

## Compte rendu de la 7<sup>ème</sup> journée du Club des biologistes en hémostasie

Cette réunion s'est tenue le 13 juin 2014 et a rassemblé 34 biologistes, dont 14 via WebEx.

### 1. Agrégation plaquettaire : le point sur les recommandations de l'ISTH et CRPP (S. Voisin)

Les recommandations des SSC-ISTH pour la réalisation des techniques d'agrégation plaquettaire (AP) ont été publiées en 2013 (Cattaneo et al. *JTH 2013;11:1183-1189*) ; celles du centre de référence des pathologies plaquettaires en 2009.

Afin de connaître les pratiques dans nos centres en France un questionnaire a été adressé au club des biologistes. 31 laboratoires ont répondu. 29 laboratoires réalisent ces analyses, avec un nombre de tests très variable d'un site à un autre (tableau 1), 1 laboratoire n'a pas précisé le nombre d'agrégations plaquettaires réalisées :

**Tableau 1** : nombre d'AP par laboratoire

<b>28 laboratoires</b>	<b>nb</b>
moyenne	178
médiane	79
minimum	10
maximum	780
Nb labo effectuant < 50 AP annuelles	8
Nb labo effectuant 50 – 200 AP annuelles	12
Nb labo effectuant 200 - 400 AP annuelles	3
Nb labo effectuant > 400 AP annuelles	5

L'ISTH recommande de réaliser une AP pour l'exploration des pathologies hémorragiques, mais pas pour l'exploration des pathologies thrombotiques. Le CRPP recommande les explorations sur au moins 2 consultations avec un dépistage puis des explorations complémentaires.

L'HAS a précisé en 2011 que l'AP était utilisée pour l'exploration d'une pathologie hémorragique ou le diagnostic de TIH. La NABM mise en place en juillet 2013 permet de coter B100 / test pour 5 agents agrégants ou dilution, au-delà la cotation est BHN 50 / test.

Le questionnaire montre que pratiquement toutes les AP proviennent de consultation d'hémostasie ou de centre de traitement de l'hémophilie. Si un prélèvement est réalisé dans un autre service, c'est toujours sur avis d'un biologiste.

#### **Préanalytique.**

Les conditions de prélèvement des patients sont clairement définies par l'ISTH (repos, pas de tabac,...).

Le tableau 2 résume les recommandations ISTH et CRPP concernant la préanalytique et les compare aux pratiques françaises.

**Tableau 2** : comparaison des résultats des questionnaires et des recommandations

item		Club biologistes	ISTH	CRPP	
Aiguille de prélèvement	21G	15	21G ou 19G	22 ou 23G	
	22 ou 23G	3			
	19G	3			
Repos des tubes avant centrifugation (mn)	Aucun	46 %	15 mn	NP	
	15	35 %			
	30	19 %			
Vitesse (G)	<150	31 %	200 à 250	200	5 réponses en tours par minute de 800 à 1200
	150-250	65 %			
Durée de centrifugation (mn)	< 10	2 labo	10	10	
	10	75 %			
	≥ 15	5 labo			
Frein de centrifugeuse	Absence	83 %	Absence, température ambiante	NP	
	Présence	17 %			

### Synthèses des recommandations :

- Préparation du PRP :
  - o attendre 15 minutes après la centrifugation pour débuter les analyses, le CRPP recommande de laisser le PRP dans le tube primaire sans le pooler.
  - o En cas de thrombopénie <100 G/L, ou de VMP > 13, laisser sédimenter les tubes avec une inclinaison à 45° (ISTH). Le CRPP propose une première centrifugation 10 minutes à 65 G avant de collecter le PRP puis une 2e centrifugation de 10 minutes à 120 ou 140 G selon la valeur du PRP initial.
  - o La numération du PRP est indispensable.
- Le délai maximal entre la réalisation du prélèvement et le test est de 4 heures.
- L'ajustement du PRP si le nombre des plaquettes est supérieur à 600 G/L avec une cible à 300 G/L (78 % des labos). L'ISTH ne recommande pas l'ajustement systématique, reprenant l'étude de Castilloux en 2011 qui montre que le PRP non ajusté n'est pas supérieur au PRP ajusté pour le diagnostic des thrombopathies, mais que des anomalies de réponse aux agents agrégants sont plus souvent retrouvées lorsque le PRP est ajusté même lorsqu'il s'agit de sujets témoins.

