

# Compte rendu de la 14<sup>ème</sup> journée du Club des biologistes en hémostase

Cette réunion s'est tenue le 17 Novembre 2017 et a rassemblé 36 biologistes.

## 1. Maltraitance : quel bilan d'hémostase? (Fabienne Nedelec, Rennes)

Une enquête a été réalisée au sein du club des biologistes pour évaluer les pratiques concernant le bilan d'hémostase effectué devant toute suspicion de maltraitance qui comprend notamment le syndrome des bébés secoués : 20 centres ont répondu positivement, l'ensemble des réponses sont regroupées dans le tableau ci-dessous, et montre une disparité des pratiques.

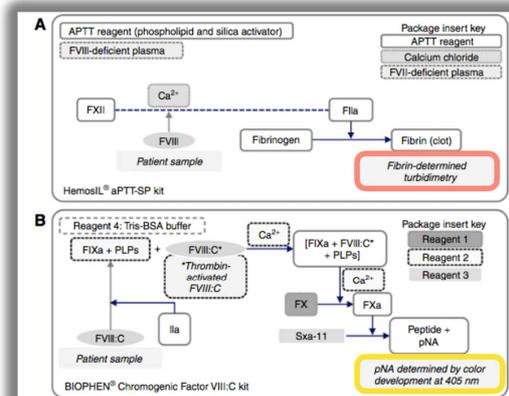
	ANNECY		BESANCON		BICETRE		BREST		ROBERT DEBRE		DUJON		LE MANS		LILLE		LIMOGES		LYON		MONTPELLIER		NANTES		NECKER		POITIERS		REIMS		RENNES		ROUEN		TOURS		TOULOUSE		VERSAILLES	
Analyses	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
NFS	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
TP	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
TCA-TCK	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Fibrinogène	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
FII					○	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
FV					○	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
FVII					○	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
FX					○	○	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
FVIII	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
FIX					●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
FXI					●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
XIII					●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
α2antiplasmine																																								
PFA100																																								
Willebrand Ag	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Willebrand Act	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Agrégations plaquettaires																																								
CMF plaquettes																																								

La Haute Autorité de Santé (HAS) a publié des recommandations de bonnes pratiques en septembre 2017 uniquement sur le syndrome du bébé secoué. Ces recommandations préconisent d'éliminer un trouble de l'hémostase associé ; le bilan proposé comporte les analyses suivantes : **NFS/TP/TCA/fibrinogène/Willebrand antigène et activité/ Facteurs VIII, IX et XI.**

Il existe actuellement un projet de groupe de travail « hémostase et pédiatrie » au sein de la COMETH/GFHT, en collaboration avec le club des pédiatres.

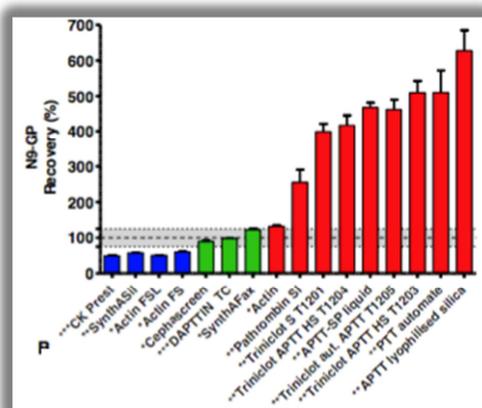
## 2. FIX chromogénique : quel intérêt en pratique biologique ? Quels réactifs disponibles ? Quelle expérience ? Motalib Smahi (Eaubonne), Hubert Galinat (Brest), Emmanuelle Jeanpierre (Lille), Catherine Ternisien (Nantes)

Actuellement, pour le dosage du FIX par méthode chromogénique (CSA), 2 trousse sont disponibles (Hyphen Bio Med et Rossix). En revanche, concernant le dosage par méthode chromométrique (OSA), plus de 16 réactifs APTT sont commercialisées. De plus, il existe plusieurs systèmes de mesures différents

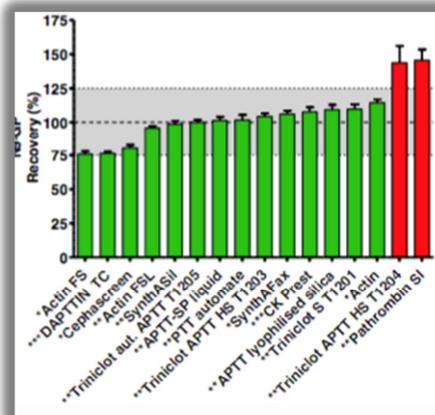


Des discordances entre la méthode OSA et CSA sont rapportées pour le dosage des rFIX long acting. Ainsi, l'étude de Kitchen (*JTH 2016*) a montré de grandes disparités dans la mesure de 4 molécules (N9-GP, Mononine, BeneFIX et SSC Standard) en fonction du réactif APTT utilisé (sous ou sur-estimation du résultat attendu). Ces discordances sont gommées si :

