

## **Compte rendu de la 6<sup>ème</sup> journée du Club des biologistes en hémostase**

Cette réunion s'est tenue le 15 Octobre 2013 et a rassemblé 33 biologistes.

### **1. Etude technique et économique des différents kits de dosage chromogénique du facteur VIII sur un panel représentatif d'automates : MF Aillaud, C. Caron, D. Lasne, C. Pouplard, F. Sobas**

- Présentation des différents kits de dosage de FVIII chromogénique par **Frédéric Sobas** : le diaporama de cette présentation est disponible sur demande.
  
- **L'utilisation et le coût du FVIII chromogénique pour le dosage des FVIII thérapeutique de nouvelle génération. Présentation de Claire Pouplard**

L'arrivée d'une nouvelle génération de FVIII à demi-vie longue pour la prise en charge thérapeutique des patients hémophiles vient complexifier la surveillance biologique de ces patients.

En effet ces nouveaux FVIII, qui peuvent être des FVIII monocaténaires ou des FVIII recombinants couplés à des fragments Fc (FVIII-Fc fusion) ou à des molécules de polyéthylène glycol (rFVIII-PEG), induisent *in vitro* des difficultés de dosages par méthode coagulante avec une variation importante des taux mesurés en fonction des céphalines. Il est important de souligner que ces nouveaux FVIII recombinants présentent le plus souvent un domaine B délété ou tronqué.

A ce jour il semblerait que la méthode chromogénique permette d'évaluer les taux circulants de ces FVIII nouvelle génération de façon optimale. Cependant cette méthode, bien que largement utilisée dans nos laboratoires, n'est pas considérée comme un test de routine et est plus coûteuse qu'un dosage de FVIII effectué par méthode coagulante. En effet, le coût réactif pour un dosage par méthode coagulante de FVIII varie de 1 à 3,5 € selon les CHU interrogés. Ces mêmes centres évaluent le coût d'un dosage de FVIII par méthode chromogénique de 10 € à 90 € dans l'état actuel de leur pratique. Cette grande disparité provient du nombre de demandes réalisées avec cette méthodologie. Ainsi l'étude de coût réalisée par le centre de Necker montre que la réalisation d'un dosage unitaire de FVIII par méthode chromogénique coûte 100 €. Ce prix est de 36 € si 3 dosages sont effectués en même temps, et de 18 € si 6 dosages sont effectués sur une même série. Tous les centres interrogés utilisaient la même trousse commercialisée Hyphen Biomed. Si la méthode chromogénique devient incurtable pour le dosage du FVIII chez les patients hémophiles A traités, elle devra être effectuée dans le cadre des études pharmacocinétiques, des ajustements de prophylaxie, et des ajustements de traitement dans un contexte chirurgical ou de traitement d'un accident hémorragique. Il est important de souligner que seuls ces derniers cas nécessiteront un dosage de FVIII chromogénique en urgence. Dans ces conditions, nous avons estimé que le coût du FVIII chromogénique pourrait varier de 2 € à 24 € selon l'activité des centres. En conclusion, une évolution de nos pratiques de surveillance biologique doit probablement avoir lieu. Cependant des études préliminaires réalisées *in vitro* doivent absolument être initiées pour évaluer le comportement de nos réactifs de

laboratoire avec ces nouveaux FVIII de façon à être en mesure d'évaluer au quotidien leur efficacité thérapeutique.

## **2. Etude de cas : »déficits en facteur XI et grossesse » : P. Toulon**

Le diaporama de cette présentation est disponible sur demande.

## **3. Lecture de la nouvelle nomenclature en Hémostase : V. Eschwege et D. Lasne**

Les changements de cotations concernant les analyses demandées dans l'exploration des maladies hémorragiques ont été présentés. Le principal problème soulevé et discuté concerne la cotation du VWF antigène, qui ne peut théoriquement être ajouté à l'initiative du biologiste que si une mesure de l'activité (dosage fonctionnel) a été réalisée et que cette activité est « diminuée ou proche des valeurs de références ». Concernant l'exploration des fonctions plaquettaires, le nombre d'agoniste pouvant être facturé B100 (code 1011) est limité à 5. La persistance du code E054 dans le référentiel des BHN de Montpellier est à surveiller. La place du test de correction du TCA (code 0182) dans l'exploration d'un TCA allongé a également été discutée.

