

Compte rendu de la 4^{ème} journée du Club des biologistes en hémostase

Cette réunion s'est tenue le 30 Novembre 2012 et a rassemblé 35 biologistes.

Plusieurs thématiques dont les points forts sont rapportés ont été abordées en ateliers.

1. Présentation des résultats de l'étude « dosage » menée chez des patients hémophiles traités par FVIII recombinant ou plasmatisque : Claudine Caron

Cette étude s'inscrit dans la suite de plusieurs travaux multicentriques concernant le dosage du FVIII sous ReFacto, remplacé en septembre 2009 par ReFacto AF. Ce produit thérapeutique comme son prédécesseur, est titré en FVIII par méthode chromogénique, selon les recommandations de la Pharmacopée européenne.

Pour resituer le rationnel des études menées, on peut rappeler qu'en 2002, Mikaelsson M. mesure chez les hémophiles traités par produits recombinants, des taux de FVIII par méthode chromométrique (OSA) 20 à 50% plus bas que ceux obtenus par méthode chromogénique (CSA). Il a été par la suite démontré que ces écarts étaient sous la dépendance du type de standard, plasmatisque ou concentré, utilisé pour le dosage du FVIII -OSA, et que l'utilisation d'un standard ReFacto (RLS) permettait de réduire les écarts CSA-OSA et de suivre les patients traités par une mesure de FVIII-OSA (Ingerslev J. JTH 2004 ;2 :623-8).

Lorsque ReFacto AF remplace ReFacto, un standard ReFacto AF (RLS AF) est proposé pour le dosage du FVIII-OSA. Une étude *in vitro* sur plasmas déficitaires en FVIII surchargés en ReFacto AF (Pouplard C et al, *Haemophilia* 2011 ; 17: e958 – e962) a confirmé une différence de l'ordre de 30% entre OSA et CSA (CSA>OSA), cet écart étant réduit d'un facteur 3 lorsque le standard RLS AF est utilisé dans la méthode OSA.

Une étude multicentrique « patients » a ensuite été initiée afin d'évaluer si l'utilisation du RLS AF minimise également l'écart OSA-CSA chez les patients traités par ReFacto AF, et d'apprécier les différences OSA-CSA chez les patients traités par d'autres concentrés FVIII recombinants (Advate, Kogenate/Helixate) ou plasmatisque (Factane). Avec un standard plasmatisque, le taux de FVIII-OSA est plus faible que le taux de FVIII-CSA pour tous les produits (en moyenne 11% pour Factane, 12% pour Advate, 19% pour Kogenate/Helixate, 27% pour ReFacto AF) ; la différence OSA-CSA se réduit à 10% lorsque RLS AF est utilisé comme standard, et devient donc équivalent voire inférieur aux écarts observés avec les autres concentrés de FVIII.

2. Diagnostic biologique d'un déficit en facteur XIII : Céline Desconclois, Claire Pouplard et Catherine Ternisien

2.1 Photographie des pratiques à partir du questionnaire adressé à 37 laboratoires d'hémostase

Avant la 4^{ème} réunion du club des Biologistes, un questionnaire sur les pratiques du dosage en FXIII a été envoyé à chaque participant et nous avons reçu 30 questionnaires complétés dont les réponses sont synthétisées ci dessous :

➤ **Le nombre de demandes** de dosage de FXIII est très variable d'un CHU à l'autre :

- moins de 20 demandes par an : 14 laboratoires dont 8 délocalisent cet examen vers un autre site : laboratoire de CHU ou privé dans 2 cas (Biomnis, Cerba).
- 30 à 40 demandes par an: 3 laboratoires
- 60 à 80 demandes par an : 8 laboratoires
- > 100 demandes par an: 5 laboratoires, avec pour Marseille 250 demandes/an.

➤ **La technique** la plus utilisée est celle commercialisée par « Siemens –réactif Berichrom » (14/23 laboratoires). Le dosage semi-quantitatif développé par Stago est utilisé par 6 laboratoires. 1 laboratoire utilise la technique Elisa Affinity Biological, commercialisée par Kordia et 2 laboratoires réalisent l'étude de la stabilité du caillot avec l'acide chloracétique.

