant 2018, deux études ont été réalisées sur plasmas issus de patients traités par rivaroxaban. La première (n=10 patients) rapporte une stabilité d'au moins 8h (durée maximale étudiée) à TA, et d'au moins 48h (durée maximale étudiée) à +5°C (McGrail et al. 2016). Les recommandations de l'ICSH de 2018 reposent sur cette étude et préconisent une analyse dans les 8h après prélèvement, et au-delà une conservation réfrigérée pendant 48h maximum (Gosselin et al. 2018). Mais une seconde étude publiée après ces recommandations et réalisée sur 40 échantillons rapporte une stabilité d'au moins 7 jours (durée maximale étudiée) sur plasma centrifugé dans les 4h après prélèvement et conservé à TA sur tube primaire non décanté (Boissier et al. 2018).

En 2021, l'équipe de Thuile (Thuile et al. 2021) a étudié 12 échantillons de patients traités par rivaroxaban, dont le plasma frais a été décanté, aliquoté et conservé jusqu'à 24h à +4°C ou à TA. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 24h avec comme critère d'acceptabilité une variation <22% (critère basé sur les performances locales : 2.77*CV maximum local = 8.0%), et des résultats équivalents en utilisant une variation limite de 15%, ce qui confirme les études précédentes.

Pour la mesure de la concentration de rivaroxaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique, la SFTH recommande que le plasma issu d'un tube primaire citraté centrifugé et conservé à température ambiante soit analysé dans les 7 jours qui suivent le prélèvement. Les données sont insuffisantes au-delà.

Tableau 5 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance du rivaroxaban par méthode chromatogénique anti-Xa sur plasma frais

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Conservation du plasma	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014	3 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	Non précisé	4°C TA	24h	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 24h à +4°C et à TA (temps maximum étudié)
Gous T. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry. Ther Drug Monit 2014	6 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	Non précisé	4°C TA	14 jours	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 14 jours à +4°C et à TA (temps maximum étudié)
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	10 patients traités par rivaroxaban	1h Chromogénique anti-Xa, Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	Plasma décanté et divisé en 9 aliquots	5°C 20-25°C	0h, 8h, 24h et 48h 0h, 2h, 4h, 6h et 8h	Pas de différence à 8h à TA et 48h à +5°C (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : stable 8h à TA et 48h à +5°C (temps maximum étudiés)
Boissier E. Rivaroxaban and Apixaban Anti-Xa Measurements: Impact of Plasma Storage for 7 Days at Room Temperature. Thrombosis and Haemostasis 2018	40 patients traités par rivaroxaban 13-554 ng/ml	<4h Chromogénique anti-Xa, STA-Liquid anti-Xa Stago ou Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	Tube primaire bouché	TA	48h et 7 jours	Pas de différence significative à 48h. A 7 jours, un seul point en dehors des critères d'acceptabilité (77% pour cible 80-120% de la valeur de base), mais valeur très basse, proche de la limite de quantification (30 ng/ml) Conclusion des auteurs : stable 7 jours à TA (temps maximum étudiés)
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	12 patients traités par rivaroxaban 31-215 ng/ml	<1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory	Plasma décanté, poolé et divisé en 7 aliquots en tube plastique	+4°C TA	0h, 4h, 8h et 24h	A 24h, aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées). D'un point de vue statistique : à +4°C différence significative avec p< 0.05 à 4h et < 0.01 à 8h et 24h ; à TA pas de différence significative à 4h et différence significative avec p< 0.01 à 8h et 24h. Conclusion des auteurs : stable 24h (temps maximum étudié)

c. Stabilité en plasma congelé

Sur une petite série de 5 plasmas issus de patients traités par rivaroxaban, une stabilité d'au moins 30 jours à -20°C (durée maximale étudiée) est rapportée (McGrail et al. 2016). En 2021, Thuile *et al*, rapportent une stabilité d'au moins 90 jours à -20°C (Thuile et al. 2021). A -80°C, les seules données disponibles sont issues d'une seule étude sur 3 plasmas enrichis analysés par LC-MS, rapportant une stabilité de 72 jours (durée maximale étudiée) (Schmitz et al. 2014).

