



Recommandations pré-analytiques en hémostase

La centrifugation

octobre 2015

Rédaction : Elodie Boissier

Vérification : Marie Françoise Hurtaud-Roux, Claire Flaujac, Bénédicte Delahousse

Approbation : Groupe de travail GEHT

1. Vitesse et durée

Centrifugation standard

Selon le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) H21-A5 et Le *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH), les tests d'hémostase doivent être réalisés sur un **Plasma Pauvre en Plaquettes (PPP)** obtenu par centrifugation du prélèvement sanguin, et **contenant un nombre de plaquettes résiduelles inférieur à 10 G/L** [1, 2].

Ce seuil est particulièrement critique pour la recherche des anticoagulants circulants de type lupique (LA) [3-5] et pour la surveillance des traitements par héparine non fractionnée lorsque les échantillons sont prélevés sur tubes citratés et non sur tubes CTAD (citrate théophylline adénosine dipyridamole) [6]. De même, **lors de la congélation des plasmas** pour réalisation différée des examens, **un nombre de plaquettes résiduelles inférieur à 10 G/L est incontournable** [7] (recherche de résistance à la protéine C activée [8] ou dosage de l'activité de la protéine S activité [9] en particulier). En effet, le cycle congélation/décongélation induit la lyse des plaquettes résiduelles, ce qui perturbe le dosage de certains paramètres, notamment lorsqu'il existe un pool intraplaquettaire significatif de l'analyte à tester. Des phospholipides peuvent aussi être libérés à partir de la membrane plaquettaire lysée et masquer la présence de LA, générant des résultats faussement négatifs.

En revanche, **les tests globaux Temps de Quick (TQ) et Temps de Céphaline avec Activateur (TCA) ne semblent pas affectés par un nombre de plaquettes résiduelles supérieur à 10 G/L, lorsqu'ils sont effectués sur plasma frais [7, 9-11]**. Cependant, les recommandations du CLSI autorisant la réalisation du TQ et du TCA sur des plasmas contenant un nombre de plaquettes résiduelles jusqu'à 200 G/L ne reposent que sur un seul article [10]. Les autres publications n'ont évalué l'effet des plaquettes résiduelles que jusqu'à 79 G/L pour Barnes *et al* [11], 117 G/L pour Suchsland *et al* [9] et 127 G/L pour Lippi *et al* [12].

En conclusion, le CLSI préconise une centrifugation à **1500g pendant au moins 15 min [1]** et Le *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH) recommande une centrifugation à **2000g pendant au moins 10 min [2]**.

Centrifugation rapide

Afin de répondre à l'urgence, le CLSI précise que pour les paramètres d'hémostase générale réalisés sur plasma frais, la durée de centrifugation peut être raccourcie (moins de 10 min) et que des vitesses plus élevées (supérieur à 1500g) peuvent être utilisées. En effet, plusieurs études déjà