- La borne inférieure du taux de FXIII varie de 50 à 80% selon les laboratoires et la limite supérieure varie de 100 à 170%. Un contrôle de qualité externe (ECAT) est réalisé par 12/21 laboratoires, 10 d'entre eux réalisent la technique « Siemens-réactif Berichrom ». Les z scores de ces laboratoires varient de 1,5 à 2.

- Il n'existe pas de groupe de pairs suffisant pour les Centres qui réalisent la technique Stago.

- Le laboratoire qui utilise la technique développée par Affinity Biological a eu lors du dernier exercice un z score à 0,32.

➤ **Les pratiques :**

- Le dosage de FXIII est réalisé en urgence aux heures ouvrables dans près de 50% des centres, mais les demandes sont très régulées par les Biologistes.

- Les principales circonstances cliniques conduisant à une prescription de dosage de FXIII sont les suivantes :

- symptomatologie hémorragique non expliquée après exploration de l'hémostase par nos tests usuels,
- saignements du nouveau-né non expliqués, hématomes sous-duraux, saignements à la chute du cordon,
- retard de cicatrisation,
- Suspicion de maltraitance,
- hémorragie du système nerveux central,
- purpura rhumatoïde de l'enfant,
- retard de chute du cordon,
- polyarthrite rhumatoïde,
- saignement retardé,
- avortements à répétition,
- syndrome néphrotique.

Cette liste de circonstances est purement factuelle et ne correspond nullement à des recommandations vis-à-vis des indications justifiant un dosage.

➤ **Le nombre de déficit en FXIII diagnostiqué en 2011 et 2012** : Il est très variable d'un centre à l'autre. En effet sur 21 sites, qui totalisent 466 demandes aucun déficit en FXIII n'a été dépisté. Seulement 6 Centres ont diagnostiqué un "déficit" en FXIII mais le taux de FXIII mesuré n'est pas spécifié.

Un Centre rapporte pour 70 demandes, un déficit en FXIII dans 14 cas (20%). Sur les autres sites la fréquence de diagnostic d'un déficit varie de 0,8% à 10% sur un an.

Au vu de ces résultats, il existe de toute évidence une « variation » quant à la notion de déficit en FXIII.

2.2 Le Facteur XIII

Le Facteur XIII est une protéine à la fois circulante et cellulaire. C'est une β globuline de PM de 320 kDa. Sa concentration plasmatique est estimée entre 14 à 28 mg/l. Sa demie- vie est longue de 5 à 6 jours. Il circule dans le plasma sous forme d'un tétramère constitué de deux sous unités A et de deux sous unités B assemblées de façon non covalente (FXIII-A₂B₂). La sous unité A, de PM de 83 kDa, est codée par un gène situé sur le chromosome 6. Elle est synthétisée par le foie, les monocytes et les mégacaryocytes. Elle porte le site actif transglutaminase constitué par un groupement cystéine. Elle est présente sous forme d'un dimère (FXIII-A₂) dans les plaquettes, les mégacaryocytes, les monocytes et les macrophages. Le FXIII-A₂ circulant serait issu de la lyse des plaquettes et des cellules de la lignée monocyttaire. La sous- unité B, de PM de 80 kDa, est codée par un gène situé sur le chromosome 1. Elle est synthétisée par le foie et sécrétée. Son rôle est d'assurer le transport et la stabilisation de la sous unité A dans le plasma. Le Facteur XIII est présent dans le plasma sous forme inactive (zymogène d'une transglutaminase). Son activation requiert la présence de la thrombine et d'ions Ca⁺⁺. Le Facteur XIIIa (FXIIIa*) catalyse en présence d'ions Ca⁺⁺ la formation de liaisons epsilon (gamma-glutamyl) lysine covalentes, deux entre les chaînes gamma et quatre entre les chaînes alpha des monomères de fibrine adjacents. Cette liaison conduit à la formation d'un polymère de fibrine solide et stable. Le Facteur XIIIa pourrait intervenir aussi en amarrant le caillot de fibrine à des protéines du sous endothélium comme la fibronectine, la vitronectine ou encore le collagène et pourrait aussi en liant l' α 2 antiplasmine à la fibrine retarder la destruction du caillot jusqu'à réparation des tissus. Il joue également un rôle dans l'angiogenèse et dans le maintien de la grossesse.