### Les recommandations concernant les agonistes :

- **L'ISTH** : commencer à des faibles concentrations et augmenter en cas de réponse anormale, selon ce panel : ADP 2 µM, Épinéphrine 5 µM, collagène Horm : 2 µg/mL, TRAP 6 mer : 10 µM, TXA<sub>2</sub> (U46619) : 1µM et Acide Arachidonique : 1 mM

- **Le CRPP:** ADP : 2,5 – 5 et 10  $\mu\text{M}$ , Épinéphrine : 5  $\mu\text{M}$ , Collagène : 1 et 2  $\mu\text{g/mL}$ , TRAP 6 mer : 6,25 et 12,5  $\mu\text{M}$ , 14 mer : 25 et 50  $\mu\text{M}$ , TXA<sub>2</sub> : 5 $\mu\text{M}$ , Ac Arachidonique 0,5 mg/ml (soit 1,66 mM).
- **Le CRMW :** 2 concentrations de ristocétine de manière systématique 1,25 et 0,5 mg/ml, et recourir à des doses progressivement décroissantes pour déterminer la dernière concentration entraînant une agrégation.

**La proposition de panel suivant a été discutée :** ADP 5 et 2,5  $\mu\text{M}$ , acide arachidonique 1  $\mu\text{M}$ , collagène 2 ou 3,3 mg/mL, ristocétine 1,5 et 0,5 mg/mL. Le TRAP doit être proposé devant une symptomatologie hémorragique. L'Épinéphrine donnant des résultats très variables pourrait être proposée en second lieu. Le TXA<sub>2</sub> 10  $\mu\text{M}$  est utilisées en cas de réponse insuffisante à l'acide arachidonique.

L'exploration d'une anomalie au collagène :

- l'utilisation de la convulxine (manque de stabilité et problème de pureté) est difficile
- le CRP (Collagen related peptide), plus stable, est à proposer.

Les voix du calcium sont à étudier en cas d'agrégation réversible pour les agonistes (TRAP, TXA<sub>2</sub> ou Collagène) par le calcium ionophore A23175

### **Contrôles de qualité**

- L'utilisation de CQI : 22 laboratoires ont réalisé l'étude de sujets sains; l'étude systématique en parallèle d'un sujet sain est recommandée si le nombre de tests annuels est faible. Le CRPP recommande leur utilisation lors de la qualification initiale des automates, ou après révision et lors d'évaluation d'un lot de réactif ou de nouveaux réactifs.
- Un EEQ (NASCOLA via ECAT) est proposé, 11 laboratoires l'utilisent.

Le diaporama de la présentation est accessible sur demande auprès de Sophie Voisin ([voisin.s@chu-toulouse.fr](mailto:voisin.s@chu-toulouse.fr))

Lors de la discussion générale, Marie-Françoise Hurtaud nous informe d'une proposition faite par le CRPP lors de sa réunion en 2014, qui serait la mise en place d'une « bibliothèque » de dossiers et profils d'agrégation plaquettaire avec la démarche diagnostique associée.

## **2. Résumé de l'intervention de S.Kitchen « FVIII and FIX measurements following old and new products » (EAHAD février 2014): C. Caron, P. Toulon**

Après une introduction sur les pratiques actuelles en matière de titrage des concentrés et de dosage dans le plasma des patients substitués, S.Kitchen fait état des discordances observées entre les dosages chromométrique et chromogénique dès l'apparition des produits recombinants FVIII et FIX, avec pour le ReFacto, la proposition d'un standard spécifique pour corriger cet écart.

Les principales recommandations émises par AR Hubbard sous l'égide du SSC/ISTH (*J Thromb Haemost* 2013 ; 11 :988-9) pour l'étiquetage des concentrés de FVIII et FIX sont présentées ; nous vous invitons donc à lire cet article.

Puis différentes options pour la surveillance biologique des patients substitués par les nouveaux concentrés à demi-vie prolongée sont discutées au regard des résultats d'études publiées ou présentées lors de congrès (ISTH 2013).

**En conclusion**, les options retenues par S.Kitchen sont :

- Méthode chromogénique pour FVIII et FIX, avec un standard plasma
- Méthode chromométrique en un temps avec des réactifs (APTT) définis, ou avec un standard spécifique du produit

Pour compléter ce résumé, nous vous invitons également à lire la revue publiée dans *Haemophilia* pour le congrès de la WFH 2014 : S.Kitchen, E.Gray and K.Mertens « Monitoring of modified factor VIII and IX products ». *Haemophilia* 2014; 20(suppl.4), 36-42.

### **3. Recherche d'un anti - facteur : quelle méthodologie ? C. Desconclois, C. Flaujac, D. Lasne**

#### **Bilan de l'enquête sur les recherches et titrages d'inhibiteurs**

L'enquête de pratiques a été envoyée via surveymonkey aux 38 laboratoires participants au club des biologistes. En moyenne 30 réponses ont été reçues.