- le dosage est réalisé avec le réactif APTT qui a servi à titrer le produit
- ou si le dosage est réalisé avec une gamme spécifique calibrée avec le produit, quel que soit le réactif APTT utilisé.



Calibration laboratoire



Calibration spécifique N9-GP

### Expérience du CHU de Brest

Différents dosages de facteur IX ont été réalisés sur STA-R chez deux patients brestois hémophiles B sévères, ayant chacun bénéficié d'une chirurgie (chirurgie hémorroïdaire pour le premier patient et prothèse totale de genou pour le second) au cours de laquelle ils ont été substitués par IDELVION® (rFIX-Albumine) :

- 1 : dosage chromométrique classique avec du CK Prest (STAGO) et une calibration habituelle (facteur IX plasmatique – Calibrateur STAGO)
- 2 : dosage chromométrique avec du CK Prest (STAGO) et une calibration par la molécule (calibrateur fourni par CSL Behring)
- 3 : dosage chromogénique réalisé avec du réactif HYPHEN Biomed et une calibration plasmatique classique.

Le premier patient a bénéficié des 3 types de dosage alors que le deuxième a bénéficié des dosages (1) et (3).

On constate chez les deux patients que :

- le dosage chromométrique classique (1) fournit une valeur de facteur IX d'environ la moitié de ce qui est trouvé par le laboratoire central de CSL (dosage chromométrique avec du Pathromtin et un calibrateur plasmatique classique) ; ceci a été retrouvé au cours de l'étude multicentrique réalisée au sein du Club des Biologistes.
- le dosage chromométrique (2) faisant appel à une calibration spécifique avec la molécule IDELVION fournit un résultat identique au dosage réalisé par le laboratoire central CSL : l'utilisation de la molécule comme calibrateur semble donc permettre de s'affranchir de l'effet « céphaline » dans le dosage chromométrique du facteur IX chez les patients substitués par IDELVION ; néanmoins cette méthode est lourde à mettre en place car elle nécessiterait de maintenir et utiliser autant de courbes de calibration que de molécules utilisées.
- le dosage chromogénique (3) fournit un résultat plus élevé que le dosage (2) avec un ratio (3)/(2) de l'ordre de 1.45 pour le premier patient et 1.25 pour le deuxième patient. Par conséquent, le dosage du FIX par méthode du facteur IX fournit une valeur supérieure d'environ 30% à la valeur du dosage réalisé par le laboratoire central de CSL (valeur « vraie ») et pourrait constituer une alternative intéressante pour le dosage de ces nouvelles molécules, permettant de s'affranchir de la variabilité des dosages chromométriques et de l'influence des réactifs APTT.

## Expérience Lilloise

Comparaison de 2 trousse de réactifs pour le dosage du FIX par méthode chromogénique : BIOPHEN<sup>TM</sup>FIX (Hyphen Biomed) et ROX FACTOR IX® (Rossix)

Performances analytiques : Répétabilité et fidélité intermédiaire

Les performances analytiques des 2 réactifs sont semblables. Les calibrations sont stables. Les CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont satisfaisants (respectivement < 5% et <8% pour ROX FACTOR IX® et < 8% et <12% pour BIOPHEN<sup>TM</sup>FIX).

Stabilité à bord et après congélation

La stabilité à bord est identique pour les 2 réactifs. Par contre, on note une perte d'activité d'environ 10% après congélation pour le réactif BIOPHEN<sup>TM</sup>FIX, nécessitant une nouvelle calibration. Cette stabilité pourrait être améliorée par la congélation en flacon en verre. Des tests complémentaires sont en cours en ce sens.