Les études sur plasmas enrichis analysés par LC-MS rapportent l'absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation sur le rivaroxaban (Schmitz et al. 2014; Gous et al. 2014). Cette notion est reprise dans les recommandations de l'ICSH (Gosselin et al. 2018). En 2016, la première étude réalisée sur 5 plasmas de patients analysés par méthode chromogénique anti-Xa ne retrouve également pas d'impact significatif de 3 cycles successifs de congélation/décongélation (McGrail et al. 2016), ce qui est confirmé par l'étude de Thuile de 2021 portant sur 12 plasmas (Thuile et al. 2021).

Pour la mesure de la concentration de rivaroxaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique, **une conservation du plasma citraté jusqu'à 30 jours à une température minimale de -20°C est recommandée**. Une conservation jusqu'à 90 jours à $\leq -20^\circ\text{C}$ et jusqu'à 72 jours à $\leq -80^\circ\text{C}$ est acceptable. Un échantillon peut subir jusqu'à 3 cycles de congélation/décongélation sans impact significatif.

L'absence totale de données au-delà de 90 jours à $\leq -20^\circ\text{C}$ et de 72 jours à $\leq -80^\circ\text{C}$ ne permet pas d'émettre d'autres conclusions même si la durée de conservation est probablement plus longue, en particulier à des températures $\leq -70^\circ\text{C}$.

Tableau 6 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance du rivaroxaban par méthode chromogénique anti-Xa sur plasma congelé

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014	3 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	-80°C	72 jours	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 72 jours à -80°C (temps maximum étudié)
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	5 patients traités par rivaroxaban	1h Chromogénique anti-Xa, Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed	-20°C	30 jours	Pas de différence au bout d'un mois à -20°C (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : stable 1 mois à -20°C (temps maximum étudié)

<p>Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021</p>	<p>12 patients traités par rivaroxaban 31-215 ng/ml</p>	<p><1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory</p>	<p>-20°C</p>	<p>90 jours</p>	<p>Aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées) à 90 jours que ce soit après 1 ou 3 cycles de congélation/décongélation. D'un point de vue statistique : à 30 jours différence significative avec p< 0.01 et p<0.05 à 60 et 90 jours. Conclusion des auteurs : stable 90 jours à -20°C (temps maximum étudié)</p>
<p>Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014</p>	<p>3 plasmas enrichis</p>	<p>Non applicable, plasmas enrichis LC-MS</p>	<p>-20°C</p>	<p>3 cycles congélation/décongélation</p>	<p>Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation</p>
<p>Gous T. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry. Ther Drug Monit 2014</p>	<p>6 plasmas enrichis</p>	<p>Non applicable, plasmas enrichis LC-MS</p>	<p>-20°C</p>	<p>3 cycles congélation/décongélation</p>	<p>Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation</p>
<p>McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016</p>	<p>5 patients traités par rivaroxaban</p>	<p>1h Chromogénique anti-Xa, Biophen Heparin LRT, Hyphen Biomed</p>	<p>-20°C</p>	<p>3 cycles de congélation/décongélation</p>	<p>Pas de différence statistique après 3 cycles de congélation/décongélation Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation.</p>
<p>Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021</p>	<p>12 patients traités par rivaroxaban 31-215 ng/ml</p>	<p><1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory</p>	<p>-20°C</p>	<p>30 jours 1 cycle, 60 jours 2cycles, 90 jours 3 cycles</p>	<p>Aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées) à 90 jours que ce soit après 1 ou 3 cycles de congélation/décongélation. D'un point de vue statistique : à 30 jours différence significative avec p< 0.05, mais pas de différence significative à 60 et 90 jours (p>0.05). Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation</p>

3. Edoxaban (dosage par méthode chromogénique anti-Xa)

Avant 2018, une seule étude, réalisée sur 3 plasmas enrichis analysés par LC-MS, portait sur la stabilité de l'edoxaban (Gous et al. 2014). Aucune étude n'avait été réalisée sur plasmas issus de patients traités par edoxaban et en l'absence de données, le GFHT ne se prononçait pas quant aux délais acceptables pour réaliser un dosage chromogénique anti-Xa d'edoxaban. Depuis, en 2021, est paru un article original étudiant la stabilité en sang total, plasma frais et congelé de l'activité anti-Xa edoxaban dosée par méthode chromogénique dans des échantillons issus de patients traités par edoxaban.

a. Stabilité en sang total

L'ICSH recommande un traitement de l'échantillon dans les 4h après prélèvement, sans que cette pratique soit argumentée par les auteurs (Gosselin et al. 2018), les mises à jour de 2019 et 2021 n'apportent pas d'autre précision sur le versant pré-analytique (Gosselin et al. 2019 ; Douxfils et al. 2021).