Symptomatologie clinique du déficit en FXIII (Analyse de la littérature).

Les déficits en FXIII semblent être plus fréquemment rapportés par des auteurs Japonais et Iraniens.

En 2003, dans J.T.H., M. Lak et Coll. ont rapporté la symptomatologie clinique d'une cohorte de 93 patients Iraniens ayant un déficit en FXIII (< 5% avec la technique de la stabilité du caillot). Le saignement au cordon est présent dans 73% des cas. Sont également rapportés des hématomes (58%), des hémarthroses (55%), saignements seuls (25%), et hémorragies (35%). Des cas avec saignements au décours d'une chirurgie majeure sont rapportés dans 67% des cas. Dans cette cohorte, 6 femmes ont eu une grossesse et des fausse-couches sont survenues chez 3 d'entre -elles.

Il existe un registre international des déficits en FXIII : ([http://www.f13database.de/\(iz5ic4mna4dsm555b10bqtyo\)/index.aspx](http://www.f13database.de/(iz5ic4mna4dsm555b10bqtyo)/index.aspx)) et l'article publié en 2007 dans *Thrombosis and Haemostasis* rapporte une symptomatologie hémorragique comparable à la population Iranienne. Sur cette cohorte de 104 patients, 85% présentent un taux de FXIII < 5%. 11 % des patients ont un taux de FXIII compris entre 5 et 10%, et 4 % ont un taux de FXIII compris entre 10 et 30 %.

Le FXIII joue un rôle dans la formation du cytotrophoblaste et l'implantation du placenta, ce qui explique le risque de fausse-couche précoce chez les femmes ayant un déficit sévère.

En dehors de ces déficits sévères constitutionnels, il existe de nombreuses circonstances cliniques ou chirurgicales associées à une diminution en taux de FXIII : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, saignements du système nerveux central.

Plusieurs cas de déficit acquis sévère sont également rapportés dans la littérature avec une symptomatologie clinique parfois comparable à celle d'un anti-VIII (hématomes sous cutanés diffus) nécessitant la mise en place d'un traitement immunosupresseur. Le Tocilizumab (anticorps monoclonal anti-IL6) indiqué dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde a été impliqué dans plusieurs cas déficits acquis en FXIII.

Diagnostic biologique

Le diagnostic d'un déficit sévère en FXIII reste, à priori, facile et sera à évoquer sur une présentation clinique évocatrice associée à des tests d'hémostase usuels normaux. Il est plus difficile, en revanche, de définir précisément le taux d'un déficit sévère (<1 – 5%), de diagnostiquer les déficits modérés et acquis et de suivre les patients substitués.

Les tests biologiques à notre disposition sont les suivants :

- Solubilité du caillot : étude de la solubilisation du caillot, obtenu dans le plasma du malade par l'adjonction d'un agent coagulant, après ajout d'un agent lysant. La solubilisation du caillot est le signe d'un déficit sévère en FXIII. Problème : absence de standardisation (agent coagulant/lysant/temps d'incubation) confirmée par les résultats des CQE (ECAT et UK NEQAS Jennings *et al* JTH 2003).

Un test négatif n'élimine pas le diagnostic.

- Test semi-quantitatif Facteur XIII Reactifs[®], StagoTM. Variante semi-quantitative et standardisée du test de solubilité du caillot. Avantages : facile à mettre en œuvre. Inconvénients : pas de valeur précise, faux négatif

- Dosages automatisés :

- o Techniques photométriques : libération de NH₃. Lecture à 340 nm : consommation NADH Berichrom[®], SiemensTM; consommation NADPH Technochrom[®], TechnocloneTM. AS Lawrie *et al* JTH 2010
Résultats corrects aux CQE (ECAT et UK NEQAS) avec néanmoins des CV très importants.

Attention à la libération non spécifique de NH₃ par décomposition de NAD(P)H indépendante du FXIIIa par des enzymes utilisant NAD(P)H comme cofacteur (ex

LDH, pyruvate) entraînant de possible surestimation pour les faibles taux (<15%), négligeable pour valeurs normales. Il est recommandé (Ajzner and Muszbek, JTH 2004, 2075-7) de réaliser un blanc plasma permettant de corriger les valeurs de l'activité FXIII en utilisant l'iodoacétamide 1mmol/L, ce qui permet de bloquer l'activité transglutaminase du FXIIIa et de quantifier l'activité non spécifique. Le résultat du blanc iodoacétamide, réalisé pour chaque patient, est alors déduit du résultat du dosage du patient correspondant.