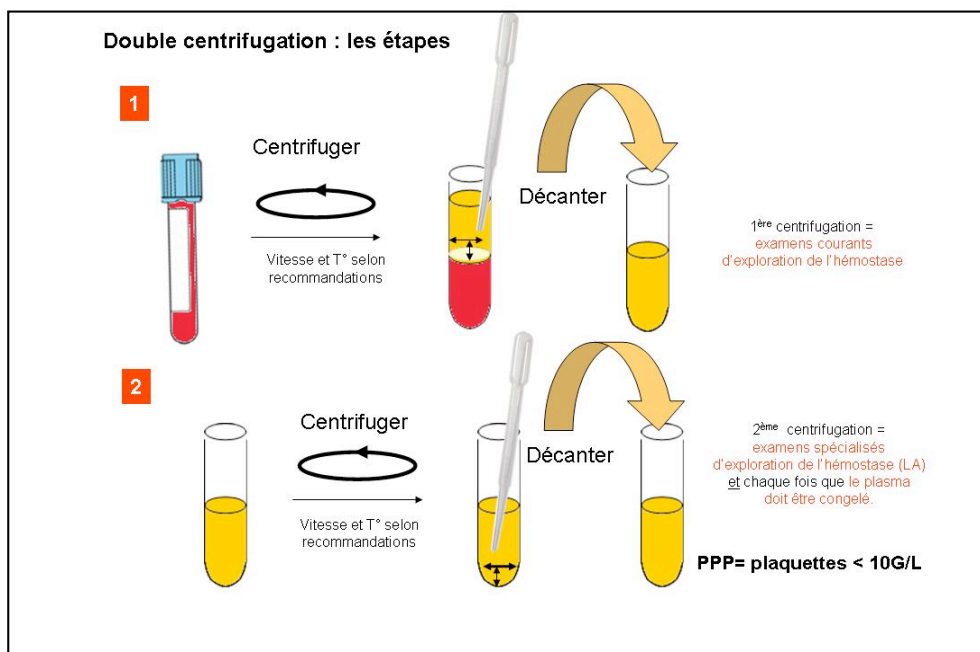
anciennes [13, 14] ont démontré l'absence d'impact d'une centrifugation courte (2 min) à vitesse très élevée (11000g, nécessitant une ultracentrifugeuse) sur les résultats des TQ, TCA, fibrinogène et DDimères.

L'absence d'impact sur les examens d'hémostase générale a été confirmée par d'autres travaux, mais à des vitesses plus réduites (2 min à 4440g, 5 min à 3000g et 5 min à 3280g), compatibles avec la majorité des centrifugeuses généralement utilisées dans les laboratoires d'hémostase [9, 15, 16].

Sauf validation interne, aucun test complémentaire ne pourra être réalisé sur ces échantillons, qui ne devront pas être congelés. En effet, Lippi *et al* ont montré que les taux de facteurs VIII et IX étaient significativement plus élevés sur plasma congelé après centrifugation à 3000g *versus* 1500g pendant 15 min, en raison d'une possible activation plaquettaire et d'une lyse des érythrocytes [17].

Double centrifugation

La double centrifugation est la méthode privilégiée pour obtenir un nombre résiduel de plaquettes inférieur à 10 G/L (indispensable pour la recherche de LA [3-5], pour la recherche de résistance à la protéine C activée [8] ou le dosage de l'activité de la protéine S [9] et pour la congélation des plasmas). Après une première centrifugation en conditions standard, le plasma est prélevé avec une pipette plastique, sans aspirer la couche leuco-plaquettaire située à la surface du culot globulaire (laisser au moins 1 cm de plasma au-dessus du culot globulaire). Il est ensuite transféré dans un tube plastique inerte et re-centrifugé selon les conditions standards. Le plasma est alors à nouveau transféré avec précaution dans un autre tube, sans prélever les plaquettes résiduelles du fond du tube. Que ce soit pour la première ou pour la seconde centrifugation, une durée inférieure à 10 min à vitesse élevée (supérieure à 2500 g) est fortement déconseillée [1, 2, 5] du fait d'une possible génération de microparticules. Les dernières recommandations de *'International Society of Thrombosis and Haemostasis* concernant le dépistage des LA préconisent une première centrifugation à 2000g pendant 15 min puis une seconde centrifugation à 2500g pendant 10 min [3]. Le CLSI recommande une double centrifugation à 1500g pendant 15 minutes [5].



Il est à noter qu'un nombre de plaquettes résiduelles inférieur à 10 G/L peut être obtenu après centrifugation standard : le laboratoire devra valider son protocole interne de centrifugation et vérifier l'obtention systématique d'un PPP conforme (voir paragraphe *surveillance des centrifugeuses*).