Le diaporama de cette présentation est disponible sur demande.

## **4. Le point sur les nouveaux déficients en facteurs à stabilité prolongée. Evaluation sur STA-R<sup>®</sup> des réactifs STA<sup>®</sup>-ImmunoDef VIII et IX)**

### **4.1 Evaluation par le CHU de Tours : B. Delahousse**

#### **Introduction :**

Les laboratoires Stago ont récemment mis sur le marché deux nouveaux réactifs STA<sup>®</sup>IMMUNODEF VIII et STA<sup>®</sup>IMMUNODEF IX conformes aux recommandations du CLSI (*Clinical and Laboratory Institute. Determination of Coagulation Factor Activities; Draft Guideline—Second Edition H48-A2 (Draft 1) - April 2012*) pour les dosages des facteurs VIII et IX. La méthodologie des dosages a été adaptée sur les automates de façon à étendre le domaine de mesure sur une seule courbe de calibration. Les principales caractéristiques de ces réactifs sont les suivantes : plasmas immunodéplétés avec une concentration résiduelle en facteur <1%, présence de facteur Willebrand dans le réactif déficient en FVIII, stabilité de 8 heures sur les automates.

#### **Objectif :**

Vérifier les caractéristiques de stabilité annoncées par le fabricant.

#### **Matériel et Méthodes :**

-Tous les essais ont été effectués sur un automate de coagulation STAR évolution<sup>®</sup> en utilisant une méthode chronométrique en un temps. Les réactifs utilisés étaient les suivants : Calibrant :STA<sup>®</sup>-UNICALIBRATOR, CK PREST<sup>®</sup>, CQ N + P (Stago), Plasmas réactifs déficients : STA<sup>®</sup>IMMUNODEF VIII, STA<sup>®</sup>IMMUNODEF IX, tampon OK.

#### **- La configuration du test sur l'automate était la suivante :**

Calibration : une seule gamme en 6 points et en double détermination, échelle log-log, droite de régression de type polynomiale d'ordre 2. Dilution des échantillons au 1/10 en tampon OK. Nouveau dosage systématique des échantillons dont les résultats sont < 3% après une dilution automatique au 1/2 et

des échantillons dont les résultats sont >120% (FVIII) ou >150% (FIX) après une dilution automatique au 1/40. La linéarité annoncée par le fabricant s'étend de 0.7 à 400% pour le Facteur VIII et de 0.7 à 300% pour le facteur IX. Volumes prélevés pour les échantillons dilués et les réactifs : 50 µl.

Pour les deux dosages (VIII et IX), la droite de calibration a été effectuée et validée en début d'étude et conservée pendant les 29 jours de l'étude.

**- Performances évaluées :**

Répétabilité : analyse sur chaque gamme des contrôles normaux (N) et pathologiques (P) 30 fois dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible.

Stabilité de la calibration : analyse de la fidélité intermédiaire (reproductibilité intra laboratoire) à partir des valeurs des dosages des contrôles N et P effectués chaque jour en double détermination pendant 21 jours. Pour cette étape de l'étude l'opérateur n'était pas toujours le même, les plasmas réactifs déficients étaient reconstitués à chaque dosage, les autres réactifs nécessaires n'étaient reconstitués qu'en fonction des besoins (stabilité dépassée et/ou volume insuffisant).

Vérification de la stabilité sur l'automate des réactifs déficients : analyse des résultats de dosage des contrôles N et P effectués en double détermination sur les 2 gammes toutes les heures et demi après reconstitution des réactifs et pendant 9 heures.