- Incorporation d'amide. Pefakit®, PentapharmTM. Sensibilité médiocre, variable selon la concentration de thrombine et le temps d'incubation. Difficultés d'exécution. Cher. Peu de données disponibles.
- Dosages immunologiques pour typer les déficits : ELISA, immunoturbidimétrie.

Quel test utilisé en dépistage ?

D'après l'article de AS Lawrie *et al* (JTH 2010) et les résultats des CQE, il serait recommandé d'utiliser une technique automatisée type Berichrom® (avec blanc iodoacétamide pour les valeurs < 15%), qui s'avère sensible et très reproductible.

Une étude multicentrique au sein du club des biologistes serait intéressante pour essayer d' « homogénéiser » nos pratiques.

3. Présentation des résultats du groupe de travail sous l'égide du GEHT pour proposer des CV limites acceptables pour les principaux paramètres d'hémostase ainsi que des biais (inexactitude) : Claire Flaujac

Pré-requis: Les CV proposés par RICOS sont inapplicables (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>) en hémostase. Les données des EEQ suisses ou allemands sont partielles.

Rappel méthodologique: analyse des CV de reproductibilité et des biais des résultats de différents organismes d'évaluation externe de la qualité indépendants des fournisseurs de réactifs + données ANSM. Les CQI et EEQ ont été obtenus sur une période d'au moins 1 an pour les associations suivantes :

- Association Probioqual
- Association Biologie Prospective
- Association Asqualab
- Association Ascosud

Nombre de valeurs analysées >70 000 pour les CV des CQI de la routine (TP%, TCA, Fg) et entre 600 et 34000 pour les CV d'hémostase spécialisée. Pour les biais, le nombre de valeurs est un peu moins important entre 8000 et 19000 pour la routine et 300 à 3600 pour l'hémostase spécialisée.

Méthodologie statistique : Comparaison de CV et des biais : Régression de quartiles (test de Wald = test d'hypothèses basés sur l'estimateur du maximum des vraisemblances) et découpage non pas en fonction du contrôle pathologique/contrôle normal mais selon le « comportement » des valeurs de contrôle.

Selon le guide VALTEC, les limites acceptables d'une technique correspondent aux résultats obtenus par 50 % des laboratoires les plus performants (choix SFBC) ⇒ Non applicable en hémostase, choix de considérer les données au 90^{ème} et au 95^{ème} percentile.

La validation des « limites acceptables » produites a été réalisée en appliquant ces limites à un échantillon de laboratoires membre du club des biologistes en hémostase (n=17) ou de l'association LABAC (7 laboratoires).

Des exemples sont donnés pour certains paramètres le jour de la réunion. Les résultats sont très encourageants et semblent refléter la « vraie vie ».

Ce travail a été présenté pour la première fois au club de biologiste le 30 Novembre. Dès que le groupe de travail se sera réuni pour valider les données +/- quelques modifications de découpage à revoir avec le biostatisticien + validation des limites acceptables pour les inhibiteurs de la coagulation, les données seront mises en ligne sur le site du GEHT et l'article sera soumis (idéalement !) au cours du premier trimestre 2013.

4. Particularités de l'hémostase en pédiatrie : valeurs de références. Marie-Françoise Hurtaud -Roux

4.1 L'hémostase pédiatrique est un système dynamique, profondément influencé par l'âge gestationnel et post-natal. Chez le nouveau-né, le nourrisson et l'enfant, ce système a son équilibre propre qui protège l'enfant de toute manifestation hémorragique ou thrombotique. Cependant, cet équilibre est fragile et toute pathologie acquise peut favoriser la survenue de troubles de l'hémostase, tout particulièrement chez le prématuré et durant la période néonatale.

La maturation va être progressive. Ainsi quel que soit l'âge gestationnel de l'enfant, la majorité des paramètres de l'hémostase atteint des valeurs adultes vers l'âge de 6 mois. La maturation est accélérée chez le prématuré.