Synthèse

Les conditions recommandées pour une centrifugation standard sont :

- une vitesse **de 1500 à 2000 g pendant au moins 15 min.**

ou

- une vitesse **de 2000 à 2500g pendant au moins 10 min.**

Les conditions recommandées pour une centrifugation rapide (limitée aux paramètres TQ, TCA, fibrinogène et DDimères) sont :

- une vitesse **≥ 3000g pendant au moins 5 min**

ou

- une vitesse **= ≥ 4440g pendant au moins 2 min.**

La double centrifugation (deux centrifugations standards successives avec décantation) est la méthode recommandée pour obtenir un PPP conforme (nombre de plaquettes résiduelles inférieur à 10 G/L) pour la recherche des anticoagulants circulants de type lupique, et plus généralement avant congélation des échantillons.

2. Température

Pour un nombre restreint de paramètres d'hémostase (TQ, INR, TCA, fibrinogène et DDimères) l'influence de la température de centrifugation sur les résultats n'a pas été démontrée. Ainsi, Van Geest-Daalderop *et al* n'ont pas noté de différence sur l'INR entre des tubes centrifugés à 20°C ou dans une centrifugeuse non réfrigérée (n=21) [18]. De même, Lippi *et al* n'ont pas retrouvé d'influence de la température de centrifugation (4°C *versus* 12°C *versus* 21°C) sur les paramètres d'hémostase générale (TQ, TCA, fibrinogène, DDimères) [19].

La majorité des auteurs préconisent le maintien d'une température ambiante lors de la centrifugation : 18-25°C pour le CLSI et le BCSH [1, 2] et 15-22°C pour Adcock Funk *et al* [6]. Selon les centrifugeuses, il est possible que des cycles rapprochés de centrifugation induisent une augmentation significative de la température. Ainsi, en cas de cadence élevée, l'utilisation de centrifugeuses réfrigérées est recommandée de façon à maintenir une température à 15 – 25°C. Dans le cas contraire (fonctionnement au coup par coup) les centrifugeuses sans système de refroidissement peuvent être utilisées, sous réserve de vérifier que la température ne s'élève pas au-delà de 25°C au cours de l'utilisation. Pour la vérification métrologique et le contrôle de cette donnée il est conseillé de se référer au document du COFRAC « Recommandations concernant la surveillance des centrifugeuses » [20].

Les températures inférieures à 15°C sont formellement déconseillées, le froid induisant l'activation des plaquettes et de certains facteurs de la coagulation, notamment les facteurs VII, VIII et de Willebrand [6, 11].

Synthèse

La centrifugation doit être effectuée à 15-25 °C, dans une centrifugeuse réfrigérée.

3. Rotor

Selon le CLSI, un rotor à godets mobiles doit être utilisé pour minimiser la contamination du plasma par les plaquettes ou les autres cellules sanguines, en particulier si un échantillon de plasma doit être prélevé pour les dosages ou pour congélation [1]. En cas d'utilisation de rotor fixe, l'absence de contamination par les plaquettes ou les autres cellules sanguines doit être vérifiée.

Synthèse

Il est préconisé d'utiliser un rotor à godets mobiles.

Un rotor angulaire à angle fixe est toléré, sous réserve de vérifier l'absence de contamination du plasma par les cellules sanguines.

4. Frein

Le CLSI ne mentionne pas de problématique lié à la présence ou non du frein. D'autres auteurs préconisent l'absence de frein en fin de centrifugation [6].

A notre connaissance, une seule étude a comparé l'impact du freinage en fin de centrifugation *versus* absence de frein (n=50) [21] et a mis en évidence un impact uniquement sur le fibrinogène : biais moyen 8.6 % (biais maximum acceptable selon les spécifications analytiques : 4.8 %).

Mais l'absence de frein engendre un allongement notable (5-10 min) de l'arrêt de la centrifugeuse et donc du délai de rendu de résultats. Il est donc difficile de s'en passer dans les laboratoires gérant des urgences. Cette possible source de biais doit être connue et prise en compte, par exemple, dans l'interprétation de bilans d'un même patient réalisés dans des laboratoires différents.