Étendue de la zone de mesure : comparaison des résultats avec ceux obtenus avec la technique usuelle du laboratoire pour quelques patients à taux de VIII élevés >120% et pour des patients hémophiles A et B. Technique usuelle du laboratoire : 2 gammes de calibration (gamme « large » 20-90% avec redilution automatique pour les valeurs >200% et gamme « fine » pour les valeurs <20%) ; réactifs : STA® CKPREST, calibrant (Standard Human Plasma Siemens), contrôles de qualité N et P (Siemens) et plasmas déficients (Siemens).

**Résultats :**

Calibration :

Les points de calibrations du dosage de Facteur IX étaient : 3%, 6%,15%, 29%, 78% et 195%, ceux du dosage de Facteur VIII de 2%, 5%, 12%, 25%, 66% et 141%. Les coefficients de régression des courbes de calibration étaient respectivement égaux à 0.999 et 1. Dans les 2 cas les valeurs interpolées ne différaient pas de plus de 3% des valeurs théoriques.

Répétabilité

n = 30 valeurs	STA®IMMUNODEF VIII				STA®IMMUNODEF IX			
	contrôle N [75-105%]		contrôle P [29-43%]		contrôle N [89-125%]		contrôle P [39-53%]	
	sec	%	sec	%	sec	%	sec	%
<b>moyenne</b>	<b>54,2</b>	<b>83</b>	<b>62,2</b>	<b>36</b>	<b>51,8</b>	<b>95</b>	<b>59,1</b>	<b>44</b>
<b>Ecart type</b>	<b>0,31</b>	<b>2,73</b>	<b>0,27</b>	<b>1,04</b>	<b>0,44</b>	<b>4,54</b>	<b>0,30</b>	<b>1,40</b>
<b>CV</b>	<b>0,56</b>	<b>3,27</b>	<b>0,44</b>	<b>2,87</b>	<b>0,85</b>	<b>4,76</b>	<b>0,51</b>	<b>3,19</b>

Les CV de répétabilité sont < 0.9% pour les résultats bruts exprimés en secondes et ≤4,8% quand les résultats sont exprimés en %.

Stabilité de la calibration : analyse de la fidélité intermédiaire (reproductibilité) sur 21 jours

n = 21 valeurs	STA®IMMUNODEF VIII		STA®IMMUNODEF IX	
	contrôle N	contrôle P	contrôle N	contrôle P
<b>moyenne %</b>	<b>92,29</b>	<b>39</b>	<b>110,33</b>	<b>48,14</b>
<b>Ecart type</b>	<b>3,30</b>	<b>1,48</b>	<b>5,01</b>	<b>2,22</b>
<b>CV</b>	<b>3,58</b>	<b>3,80</b>	<b>4,54</b>	<b>4,61</b>

Quel que soit le dosage et le niveau de l'échantillon évalué, les CV sont ≤ 4,6%

Vérification de la stabilité sur l'automate des plasmas réactifs déficients

dosage toutes les heures ½ de T0 à T 9h30	STA®IMMUNODEF VIII		STA®IMMUNODEF IX	
	contrôle N	contrôle P	contrôle N	contrôle P
<b>moyenne</b>	<b>93,29</b>	<b>39,00</b>	<b>107,86</b>	<b>47,00</b>
<b>Ecart type</b>	<b>2,75</b>	<b>1,44</b>	<b>1,25</b>	<b>1,32</b>
<b>CV</b>	<b>2,95</b>	<b>3,70</b>	<b>1,16</b>	<b>2,81</b>

Quel que soit le dosage et le niveau de l'échantillon évalué, les CV sont ≤ 3,7%

Étendue de la zone de mesure : comparaison avec la technique usuelle du laboratoire

comparaison des résultats des dosages de F VIII %												
<b>Méthode Stago</b>	157	200	260	303	400	8,6	8,2	8,2	3,4	0,7	1	0,3
<b>Technique usuelle</b>	149	195	224	250	425	10	9,6	9,6	2,8	0,4	1	0,3
comparaison des résultats des dosages de Facteur IX%												
<b>Méthode Stago</b>	0	1	1	4,1	8,2	9,6	12,5	17,5				
<b>Technique usuelle</b>	0,4	0,7	0,8	3,5	9,3	11,8	14,9	21,8				