La première et unique étude concernant la stabilité de l'edoxaban en sang total est parue en 2021. L'équipe de Thuile (Thuile et al. 2021) a étudié 14 échantillons de patients traités par edoxaban conservés jusqu'à 24h à TA en sang total. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 24h avec comme critère d'acceptabilité une variation <22 % (critère basé sur les performances locales : $2.77 \times CV$ maximum local = 8.0%), et des résultats équivalents en utilisant une variation limite de 15%. D'un point de vue statistique, l'analyse par test apparié montre une différence significative dès 4h ($p < 0.001$), ainsi qu'à 24h mais pas de différence significative à 8h ($p > 0.05$).

Pour la mesure de la concentration d'edoxaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique, en l'absence de données suffisantes, **la SFTH ne fait pas de recommandation pour la conservation du sang total prélevé sur tube primaire citraté et conservé à température ambiante**. Une centrifugation dans les 4 heures qui suivent le prélèvement est acceptable. Le délai d'analyse sera précisé au chapitre 3.b (stabilité en plasma frais).

Tableau 7 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance de l'edoxaban par méthode chromogénique anti-Xa sur sang total

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	Conclusions
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	14 patients traités par edoxaban 33-283 ng/ml	T° ambiante	0h, 4h, 8h et 24h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory	A 24h, aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : $2.77 \times CV$ max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées). D'un point de vue statistique : différence significative avec $p < 0.01$ à 4h et 24h et non significative $p > 0.05$ à 8h. Conclusion des auteurs : stable 24h (temps maximum étudié)

b. Stabilité en plasma frais

Selon une étude de 2014, dédiée à la comparaison de méthodes de dosages, réalisée sur 6 plasmas enrichis, la concentration d'edoxaban (mesurée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)) diminue de 18% après 24h à T° ambiante et de 16% après 14j à 2-8°C

(Gous et al. 2014). Les recommandations de l'ICSH de 2018 reprennent cette étude et préconisent une analyse dans les 8h après prélèvement, et au-delà une conservation réfrigérée pendant 48h maximum (Gosselin et al. 2018).

En 2021, l'équipe de Thuile (Thuile et al. 2021) a étudié 14 échantillons de patients traités par edoxaban, dont le plasma frais a été décanté, aliquoté et conservé jusqu'à 24h à +4°C et à TA. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 24h avec comme critère d'acceptabilité une variation <22% (critère basée sur les performances locales : $2.77 * CV_{\text{maximum local}} = 8.0\%$), et des résultats équivalents en utilisant une variation limite de 15%.

Pour la mesure de la concentration d'edoxaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique, en l'absence de données suffisantes, la SFTH ne fait pas de recommandation pour la conservation du plasma frais issu d'un tube primaire citraté à température ambiante. Une analyse dans les 4 heures qui suivent le prélèvement est acceptable.

Tableau 8 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance de l'edoxaban par méthode chromogénique anti-Xa sur plasma frais

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Conservation du plasma	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
Gous T. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry. Ther Drug Monit 2014	6 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	Non précisé	4°C TA	14 jours	Plasma frais : diminution de 18% après 24h à T° ambiante et de 16% après 14j à 2-8°C. Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : diminution à 24h à TA et 14 jours à +4°C
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	14 patients traités par edoxaban 33-283 ng/ml	<1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory	Plasma décanté, poolé et divisé en 7 aliquots en tube plastique	+4°C TA	0h, 4h, 8h et 24h	A 24h, aucune valeur avec variation >22% (critère de jugement basé sur performances locales : $2.77 * CV_{\text{max}} = 8.0\%$), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées). D'un point de vue statistique : à +4°C différence significative avec $p < 0.05$ à 4h et $p < 0.01$ à 8h et 24h ; à TA différence significative avec $p < 0.01$ à 4h et 24h et $p < 0.05$ à 8h. Conclusion des auteurs : stable 24h (temps maximum étudié)

c. Stabilité en plasma congelé

La seule étude portant sur la durée de stabilité de l'edoxaban en plasma congelé est celle de Thuile *et al* en 2021, qui rapporte une stabilité d'au moins 90 jours à -20°C (Thuile et al. 2021).