L'enquête comprenait quelques questions d'ordre général :

- température de chauffage du plasma pour dégrader le facteur (quelqu'il soit): 28/31 soit 90% : chauffe à 56°C ; 2/31 : chauffe à 58°C (1 quelque soit le facteur, 1 uniquement pour anti-VIII) ; 1 ne chauffe pas
- centrifugation après le chauffage, 89.2% (25/28 labos) centrifuge comme le recommande le GEHT, 3 labos différemment : 1 labo à 10000 g en tubes eppendorf - 5 mn ; 1 labo à 3000 g – 3 mn et 1 labo ne réalise pas de centrifugation.
- Méthode : 89.3% travaillent en Bethesda modifié uniquement et 7,1% (2/28 labos) en Nijmegen

Les biologistes ont, également, été interrogés sur leur pratique pour les recherches et titrages d'inhibiteur de chaque facteur (Fg, FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FXI et VWF) :

1. Chauffez-vous le plasma pour dégrader le facteur ?
2. Si oui : à partir de quel seuil de facteur ? à quelle température ? combien de temps ? et dans quelles conditions centrifugez-vous le plasma après chauffage ?
3. Combien de temps incubez-vous les mélanges ?
4. Avez-vous un CIQ ? un EEQ ?

Dans l'ensemble, les pratiques sont hétérogènes, et seule la question concernant la température d'incubation des mélanges des anti-FVIII 2h à 37°C a donné une réponse unanime.

Dominique Lasne a, ensuite, présenté les données de Necker comparant les recherches et les titrages d'anti-FVIII et anti-FIX avec et sans chauffage.

Claire Flaujac et Dominique Lasne ont fait un état des lieux des publications récentes.

Concernant les anti-VIII, 2 publications ont principalement été discutées :

- Miller et al. Validation of Nijmegen-Bethesda assay modifications to allow inhibitor measurement during replacement therapy and facilitate inhibitor surveillance. *JTH* 2012.

- Batty et al. Pre-Analytical heat treatment and a FVIII ELISA improve Factor VIII antibody detection in acquired haemophilia. *BJH* 2014.

L'ensemble des données (essais Necker et bibliographie) démontre que le chauffage sensibilise les techniques de recherches (allo et auto-Ac) ; la question étant de savoir si cela est pertinent cliniquement. Cet effet pourrait être lié à une polyréactivité des Ig (commentaire de Sébastien Lacroix-Desmazes).

Concernant la température et la durée de chauffage des plasmas avant incubation, deux protocoles existent:

- 56°C (durée au moins 30 minutes), température probablement « historique » liée à la décomplémentation
- 58°C (durée 90 minutes) selon la publication de Kitchen à qui un mail a été adressé afin de comprendre les raisons de cette modification (réponse en attente).

Devant le manque d'arguments pour trancher entre les deux températures, il est décidé de proposer une étude aux membres du club des biologistes (rédaction du protocole en cours).

Concernant le seuil à partir duquel on chauffe les plasmas : si pour les anti-FVIII, le seuil de 5% semble pouvoir être proposé selon les données de la littérature, il n'existe pas, en revanche, de données consensuelles pour les autres anti-facteurs.

Concernant la centrifugation des plasmas après chauffage, l'objectif n'est pas de « déplaquetter » le plasma mais d'éliminer les débris. Il semble qu'une centrifugation rapide soit possible et cela rejoint les propositions de la WFH et de l'ECAT faisant référence à des publications de Kitchen de 2010 et 2013 (« *In order to remove debris caused by the heating process, the samples have to be centrifuged at 4000 g for 2 minutes* »).

Concernant la durée d'incubation des mélanges, la température de 37°C n'est pas remise en question de même que la durée d'incubation des anti-FVIII pendant 2 heures. En revanche, pour les autres anti-facteurs, compte tenu des cinétiques plus rapides et des équilibres atteints également plus rapidement, les durées pourraient être raccourcies à partir de 10 minutes. Seul les anti-VWF devraient être incubés entre 1 et 4 heures (en général 2 heures).

En conclusion, un tableau de synthèse a été présenté. Il sera discuté et validé lors de la prochaine réunion du club des biologistes.

		FVIII et +/- VWF	Autres facteurs
Chauffage	T°	56 à 58°C	56 à 58°C
	Durée	30 à 90 min	90 min
	Seuil	>5% pour FVIII?	?
	Centri	?	?
Incubation (M+T)	Durée	2 h	10 min à 2 h
	T°	37 °C	37 °C

#### 4. Résultats de l'étude multicentrique anti-VIII par méthode ELISA : C.Caron

L'objectif de l'étude était d'évaluer le coffret FVIII antibody screen® Immucor (ex-GTI) pour la détection précoce d'un anti- FVIII chez les PUPS hémophiles A sévères lors des 1ères expositions au FVIII (< 50 JCPA). Entre mai 2011 et mai 2014, 39 hémophiles A ont été inclus (16 en prospectif, 23 en rétrospectif), 3 ne sont pas encore traités, 18 ont développé un inhibiteur du FVIII.