#### Discussion-Conclusion :

Nos résultats montrent des performances satisfaisantes de ces dosages en terme de linéarité de la calibration (coefficient de régression = 1), de précision et de fidélité intermédiaire avec des CV toujours < 5%. La même gamme d'étalonnage peut être utilisée pendant au moins 29 jours sans variation notable des résultats. Les réactifs reconstitués sont stables sur l'automate 8 heures après leur chargement sur l'automate. L'étendue de la zone de mesure en une seule gamme semble conforme à celle annoncée pour les dosages de facteur VIII. Pour le facteur IX, seule la partie basse de la gamme a pu être évaluée. Dans les 2 cas ces derniers résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre d'échantillons.

#### 4.2 Evaluation par le CHU de Bicêtre : Céline Desconclois

**Objectifs** : évaluer les réactifs STA®-ImmunoDef VIII et IX par rapport aux réactifs STA® Déficient VIII et IX sur une cohorte de patients : déficitaires en FVIII

(Hémophilie A ou maladie de Willebrand), déficitaires en FIX (Hémophilie B ou hypovitaminose K) et patients normaux pour le FVIII et FIX

**Matériel :** **Plasmas** : citratés congelés, sélectionnés sur leur taux de FVIII et FIX (Déficient Siemens, APTT SP IL, BCS) Variant de < 1% à 300% (n =47 et n =49 pour les FVIII et FIX respectivement) ; **Réactifs**: STA®-ImmunoDef VIII et IX et STA® Déficient VIII et IX, **Céphaline** : STA® CK-Prest ,**Calibrant** : pool maison titré contre standard NIBSC (100% de FVIII et 95% de FIX), **Contrôles** : Stago N et P, **Automate** : STA-R® **Méthodes** : Calibrations en double détermination. 3 séries de dosages, 3 jours différents, dosage en simple détermination. Immuno déficients : courbe unique polynomiale d'ordre 2 calibrée (1/10), redilution automatique si < 3 % (1/2) ou > 120 % (1/40). STA® Déficient VIII et IX : courbe normale et courbe basse (taux <15%). Pour les réactifs STA® Déficient VIII et IX, deux calibrations, courbe normale et courbe basse (taux <15%), ont été réalisées au début de chaque série. Pour les réactifs STA®-ImmunoDef VIII et IX, une calibration en courbe unique, polynomiale d'ordre 2, effectuée 3 semaines auparavant, a été stable les 3 jours de l'étude.

**Résultats : Régression linéaire** : bonne corrélation retrouvée entre les taux de facteur VIII et IX obtenus avec les réactifs STA®-ImmunoDef VIII et IX par rapport à ceux obtenus avec les réactifs STA®-Déficients VIII et IX ( $R^2=0.994$  et  $R^2=0.997$ , respectivement). **Représentation graphique de Bland&Altman** montre une différence systématique de +22% pour les réactifs STA®-ImmunoDef VIII et +9% pour les réactifs STA®-ImmunoDef IX. Pour les valeurs de facteur VIII et IX <40%, la concordance diagnostique entre les 2 réactifs STA® Déficient et STA®-ImmunoDef est de 87% et 84% respectivement.

**Discussion des résultats** : Notre pool de plasmas normaux n'a pas été re-titré contre un standard international avec les 2 réactifs STA® Déficient et STA®-ImmunoDef VIII et IX, ce qui pourrait expliquer en partie la différence systématique retrouvée entre les 2 types de réactifs. Il existe en effet, notamment pour le facteur VIII, une différence de facteur dosé dans le STA®-Unicalibrator avec les 2 réactifs STA® Déficient et STA®-ImmunoDef VIII.