La connaissance des valeurs de référence des différentes composantes de l'hémostase en fonction de l'âge gestationnel et de leur évolution en période postnatale est essentielle à l'interprétation des explorations réalisées à cet âge.

4.2 Plaquettes et facteurs de la coagulation sont détectables très tôt durant la vie fœtale. En période néonatale, la maturation est dépendante de 3 facteurs :

- l'augmentation de la clairance des différents facteurs
- l'immaturité hépatique
- le statut en vitamine K (faibles apports en vitamine K durant la vie fœtale et néonatale).

4.3 L'exploration de l'hémostase du très jeune enfant est soumise à un certain nombre de pièges pouvant fausser les résultats. Ainsi, les difficultés de prélèvement peuvent conduire à une fausse thrombopénie, un raccourcissement du TCA, une hypofibrinogénémié. Egalement, les tubes usuels d'hémostase ne sont pas adaptés aux nouveau-nés ayant un taux d'hématocrite élevé > 55% : les tests globaux sont allongés, les facteurs de la coagulation diminués.

4.4 Les troubles acquis de l'hémostase sont les plus fréquents en période néonatale.

Seuls les déficits constitutionnels sévères peuvent être diagnostiqués à cet âge de la vie. Attendre l'âge de 6 mois est une attitude recommandée pour le diagnostic de la plupart des déficits constitutionnels modérés.

4.5 En théorie, un laboratoire de biologie médicale doit établir ses propres valeurs de référence établies selon ses propres méthodologies, ses réactifs, ses automates. Pour la pédiatrie, les difficultés à avoir des cohortes en nombre suffisant font que le plus souvent ces valeurs de référence sont tirées de la littérature, après analyse de la méthodologie utilisée par les différents auteurs.

4.6 Principales références de la littérature apportant une analyse globale des paramètres de l'hémostase :

Auteurs	Populations étudiées
Andrew M - 1987 - 1988 - 1992	- Nouveau-nés à terme - Prématurés (30-36 SG) - Enfants (1 à 16 ans)
Flanders MM - 2005 - 2006	- Enfants de 7 à 17 ans - Enfants de 7 à 17 ans
Monagle P - 2006	- Enfants de 0 à 16 ans
Appel IM - 2012	- Enfants de 1 à 12 mois

4.7 Quelques particularités spécifiques à l'hémostase pédiatrique :

- Hémostase primaire

Le chiffre de plaquettes est comparable à celui de l'adulte dès la naissance.

Il existe une hyporéactivité plaquettaire à la naissance (défaut d'agrégation plaquettaire, défaut d'activation en cytométrie de flux).

L'hémostase primaire reste efficace grâce au rôle majeur du facteur Willebrand (élévation du taux plasmatique et concentration plus importante en multimères de haut poids moléculaire).

Le Temps de saignement et temps d'occlusion plaquettaire sont raccourcis chez le nouveau-né.

- Coagulation et fibrinolyse

Le tableau suivant résume les caractéristiques de l'hémostase néonatale comparées à celles de l'adulte.

Hémostase néonatale vs adulte	
Facteurs de la coagulation	↓ FII, FVII, FIX, FX ↓ FXI, FXII, PK, KHPM ↓ à ↔ FV, FXIII ↔ Fibrinogène ↑ FVIII, VWF
Inhibiteurs de la coagulation	↓ TFPI, AT, PC, PS ↑ α ₂ M
Fibrinolyse	↓ Plasminogène ↑ tPA ↑ PAI

Les tests globaux (Temps de Quick en particulier) sont peu informatifs chez le nouveau-né.

Il convient de privilégier les dosages spécifiques des protéines de la coagulation ayant une prise d'essai faible et moins influencés par l'hypercoagulabilité physiologique du nouveau-né.

Devant un syndrome hémorragique, un dosage systématique des facteurs VIII et IX doit au minimum être réalisé.

L'évolution des facteurs et inhibiteurs de la coagulation et des composantes de la fibrinolyse est progressive dans le temps et variable pour chaque facteur.