Les études sur plasmas enrichis analysés par LC-MS rapportent l'absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation sur l'edoxaban (Gous et al. 2014). Cette notion est reprise dans les recommandations de l'ICSH ((Gosselin et al. 2018) et l'étude de Thuile de 2021 portant sur 14 plasmas confirme cette absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation (Thuile et al. 2021).

Pour la mesure de la concentration d'edoxaban basée sur l'activité anti-Xa chromogénique anti-Xa, en l'absence de données suffisantes, la SFTH ne fait pas de recommandation pour la durée de conservation du plasma issu d'un tube primaire citraté congelé, quelle que soit la température, mais jusqu'à 3 cycles de congélation/décongélation sont possibles. Une conservation jusqu'à 90 jours à $\leq -20^{\circ}\text{C}$ est acceptable.

Tableau 9 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance de l'edoxaban par méthode chromogénique anti-Xa sur plasma congelé

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
<p>Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021</p>	<p>14 patients traités par edoxaban 33-283 ng/ml</p>	<p><1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory</p>	-20°C	90 jours	<p>Aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : $2,77 \cdot \text{CV max}=8.0\%$), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées) à 90 jours que ce soit après 1 ou 3 cycles de congélation/décongélation. D'un point de vue statistique : absence de différence significative à 30, 60 et 90 jours ($p>0.05$). Conclusion des auteurs : stable 90 jours à -20°C (temps maximum étudié)</p>
<p>Gous T. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry. Ther Drug Monit 2014</p>	6 plasmas enrichis	<p>Non applicable, plasmas enrichis LC-MS</p>	-20°C	3 cycles congélation/décongélation	<p>Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable après au moins 3 cycles de congélation/décongélation</p>
<p>Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021</p>	<p>14 patients traités par edoxaban 33-283 ng/ml</p>	<p><1h Chromogénique anti-Xa, HemosIL Liquid anti-Xa, Instrumentation Laboratory</p>	-20°C	30 jours 1 cycle, 60 jours 2 cycles, 90 jours 3 cycles	<p>Aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : $2,77 \cdot \text{CV max}=8.0\%$), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées) à 90 jours que ce soit après 1 ou 3 cycles de congélation/décongélation. D'un point de vue statistique : absence de différence significative à 30, 60 et 90 jours ($p>0.05$). Conclusion des auteurs : stable après au moins 3 cycles de congélation/décongélation</p>

4. Dabigatran (dosage fonctionnel)

a. Stabilité en sang total

L'ICSH recommande un traitement de l'échantillon dans les 4h après prélèvement, sans que cette pratique soit argumentée par les auteurs (Gosselin et al. 2018) et la technique n'est pas précisée. Les mises à jour de 2019 et 2021 n'apportent pas d'autre précision sur le versant pré-analytique (Gosselin et al. 2019 ; Douxfils et al. 2021).

Deux études portent sur la stabilité de la mesure de la concentration de dabigatran par le temps de thrombine dilué. Il n'y a aucune étude publiée pour la mesure par méthode chromogénique à l'écarine. L'unique étude antérieure à 2018 évaluant spécifiquement la stabilité en sang total du dabigatran, dosé par temps de thrombine dilué, sur 5 prélèvements issus de patients traités par dabigatran rapportait une stabilité d'au moins 2h (durée maximale étudiée) à température ambiante (TA) (McGrail et al. 2016).

En 2021, l'équipe de Thuile (Thuile et al. 2021) a étudié 11 échantillons de patients traités par dabigatran conservés jusqu'à 24h à TA en sang total, dosés par temps de thrombine dilué. L'effectif bien que plus important que celui de McGrail décrit ci-dessus reste restreint et l'étendue des valeurs assez limitée avec en particulier aucune valeur en deçà de 62 ng/ml. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 24h avec comme critère d'acceptabilité une variation <22% (critère basé sur les performances locales : $2.77 * CV_{\text{maximum local}} = 8.0\%$), et des résultats équivalents en utilisant une variation limite de 15%. D'un point de vue statistique, l'analyse par test apparié montre une différence significative à 8h ($p < 0.01$) ; mais pas de différence à 4h et 24h ($p > 0.05$).