**Conclusion** : Les réactifs STA® ImmunoDef VIII et IX présentent l'avantage d'avoir une calibration en courbe unique stable sur STA-R® sur plusieurs semaines ; ceci serait ainsi particulièrement intéressant pour les dosages réalisés en urgence. Nos résultats ont montré une bonne corrélation entre les deux types de réactifs STA® Déficient et STA®-ImmunoDef. La concordance diagnostique est perfectible dans notre configuration mais l'étude de Watson (ISLH 2013) réalisée sur de très grandes cohortes de patients hémophiles a montré une concordance diagnostique de 95% et 96% pour le diagnostic des hémophiles A et B respectivement mais également un biais systématique identifié sur la représentation graphique de Bland et Altman. De plus larges études sont à présent nécessaires pour valider l'utilisation de ces réactifs dans d'autres systèmes, réactifs de céphaline et automate.

## 5. Accréditation des méthodes en Elisa : maîtrise des risques (C. Caron)

Notre laboratoire présente, en 2013, à l'accréditation COFRAC 4 analyses réalisées en méthode ELISA (Ac anti- PF4-héparine, Protéine C antigène, Protéine S libre et totale).

Ces examens, en portée A, méthode fabricant, ont fait l'objet d'une vérification de méthode sur site.

Le formulaire SH FORM 43 demande que soit réalisée une analyse des risques critiques et que soient décrites les modalités mises en œuvre pour les maîtriser. Nous avons identifié les points suivants :

- échantillon primaire et prétraitement de l'échantillon : données communes à tous les examens d'hémostase (prélèvement, gestion des non-conformités) ou spécifiques aux examens réalisés après aliquotage (préparation, acheminement), ou spécifiques aux méthodes non automatisées (sécurisation de l'identification de l'échantillon)
- habilitation des techniciens : à l'ensemble des méthodes non-automatisées et compétence identifiée pour les tests réalisés au moins une fois tous les 3 mois
- conditions ambiantes : pièce technique à température régulée et tracée ; étapes d'incubation soit en étuve à 37°C, soit en enceinte thermostatée et métrologiquement contrôlée
- réactifs : liste gérée des versions des fiches fournisseurs, traçabilité des lots
- raccordement et suivi métrologique des équipements critiques : centrifugeuses, réfrigérateurs, pipettes, chronomètres, incubateurs, lecteurs.
- exigences informatiques : sécurisation de la saisie manuelle des résultats dans le SIL

Pour chaque série de tests ELISA, sont archivés :

- les données brutes du lecteur
- le schéma de la plaque avec l'identification des échantillons testés, les références et lot des réactifs
- un EQ de traçabilité métrologique (pipettes, température de la pièce)

## 6. Le point sur les ateliers

### **Point d'avancement de l'étude multicentrique anti FVIII par méthode ELISA (Claudine Caron)**

Pour mémoire, l'objectif de cette étude est d'évaluer le coffret FVIII Antibody ® Screen GenProbe-GTI pour la détection précoce d'un anti FVIII chez les enfants hémophiles A sévères PUPs lors des 1<sup>ères</sup> expositions au FVIII. Cette évaluation multicentrique (Le Kremlin-Bicêtre, Lille, Lyon, Marseille, Nantes, Paris Necker, Toulouse) est actuellement en cours avec une première présentation des résultats lors de la prochaine réunion du club des biologistes.

**Déficits en facteur XI et grossesse (Pierre Toulon)** : un registre prospectif des patientes ayant un taux diminué de facteur XI au cours de la grossesse sera mis en place. Un questionnaire détaillé sera fourni aux centres intéressés. Si vous êtes intéressés merci de vous rapprocher de Pierre Toulon.

## 7. Questions diverses

Une problématique soulevée par Dominique Lasne concernant le dépistage et le titrage d'un anti VIII est le seuil de FVIII à partir duquel il faut chauffer le plasma à 56°C. Les pratiques sont variées dans la mesure où certains chauffent le plasma dès que le taux de FVIII est > 1% alors que d'autres quand le taux est > 5 ou 10%; ce point mériterait d'être documenté. Un travail doit être initié pour répondre à la question.