Synthèse

Il est préconisé de désactiver le frein ou de l'utiliser à faible puissance.

5. Autres techniques permettant l'obtention de PPP

L'obtention de PPP par filtration du sang total avec un filtre de 0.2 µm doit être abandonnée : en effet, les facteurs V, VIII, IX, XII et le facteur de Willebrand sont sélectivement retenus par ce filtre, engendrant un allongement du TCA et du TQ [6, 22]. Cette technique, comme l'ultracentrifugation,

ne doit pas être utilisée pour remplacer la seconde centrifugation dans le cadre d'une double centrifugation [4, 5].

Synthèse

L'obtention de PPP par filtration doit être abandonnée.

6. Hétérogénéité du plasma après centrifugation

Lippi *et al* ont alerté sur une possible hétérogénéité du plasma après centrifugation : le TQ était significativement plus court et le fibrinogène significativement plus élevé dans la partie basse du plasma surnageant (n=34) [23]. Aucune variation n'était observée pour le TCA. Cependant, les biais observés sont compris dans les limites des biais acceptables selon les spécifications analytiques, et n'ont aucune répercussion clinique. Il semble donc raisonnable de ne pas tenir compte de cette variation mineure au quotidien.

7. Chaînes automatisées

La mutualisation des secteurs préanalytiques aboutit souvent à l'automatisation des processus de tri, centrifugation et aliquotage des tubes primaires. Concernant la centrifugation, les contraintes à respecter sont celles évoquées dans les paragraphes précédents.

Une étude suggère un possible impact du transport des tubes au sein de la chaîne automatisée sur le taux résiduel de plaquettes, mais sans répercussion clinique [24]. Flamant *et al* ne retrouvent pas de différence significative sur le taux de plaquettes résiduel lorsque les tubes sont pris en charge sur une chaîne automatisée par rapport à leurs pratiques habituelles de travail [25]. Enfin, certaines chaînes automatisées ont des protocoles de centrifugation permettant d'obtenir des taux de plaquettes résiduelles <10 G/L dès la première centrifugation, et de ce fait une bonne corrélation est retrouvée par rapport aux automates en îlots pour TQ, TCA, fibrinogène et D-dimères [26].

8. Surveillance des centrifugeuses

Une surveillance métrologique des centrifugeuses est recommandée. Elle est réalisée soit directement par le laboratoire, soit par un prestataire (fournisseur de centrifugeuse, prestataire de métrologie, ...) selon une procédure adaptée aux besoins du laboratoire et au matériel utilisé [20].

Tout protocole de centrifugation sera contrôlé annuellement ou après tout changement de centrifugeuse [20] : pour l'hémostase spécialisée, un nombre de plaquettes résiduelles <10 G/L devra être obtenu sur un minimum de 6 PPP consécutifs analysés. Le contrôle des plaquettes résiduelles sera effectué à l'aide d'une méthodologie appropriée au décompte des taux bas de plaquettes.

Le tableau de synthèse de la bibliographie est disponible :

http://site.geht.org/UserFiles/file/synthese_publis_Centrifugation.pdf

Le tableau de synthèse des recommandations pré-analytique est disponible :