Praticabilité

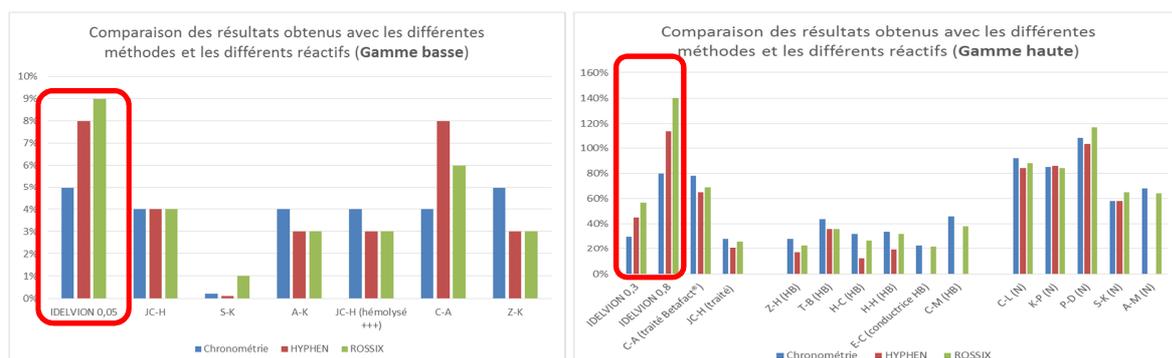
Les volumes de reconstitution et les températures de stockage sont différents selon le flacon constitutif du kit ROX FACTOR IX® et sont donc des risques d'erreurs. Le réactif BIOPHEN<sup>TM</sup>FIX est plus simple d'utilisation.

Résultats en gamme basse (1) et normale (2) de patients et d'échantillons

«spikés IDELVION»

La concordance entre les 2 réactifs a été évaluée chez 11 hémophiles B au diagnostic. Le test de Bland-Altman montre un biais de 1% entre les réactifs chez les hémophiles B testés.

Pour les échantillons surchargés en IDELVION, on note une surestimation systématique des taux en méthode chromogénique /chromométrie (ratio compris entre 1.41 et 1.9).

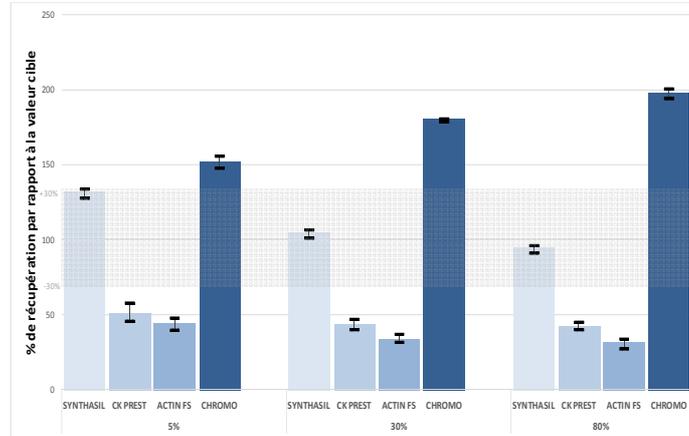


## Expérience nantaise sur plasma d'HB sévère surchargés *in vitro*

- **rFIX-Fc** : des échantillons surchargés en Alprolix® à 3 concentrations différentes (5, 20 et 80%) ont été dosés sur automate ACL top par méthode chromométrique avec 3 réactifs APTT différents (CK Prest, Synthasil, Actine FS) et par méthode chromogénique (Kit Rossix). Par rapport à la valeur donnée par le fabricant, le CK prest sous - estime de plus de 30% le taux. En revanche, les autres réactifs (Synthasil, Actine FS) ainsi que la méthode chromogénique pourraient être utilisés.

	Réactifs testés			
Valeur cible	Synthasil	CK Prest	Actin FS	Chromo
5%	7,8%	3,1%	6,0%	5,3%
20%	25,5%	13,7%	24,1%	23,6%
80%	77,8%	50,2%	87,6%	104,5%

- **rFIX-Fp (Idelvion®)** : des échantillons surchargés en Idelvion® à 3 concentrations différentes (5, 30 et 80%) ont été dosés sur automate ACL top par méthode chromométrique avec 3 réactifs APTT différents (CK Prest, Synthasil, Actin FS) et par méthode chromogénique (Kit Rossix) sur 3 jours. Il apparait clairement que le CK Prest et l'Actin FS sous estiment les résultats. Le Synthasil peut, en revanche, être utilisé. La méthode chromogénique conduit à une surestimation des résultats.



Ces résultats sont à interpréter avec prudence car il s'agit d'une petite étude monocentrique réalisée sur quelques échantillons. Une étude dans la « vraie vie » chez des patients substitués est importante pour confirmer ces premiers résultats.

Néanmoins, les résultats présentés par Steve Kitchen (*ISTH Berlin, Data from a UK NEQAS blood coagulation survey*) confirmeraient ces premiers résultats de dosage des FIX long acting par méthode chromogénique.