4.8 Perspectives

Deux approches peuvent être envisagées pour établir les valeurs de référence en hématologie pédiatrique:

- Faire la synthèse des valeurs de référence publiées dans la littérature après analyse des méthodologies.
- Etablir ses propres valeurs de référence :
 - Par des études rétrospectives en définissant les critères d'exclusion des échantillons :
 - Marqueurs hématologiques
 - Marqueurs biochimiques
 - Histoire clinique
 - Par des études prospectives (sur un ou plusieurs sites) en définissant les critères de sélection et d'analyse :
 - Population
 - Nature des échantillons
 - Méthodes
 - Statistiques

Références:

- Andrew M. Blood, 1987; 70:165-72
- Andrew M. Blood, 1988; 72:1651-1657
- Andrew M. Blood, 1992; 80:1998-2005
- Flanders MM. J Pediatr, 2005; 9:1738-42
- Flanders MM. J Pediatr, 2006; 149:275-277
- Monagle P. Thromb Haemost, 2006; 95:362-72
- Appel IM. J Thromb Haemost, 2012; 10:2254-63

5. Résultats des études multicentriques concernant les nouveaux tests fonctionnels VWF : Lucia Rugeri et Claudine Caron

5.1 Evaluation du réactif Siemens Innovance VWF :Ac (Claudine Caron et Lucia Rugeri)

L'étude a été réalisée sur Lille et Lyon.

Le principe du test repose sur une agglutination de particules de polystyrène recouvertes d'un Ac anti-GP1b et de rGP1b avec 2 mutations gain-de-fonction permettant la liaison spontanée, sans ristocétine, du VWF à la GP1b.

43 sujets sains et 172 patients VWD (dont 108 génotypés) ont été testés. Sur chaque aliquote ont été effectuées une mesure comparative du VWF:Ac et du VWF:RCo.

Les automates utilisés pour le dosage du VWF:Ac sont le CA1500 ou le BCS (Siemens). Le dosage du VWF:RCo a été réalisé sur agrégomètre (SD Medical) ou sur BCS (Siemens).

Résultats chez les patients VWD:

La corrélation entre VWF:Ac et VWF:RCo a été appréciée par le test de Pearson ($r=0.965$; $VWF:Ac=-0.984 + 1.04 VWF:RCo$, $p<0.0001$)

L'agrément des méthodes a été évalué par la représentation graphique de Bland et Altman. Le biais moyen entre les 2 méthodes est de +0.10% ; pour 7 échantillons (4%) l'écart entre les 2 méthodes est significatif, mais sans qu'il soit possible de conclure à la supériorité d'une méthode par rapport à l'autre.

5.2 Evaluation du réactif VWF: RCO HemosIL sur ACLTOP (IL) par **L.Rugeri**, C.Caron, D. Lasne, A. Marques-Verdier, C. Ternisien

L'étude a été réalisée à Lyon, Lille, Paris (Hôpital Necker), Clermont Ferrand et Nantes.

Le principe du test repose sur une agglutination de particules de latex adsorbée avec un fragment recombinant de la GP du récepteur plaquettaire du WF (rGP1b α) par l'intermédiaire d'un Ac monoclonal spécifique qui permet d'orienter le rGP1b α pour qu'il puisse interagir avec le WF présent dans l'échantillon **en présence de ristocétine**.

Les résultats du réactif HemosIL ont été comparés aux résultats de l'activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) réalisés par agrégométrie dans 4 laboratoires et par agglutination sur BCS avec le réactif :VWF:Rco (Siemens) dans 2 laboratoires. 189 sujets sains (77 groupe O et 112 groupe non O) et 491 patients identifiés VWD phénotypiquement ont été testés. Ils se répartissent comme suit : 195 (24 génotypés) Type 1, 270 patients Type 2 (235 génotypés) dont 69 Type 2A, 64 type 2B et 63 Type 2M. Enfin 26 patients Type 3. La comparaison VWF:Rco HemosIL versus agrégométrie a été réalisée sur 371 échantillons (145 Type 1 et 226 Type 2)

Résultats

Pour tous les types de déficits, il existe une corrélation significative (Test de Pearson) entre les 2 techniques $r=0,8498$ ($p<0,0001$), $VWF HemosIL = 0,8753VWF:RCo + 3,9823$, $p<0,0001$. Une représentation graphique de Bland et Altman montre un biais moyen entre les 2 méthodes de -0,8285

Pour les types 3, toutes les valeurs observées sont comprises entre 2 et 8 UI/dl pour une limite de linéarité théorique de 12,5 UI/dl

Dans les type 1, une corrélation significative entre les 2 techniques est observée: $r=0,7744$ ($p<0,0001$), $VWF HemosIL = 0,7336VWF:RCo + 9,885$, $p<0,0001$. Le biais moyen entre les 2 techniques est de -1,456.