Pour la mesure de la concentration de dabigatran par le temps de thrombine dilué, en l'absence de données suffisantes, **la SFTH ne fait pas de recommandation pour la conservation du sang total prélevé sur tube primaire citraté et conservé à température ambiante.** Une centrifugation du prélèvement conservé à température ambiante jusqu'à 4 heures est acceptable, au-delà les données sont jugées insuffisantes. Le délai d'analyse sera précisé au chapitre 4.b (stabilité en plasma frais).

Compte tenu de l'absence de données, la SFTH ne se prononce pas sur la stabilité de la mesure par méthode chromogénique à l'écarine et conseille de se référer aux recommandations données par le fournisseur de réactif.

Tableau 10 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance du dabigatran sur sang total

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	Conclusions
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	5 patients traités par dabigatran	20-25°C	0.5h, 1h et 2h. Temps de thrombine dilué, Hemoclot®, Hyphen Biomed	Pas de différence à 2h (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : stable 2h (temps maximum étudié)
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	11 patients traités par dabigatran 62 - 217 ng/ml	T° ambiante	0h, 4h, 8h et 24h Temps de thrombine dilué, HemosIL Direct Thrombin inhibitor Assay, Instrumentation Laboratory	A 24h, aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées). D'un point de vue statistique : pas de différence significative avec p> 0.05 à 4h et 24h et différence significative, p<0.01 à 8h. Conclusion des auteurs : stable 24h (temps maximum étudié)

b. Stabilité en plasma frais

Selon 2 études de 2014, dédiées à la comparaison de méthodes de dosages, réalisées sur 3 et 6 plasmas enrichis, le dabigatran (mesuré par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)) est stable au moins 24h (Schmitz et al. 2014), et jusqu'à 14 jours (Gous et al. 2014), à TA et à +2-8°C.

D'après Stangier *et al*, en 2012, qui ont évalué la stabilité de plasmas enrichis dans le cadre d'une étude du réactif Hemoclot® direct thrombine Inhibitor (Hyphen Biomed), le dabigatran serait stable jusqu'à 24h à TA et +4°C mais les conditions expérimentales ne sont que très vaguement décrites (Stangier and Feuring 2012). En revanche, sur 8 plasmas enrichis dosés par temps de thrombine (STA®-Thrombin et HemosIL®TT), une différence statistiquement significative est retrouvée dès 4h de conservation à TA. La différence n'a pas été analysée du point de vue clinique. Les auteurs préconisent donc de réaliser les tests dans un délai inférieur à 2h à TA ou une conservation jusqu'à 24h à +2-8°C (Lessire et al. 2015). Avant 2018, la seule étude réalisée sur des plasmas de patients traités par dabigatran (n=10) analysés par temps de thrombine dilué rapporte une stabilité de 2h à TA (la durée maximale étudiée était de 8h), et l'absence de stabilité à +2-8°C à 8h (premier temps étudié) (McGrail et al. 2016).

Les recommandations de l'ICSH de 2018 reposent sur l'étude de Lessire et préconisent une analyse dans les 4h après prélèvement en cas de dosage fonctionnel (Gosselin et al. 2018).

En 2021, l'équipe de Thuile (Thuile et al. 2021) a étudié 11 échantillons de patients traités par dabigatran (62 - 217 ng/ml), dont le plasma frais a été décanté, aliquoté et conservé jusqu'à 24h à +4°C et à TA. Les auteurs concluent à une stabilité d'au moins 24h avec comme critère d'acceptabilité une variation < 22 % (critère basé sur les performances locales : 2.77*CV maximum local = 8.0%), et des résultats équivalents en utilisant une variation limite de 15%.

Il n'y a aucune étude publiée pour la mesure par méthode chromogénique à l'écarine.

Pour la mesure de la concentration de dabigatran par le temps de thrombine diluée, la SFTH recommande que le plasma issu d'un tube primaire citraté centrifugé et conservé à température ambiante ou réfrigérée soit analysé dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Une analyse du prélèvement conservé à température ambiante ou à température réfrigérée jusqu'à 4 heures est acceptable, au-delà les données sont jugées insuffisantes ou discordantes.

Compte tenu de l'absence de données, la SFTH ne se prononce pas sur la stabilité de la mesure par méthode chromogénique à l'écarine et conseille de se référer aux recommandations données par le fournisseur de réactif.