http://site.geht.org/UserFiles/file/tableau_synthese_GEHT2015.pdf

Bibliographie

1. Adcock Funk, D.M., et al., *Collection, transport and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline*, in *CLSI document H21-A5*, P.A. Wayne and C.L.S. Institute, Editors. 2008.
2. Mackie, I., et al., *Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis*. *Int J Lab Hematol*, 2012. **35**(1): p. 1-13.
3. Pengo, V., et al., *Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(10): p. 1737-40.
4. Moore, G.W., *Commonalities and contrasts in recent guidelines for lupus anticoagulant detection*. *Int J Lab Hematol*, 2014. **36**(3): p. 364-73.
5. Ledford-Kraemer, M.R., et al., *Laboratory testing for the lupus anticoagulant; Approved guideline - first edition*, in *CLSI document H60-A*, P.A. Wayne and C.L.S. Institute, Editors. 2014.
6. Adcock Funk, D.M., G. Lippi, and E.J. Favaloro, *Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing*. *Semin Thromb Hemost*, 2012. **38**(6): p. 576-85.
7. Brien, W.F., et al., *Lupus anticoagulant testing: effect of the platelet count on the activated partial thromboplastin time*. *Br J Biomed Sci*, 1993. **50**(2): p. 114-6.
8. Tripodi, A., et al., *Standardization of activated protein C resistance testing: effect of residual platelets in frozen plasmas assessed by commercial and home-made methods*. *Br J Haematol*, 2003. **120**(5): p. 825-8.
9. Suchsland, J., et al., *Optimizing centrifugation of coagulation samples in laboratory automation*. *Clin Chem Lab Med*, 2014. **52**(8): p. 1187-91.
10. Carroll, W.E., et al., *The significance of platelet counts in coagulation studies*. *J Med*, 2001. **32**(1-2): p. 83-96.
11. Barnes, P.W., C.S. Eby, and M. Lukoszyk, *Residual platelet counts in plasma prepared for routine coagulation testing with the Beckman Coulter Power processor*. *Laboratory Hematology*, 2002. **8**: p. 205-9.
12. Lippi, G., et al., *Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007. **18**(5): p. 525-8.
13. Nelson, S., A. Pritt, and R.A. Marlar, *Rapid preparation of plasma for 'Stat' coagulation testing*. *Arch Pathol Lab Med*, 1994. **118**(2): p. 175-6.
14. Pappas, A.A., et al., *Rapid preparation of plasma for coagulation testing*. *Arch Pathol Lab Med*, 1991. **115**(8): p. 816-7.
15. Boudaoud, L., et al., *[Rapid centrifugation for routine coagulation testing]*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2006. **64**(4): p. 315-7.
16. Sultan, A., *Five-minute preparation of platelet-poor plasma for routine coagulation testing*. *East Mediterr Health J*, 2010. **16**(2): p. 233-6.
17. Lippi, G., et al., *Influence of residual platelet count on routine coagulation, factor VIII, and factor IX testing in postfreeze-thaw samples*. *Semin Thromb Hemost*, 2013. **39**(7): p. 834-9.
18. van Geest-Daelderop, J.H., et al., *Preanalytical variables and off-site blood collection: influences on the results of the prothrombin time/international normalized ratio test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy*. *Clin Chem*, 2005. **51**(3): p. 561-8.

19. Lippi, G., et al., *Influence of centrifuge temperature on routine coagulation testing*. Clin Chem, 2006. **52**(3): p. 537-8.
20. Cofrac, *Recommandations concernant la surveillance des centrifugeuses*. 2014.
21. Daves, M., et al., *Influence of centrifuge brake on residual platelet count and routine coagulation tests in citrated plasma*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2014. **25**(3): p. 292-5.
22. Favaloro, E.J., *Preanalytical variables in coagulation testing*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2007. **18**(1): p. 86-9.
23. Lippi, G., et al., *Dishomogeneous separation of citrated plasma in primary collection tubes for routine coagulation testing*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2008. **19**(4): p. 330-2.
24. Da Rin, G. and G. Lippi, *Total Laboratory Automation of Routine Hemostasis Testing*. J Lab Autom, 2014. **19**(4): p. 419-422.
25. Flamant, F., et al., *[Comparison between the centrifugation on MPA C10 (Roche Diagnostics) and the centrifugation according recommendations of GEHT (Groupe d'etude de l'hemostase et de la thrombose) for the daily hemostasis assays]*. Ann Biol Clin (Paris), 2014. **72**(2): p. 231-5.
26. Sedille-Mostafaie, N., et al., *Advancing haemostasis automation--successful implementation of robotic centrifugation and sample processing in a tertiary service hospital*. Clin Chem Lab Med, 2013. **51**(6): p. 1273-8.