Dans les types 2 ($n=226$), les résultats montrent une corrélation avec un test de Pearson significatif: $r=0,8579$ ($p<0,0001$), $VWF HemosIL = 0,6276 VWF:RCo + 5,4227$, $p<0,0001$. Le biais moyen est de 0,5711.

La comparaison des moyennes par séries appariées ne montre pas de différence significative entre les techniques pour les types 1 et les types 2. Seule la moyenne est significativement plus basse dans le type 2B avec le VWF réactif HemosIL (18,9 vs 26,5 UI/dl).

Dans les types 1 des discordances sont observées dans les 2 techniques. Treize échantillons étaient surestimés avec le VWF HemosIL (résultats supérieurs aux valeurs normales), mais 10 autres échantillons avaient des valeurs normales avec le VWF:RCo.

Sur 226 patients types 2 ($n=226$), seuls 2 échantillons de patients type 2A génotypés présentaient des valeurs normales avec le réactif VWF HemosIL. Mais à l'inverse 4

échantillons de types 2B n'étaient détectés qu'avec le réactif VWF HemosIL (patients présentant une hyperagréabilité à la ristocétine mais un VWF:RCo > 50UI/dl).

6. Etat d'avancements des travaux initiés lors des précédentes réunions

6.1 VWF:RCo en agrégométrie (Claudine Caron et Catherine Ternisien)

Après un recensement des pratiques des 5 laboratoires impliqués dans cette étude (Caen, Lille, Nantes, Tours, Toulouse) pour les 2 agrégomètres SD Medical et AFACT, un protocole opératoire de « validation de méthode VWF:RCo en agrégométrie » a été validé par les participants. La phase de réalisation technique devrait être effective dans le 1^{er} trimestre 2013 pour une présentation des résultats lors de la prochaine réunion du Club des biologistes en juin 2013.

6.2 Optimisation du dosage du VWF:RCo sur lame (Dominique Lasne et Agnès Le Querrec)

Le workshop sur le facteur Willebrand présenté lors de la précédente réunion en Juin 2012 indiquait que 9 laboratoires sur les 37 ayant répondu faisaient le dosage du VWF :RCo en agglutination avec un réactif Siemens. 8/9 utilisent le réactif OUBD23 et travaillent sur lame selon les recommandations du fournisseur. 1/9 travaille en microplaque avec le réactif BC Von Willebrand et addition de ristocétine. La plupart des laboratoires réalisant le test sur lame signalent des difficultés de lecture. Il semblerait que l'addition de ristocétine facilite la lecture en augmentant la taille des agrégats.

Les laboratoires d'hémostase de Caen et de Necker ont comparé les résultats obtenus sur lame avec, le réactif OUBD23 selon les recommandations du fabricant, et le réactif BC Von Willebrand ou OUBD23 avec addition de ristocétine. Des contrôles lyophilisés avec différentes activités de VWF et des plasmas de patients ont été utilisés.

Il apparaît que le réactif OUBD23 (lot 506568) utilisé selon les recommandations du fabricant sous-estime les résultats. L'utilisation d'un indice de sensibilité* (IS) recalculé avec un plasma témoin permet d'obtenir les résultats attendus.

Les performances sont équivalentes en termes de résultats avec le réactif OUBD23 en modifiant l'IS et pour la technique utilisant le réactif BC avec addition de ristocétine.

L'impression des techniciennes est que les agrégats sont mieux visibles avec le réactif BC et addition de ristocétine mais plus long en terme de préparation et temps d'agitation et donc moins bien adapté à l'urgence.

En conclusion, l'addition de ristocétine pour la lecture d'agglutination sur lame au réactif BC Von Willebrand ou OUBD23 n'améliore pas les performances de la technique. Mais le calcul de l'indice de sensibilité par chaque laboratoire est indispensable lors de l'utilisation du réactif OUBD23 selon les recommandations du fabricant.

* Calcul de l'indice de sensibilité des plaquettes = % VWF:RCo de l'étalon/inverse de la dernière dilution visible