Tableau 11 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance du dabigatran sur plasma frais

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Conservation du plasma	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
Stangier J. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2012	? Plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis Temps de thrombine diluée, Hemoclot®, Hyphen Biomed	Non précisé	4°C TA	24h	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 24h à +4°C et à TA (temps maximum étudié)
Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014	3 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	Non précisé	4°C TA	24h	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 24h à +4°C et à TA (temps maximum étudié)
Gous T. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry. Ther Drug Monit 2014	6 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	Non précisé	4°C TA	14 jours	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 14 jours à +4°C et à TA (temps maximum étudié)

<p>Lessire S. Is Thrombin Time useful for the assessment of dabigatran concentrations? An in vitro and ex vivo study. Thrombosis Research 2015</p>	<p>8 plasmas enrichis (1 par condition expérimentale)</p>	<p>Non applicable, plasmas enrichis Temps de thrombine (STA® Thrombin et HemosIL® TT)</p>	<p>Non précisé</p>	<p>4°C TA</p>	<p>0h, 2h, 4h et 24h</p>	<p>Allongement statiquement significatif du TT à partir de 4h à TA et à 24h à +4°C avec le réactif Stago. Avec le réactif IL, variation à partir de 24h à TA (pas d'analyse entre 4h et 24h). Pas d'analyse de l'impact clinique. Conclusion des auteurs : mesurer le TT dans les 2h après le prélèvement ou conserver rapidement à 4°C</p>
<p>McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016</p>	<p>10 patients traités par dabigatran</p>	<p>1h Temps de thrombine dilué, Hemoclot®, Hyphen Biomed</p>	<p>Plasma décanté et divisé en 9 aliquots</p>	<p>5°C 20-25°C</p>	<p>0h, 8h, 24h et 48h 0h, 2h, 4h, 6h et 8h</p>	<p>Variation dès 8 h à +5°C (premier temps étudié) et à partir de 4h à TA (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : non stable à 5°C à 8h (premier temps étudié) et stable jusqu'à 2h à TA</p>
<p>Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021</p>	<p>11 patients traités par dabigatran 62 - 217 ng/ml</p>	<p><1h Temps de thrombine dilué, HemosIL Direct Thrombin inhibitor Assay, Instrumentation Laboratory</p>	<p>Plasma décanté, poolé et divisé en 7 aliquots en tube plastique</p>	<p>+4°C TA</p>	<p>0h, 4h, 8h et 24h</p>	<p>A 24h, aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées). D'un point de vue statistique : à +4°C différence significative avec p< 0.01 à 8h, pas de différence à 4h et 24h (p>0.05); à TA différence significative avec p< 0.05 à 4h, p< 0.001 à 8h, pas de différence à 24h (p>0.05). Conclusion des auteurs : stable 24h (temps maximum étudié)</p>

c. Stabilité en plasma congelé

Sur une série de 5 plasmas issus de patients traités par dabigatran, une stabilité d'au moins 30 jours à -20°C (durée maximale étudiée) est rapportée (McGrail et al. 2016). En 2021, Thuile *et al*, rapportent une stabilité d'au moins 90 jours à -20°C (Thuile et al. 2021).

A -80°C, les seules données disponibles sont issues d'une seule étude sur 3 plasmas enrichis analysés par LC-MS, rapportant une stabilité de 72 jours (Schmitz et al. 2014).

Les études sur plasmas enrichis analysés par temps de thrombine dilué (Stangier and Feuring 2012) ou LC-MS (Schmitz et al. 2014 ; Gous et al. 2014) rapportent l'absence d'impact de 3 cycles de congélation/décongélation sur le dabigatran. Cette notion est reprise dans les recommandations de l'ICSH (Gosselin et al. 2018). En 2016, la première étude (McGrail et al. 2016) réalisée sur 5 plasmas de patients analysés par méthode fonctionnelle montre une variation dès le premier cycle de congélation ce qui n'est pas confirmé par l'étude de Thuile de 2021 portant sur 11 plasmas (Thuile et al. 2021).

Il n'y a aucune étude publiée pour la mesure par méthode chromogénique à l'écarine.

Pour la mesure de la concentration de dabigatran par le temps de thrombine dilué, **une conservation du plasma citraté jusqu'à 30 jours à une température minimale de -20°C est recommandé et un cycle unique de congélation/décongélation est recommandé.** Une conservation jusqu'à 90 jours à $\leq -20^\circ\text{C}$ et jusqu'à 72 jours à $\leq -80^\circ\text{C}$ est acceptable ainsi que la réalisation de 3 cycles de congélation/décongélation.