Les dosages ont été réalisés dans 4 centres.

Les résultats analytiques montrent pour la valeur cut-off (DO de 0.275 à 0.598) un effet centre.

Les résultats patients sont :

- Avant toute exposition : 100% DO < cut-off de la série
- Après exposition au FVIII (197 échantillons testés)

	Bethesda (+)	Bethesda (-)
ELISA (+)	<b>26</b> (14 HA)	10 (5HA)
ELISA (-)	<b>5</b> (4HA)	<b>156</b>

- o Soit 92% concordance globale (vs 92% données fournisseur)
  - o Sensibilité (co-positivité) : 84% (vs 96% données fournisseur)
  - o Spécificité (co-négativité) : 94% (vs 89% données fournisseur)
- Plasmas discordants ELISA (+) Bethesda (-) : aucun des 4/5 HA suivis n'a développé d'anti VIII inhibiteur ; 1 HA en attente de prélèvement ultérieur
  - Plasmas discordants Bethesda (+) ELISA (-) : titre de l'anti VIII 0.7 à 1.5 UB ; pour 3/4HA, la DO est proche du cut-off

### **Pour poursuivre l'analyse,**

- expression des résultats sous forme d'un ratio normalisé à la DO cut-off de la série, à la DO patient avant tout traitement
- contrôle des échantillons discordants si possible, et recueil d'informations complémentaires (vaccination, infection, intensité du traitement, épisodes hémorragiques...) pour ces patients

A ce stade de l'analyse, l'apparition d'un anti-FVIII non neutralisant semble plutôt le fait d'une réaction immune transitoire que le signe précoce d'apparition d'un anti-FVIII inhibiteur. C'est également la conclusion de l'étude de Klintman J *et al* (*British Journal of Haematology*, 2013, 163, 385-92).

### **5. Retour d'un audit Cofrac selon la version 2012 de l'ISO 15 189 : expérience marseillaise (MF Aillaud)**

#### **- Bilan des écarts Cofrac**

Le dernier audit Cofrac de surveillance du LBM de l'AP-HM, comprenant 17 services de biologie, a eu lieu en Septembre 2013 sur un panel de 9 laboratoires démarrant dans la démarche ou demandant des extensions d'accréditation sur la norme 15189 version 2007.

Il a été attribué 27 écarts. Notre service n'était concerné que par 16 d'entre eux. 2 écarts critiques : 1 sur la validation biologique 24h/24 et 1 sur le transport des prélèvements dans des enceintes non cartographiées.

#### **- Norme NF EN ISO 15189 version 2012 : changements principaux.**

Modifications dans les intitulés des points de la norme

Le terme processus remplace procédures et rajout des points 5.9 diffusion des résultats et 5.10 gestion des informations de laboratoire.

La philosophie de la norme évolue en demandant d'ajouter au niveau de tous les processus, la gestion des risques et de redéfinir les objectifs qualité et les indicateurs qualité. Les formations et le suivi des compétences doivent faire l'objet de preuves matérialisées. Une procédure dégradée doit être rédigée.

Il a été présenté :

- les 8 processus du LBM de l'APHM ainsi que la procédure dégradée.
- le nouveau type de résumé de processus avec en première page la définition, la gestion des risques et la surveillance et en deuxième page le sommaire.
- la fiche d'écart prenant en compte le délai de réponse, l'étendue de l'écart au niveau du service ou du LBM et le suivi de l'action corrective.
- la nouvelle fiche d'habilitation comportant au verso un tableau de renouvellement de l'habilitation à actualiser tous les 2 ans.

Le diaporama est disponible sur demande auprès de [marie-francoise.aillaud@ap-hm.fr](mailto:marie-francoise.aillaud@ap-hm.fr)

## 6. Questions diverses (C. Pouplard)

Lors de la 4<sup>ème</sup> réunion du club des biologistes un workshop sur les pratiques du dosage du FXIII au niveau national avait été présenté. La société Stago a depuis pris contact avec le club pour mettre en place une étude permettant la validation d'une méthode de dosage du FXIII Ag sur STAR prochainement commercialisée par Stago. Ce travail a été proposé aux membres du Club des biologistes et une étude multicentrique devrait commencer en septembre. Ce travail aura pour objectifs d'étudier les performances analytiques et cliniques de ce nouveau réactif. L'inclusion d'une centaine de demandes de FXIII avec des taux de facteurs XIII mesurés compris entre 1 et 100% et répartis de la façon suivante : 0 – 5% (n ≥ 5), 5 – 15% (n ≥ 10), taux 15 – 30% (n ≥ 10), 30 – 50% (n ≥ 20) ou > 50% (n ≥ 30) seront nécessaires pour mener à bien ce projet.