L'absence totale de données au-delà de 90 jours à $\leq -20^\circ\text{C}$ et de 72 jours à $\leq -80^\circ\text{C}$ ne permet pas d'émettre d'autres conclusions même si la durée de conservation est probablement plus longue, en particulier à des températures $\leq -70^\circ\text{C}$.

Compte tenu de l'absence de données, la SFTH ne se prononce pas sur la stabilité de la mesure par méthode chromogénique à l'écarine et conseille de se référer aux recommandations données par le fournisseur de réactif.

Tableau 12 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance du dabigatran sur plasma congelé

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Délai avant centrifugation Réactif	Température de conservation du plasma	Durée de conservation plasma	Conclusions
Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014	3 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	-80°C	72 jours	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable 72 jours à -80°C (temps maximum étudié)
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	5 patients traités par dabigatran	1h Temps de thrombine dilué,	-20°C	30 jours	Pas de différence au bout d'un mois à -20°C (critère : 80-120% de la valeur basale) Conclusion des auteurs : stable 1 mois à -20°C (temps maximum étudié).

		Hemoclot®, Hyphen Biomed			
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	11 patients traités par dabigatran 62 - 217 ng/ml	<1h Temps de thrombine dilué, HemosIL Direct Thrombin inhibitor Assay, Instrumentation Laboratory	-20°C	90 jours	Aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées) à 90 jours que ce soit après 1 ou 3 cycles de congélation/décongélation. Conclusion des auteurs : stable 90 jours à -20°C (temps maximum étudié)
Stangier J. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2012	? Plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis Temps de thrombine dilué, Hemoclot®, Hyphen Biomed	Non précisée	4 cycles congélation/décongélation	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable après 4 cycles de congélation/décongélation
Schmitz EMH. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014	3 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	-20°C	3 cycles congélation/décongélation	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation
Gous T. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry. Ther Drug Monit 2014	6 plasmas enrichis	Non applicable, plasmas enrichis LC-MS	-20°C	3 cycles congélation/décongélation	Critères d'acceptation non décrits. Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation
McGrail R. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. Thrombosis Research. 2016	5 patients traités par dabigatran	1h Temps de thrombine dilué, Hemoclot®, Hyphen Biomed	-20°C	3 cycles de congélation/décongélation	Différence statistique dès le premier cycle de congélation/décongélation. Conclusion des auteurs : pas de recongélation.
Thuile K. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. 2021	11 patients traités par dabigatran 62 - 217 ng/ml	<1h Temps de thrombine dilué, HemosIL Direct Thrombin inhibitor Assay, Instrumentation Laboratory	-20°C	30 jours 1 cycle, 60 jours 2cycles, 90 jours 3 cycles	Aucune valeur avec variation > 22% (critère de jugement basé sur performances locales : 2,77*CV max=8.0%), MAIS si utilisation 15% : conforme pour toutes les valeurs aussi (valeurs non publiées) à 90 jours que ce soit après 1 ou 3 cycles de congélation/décongélation. D'un point de vue statistique : pas de différence significative à 30, 60 et 90 jours (p>0.05). Conclusion des auteurs : stable après 3 cycles de congélation/décongélation

III. Argatroban (dosage fonctionnel)

Une seule étude s'intéresse à la stabilité de l'argatroban dans des échantillons sanguins et concerne le sang total, il n'y a pas d'étude sur les plasmas frais et congelés.

a. Stabilité en sang total

Guy et Kitchen montrent après 24h de conservation du sang total à TA de patients traités par argatroban (4 patients, 40 aliquots), l'absence de modification cliniquement significative. Trois points sur les 40 dépassent le critère de variation (+/- 0.10µg/ml) sans que cela ne modifie la prise en charge clinique (Guy et al. 2018).

Pour la mesure de la concentration d'argatroban par le temps de thrombine dilué, en l'absence de données suffisantes, **la SFTH ne fait pas de recommandation pour la conservation du sang total prélevé sur tube primaire citraté conservé à température ambiante.** Une centrifugation du prélèvement conservé à température ambiante jusqu'à 24 heures est acceptable.

Tableau 13 : Résumé des études de stabilité pour la surveillance de l'argatroban sur sang total

Publications	Nombre échantillons ou Nombre patients	Température de conservation sang total	Délai avant centrifugation Réactif	Conclusions
Guy S. Argatroban is stable in citrated whole blood for 24 hours. Int J Lab Hem 2018	40 aliquots issus de 4 patients traités par argatroban 0,16-1,76 µg/ml	21,5 – 23.5°C	0h et 24h Temps de thrombine dilué, Hemoclot®, Hyphen Biomed	A 24h, modifications statistiques mais pas de modification cliniquement relevante : 3 points avec variation > 0,10 mais pas de modification de la prise en charge Conclusion des auteurs : stable 24h à TA (temps maximum étudié)

b. Stabilité en plasma frais et en plasma congelé

En l'absence de données, la SFTH ne se prononce pas quant aux délais acceptables pour réaliser la mesure de la concentration d'argatroban par le temps de thrombine dilué sur plasmas citratés frais et congelés.

IV. Danaparoïde sodique et fondaparinux sodique

Il n'y a aucune étude publiée décrivant la stabilité d'échantillon sanguin contenant du danaparoïde sodique ou du fondaparinux sodique.

En l'absence de données, la SFTH ne se prononce pas quant aux délais acceptables pour réaliser la mesure de la concentration de danaparoïde sodique ou de fondaparinux sodique basée sur l'activité anti-Xa chromogénique.

Références

- Boissier E, Genebrier S, Lakhal K, Nedelec-Gac F, Trossaërt M, Ternisien C, et al. Rivaroxaban and Apixaban Anti-Xa Measurements: Impact of Plasma Storage for 7 Days at Room Temperature. *Thrombosis and Haemostasis*. 2018 Aug;118(08):1488–90.
- Douxfils J, Adcock DM, Bates SM, Favalaro EJ, Gouin-Thibault I, Guillermo C, et al. 2021 Update of the International Council for Standardization in Haematology Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thrombosis and Haemostasis*. 2021 Aug;121(08):1008–20.
- Gosselin R, Adcock D, Bates S, Douxfils J, Favalaro E, Gouin-Thibault I, et al. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost*. 2018 Mar;118(03):437–50.
- Gosselin RC, Adcock DM, Douxfils J. An update on laboratory assessment for direct oral anticoagulants (DOACs). *International Journal of Laboratory Hematology*. 2019;41(S1):33–9.
- Gous T, Couchman L, Patel JP, Paradzai C, Arya R, Flanagan RJ. Measurement of the Direct Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in Human Plasma Using Turbulent Flow Liquid Chromatography With High-Resolution Mass Spectrometry: Therapeutic Drug Monitoring. 2014 Oct;36(5):597–605.
- Guy S, Kitchen S, Van Veen JJ. Argatroban is stable in citrated whole blood for 24 hours. *Int J Lab Hem*. 2018 Aug;40(4):484–7.
- Lessire S, Douxfils J, Baudar J, Bailly N, Dincq AS, Gourdin M, et al. Is Thrombin Time useful for the assessment of dabigatran concentrations? An in vitro and ex vivo study. *Thrombosis Research*. 2015 Sep;136(3):693–6.
- McGrail R, Revsholm J, Nissen PH, Grove EL, Hvas AM. Stability of direct oral anticoagulants in whole blood and plasma from patients in steady state treatment. *Thrombosis Research*. 2016 Dec;148:107–10.
- Raynor A, Lunte K, Gaaloul M, Caillault A, Zouiti F, Desconclois C, et al. Stability of Rivaroxaban and Apixaban Anti-Xa Activities in Whole Blood Samples: A French Bicentric Study. *Thromb Haemost*. 2023 Feb 15;s-0043-1763254.
- Schmitz EMH, Boonen K, van den Heuvel DJA, van Dongen JLJ, Schellings MWM, Emmen JMA, et al. Determination of dabigatran, rivaroxaban and apixaban by ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and coagulation assays for therapy monitoring of novel direct oral anticoagulants. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014 Oct;12(10):1636–46.
- Stangier J, Feuring M. Using the HEMOCLOT direct thrombin inhibitor assay to determine plasma concentrations of dabigatran. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2012 Mar;23(2):138–43.
- Thuile K, Giacomuzzi K, Jani E, Marschang P, Mueller T. Evaluation of the in vitro stability of direct oral anticoagulants in blood samples under different storage conditions. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2021 Oct 1;81(6):461–8.