Chromogenic assay results by kit					
	n	Replene	Benefix	Idelvion	Alprolix
Target based on potency		50 UI/dl	70 UI/dl	60 UI/dl	60 UI/dl
Hyphen	10	47	54	99	54
Rossix	13	45	63	116	66

### 3. Evaluation des performances diagnostiques des kits BIOPHEN FVIII et FIX chromogènes.

*Pierre Toulon, Motalib Smahi, Claudine Caron, Christine Biron-Andreani, Hubert Galinat, Carine Crampe, Catherine Ternisien*

Les résultats de ces deux études multicentriques ont fait l'objet d'un poster présenté au GFHT de Caen (2017) et à l'EHAD Madrid (2018).

#### 1. Evaluation d'un réactif pour le dosage chromogénique du facteur VIII

**Introduction** :actuellement, le dosage du facteur VIII (FVIII) est le plus souvent réalisé par une technique chromométrique en un temps fondée sur le TCA (1,2). L'intérêt pour son dosage par technique chromogénique a été renforcé par les résultats discordants observés chez certains hémophiles A modérés/mineurs (3,4) et par l'introduction de nouvelles molécules à demi-vie prolongée pour le traitement de l'hémophilie A qui peuvent se comporter différemment des FVIII traditionnels plasmatiques ou recombinants dans les tests de coagulation (5,6).

Le but de cette étude multicentrique, impliquant 7 centres, était d'évaluer les performances d'un réactif pour le dosage chromogénique du FVIII, adapté sur différents automates, et de comparer les résultats obtenus dans des plasmas de patients avec ceux du dosage chromométrique utilisant les principaux réactifs utilisés en France.

#### Patients, Matériels et Méthodes

##### Réactifs utilisés

Le réactif Biophen FVIII:C (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise) permet le dosage colorimétrique du FVIII, avec deux courbes de calibration pour des activités comprises entre 20 et 160 UI/dL

(courbe haute) ou entre <1 et 25 UI/dL (courbe basse). Schématiquement, le FVIII, activé par la thrombine, forme un complexe enzymatique avec le FIXa, en présence de phospholipides et de calcium, qui active alors le FX en FXa. Le FXa ainsi formé hydrolyse un substrat chromogène spécifique qui libère de la paranitroaniline (pNa). La quantité de pNa libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est directement proportionnelle à la concentration de FVIII dans l'échantillon (le FIXa et le FX étant en quantité constante et en excès).

Ce réactif a été adapté sur différents automates (par ordre alphabétique) : ACL TOP 700 CTS (Instrumentation Laboratory, IL, Le Pré Saint Gervais, n=2), BCS XP (Siemens Healthineers, Saint Denis, n=2), CS-5100 (Siemens Healthineers, n=1) et STA R (Stago, Asnières, n=2).

Les dosages chronométriques utilisaient différents réactifs, HemosIL SynthASil (IL), Actin FS (Siemens) et STA CK Prest 5 (Stago), adaptés sur les automates de leurs fournisseurs respectifs.

#### **Echantillons biologiques analysés**

La répétabilité et la reproductibilité, exprimées en coefficient de variation (CV%), ont été évaluées en utilisant des plasmas lyophilisés contenant des taux normaux et pathologiques de FVIII (Biophen Normal Control et Biophen Abnormal Control, Hyphen BioMed). Pour le contrôle de la courbe basse, ces plasmas ont été préalablement dilués au 1/10<sup>ème</sup>.

Des plasmas de patients ou de sujets sains couvrant tout le domaine de mesure ont été évalués (n=80-116, différents dans chaque centre) incluant des hémophiles A non traités ou sous traitement substitutif, des patients avec syndrome inflammatoire, des patients avec anticoagulant lupique, et des patients sous rivaroxaban.

#### **Analyse statistique**

La distribution des taux de FVIII (en UI/dL) n'étant pas normale, les résultats, rendus en médianes avec valeurs extrêmes, ont été comparés par le test non-paramétrique de Wilcoxon. Les résultats ont également été comparés selon Bland-Altman (7), les biais moyens (exprimés en UI/dL et en %) étant rapportés. La corrélation entre les résultats de FVIII obtenus par les techniques chromogéniques et chronométriques a été évaluée par le test de Spearman.

#### **Résultats**

##### **Performances analytiques**

La répétabilité (CV%, n=20), évaluée en utilisant des plasmas lyophilisés contenant différents taux de FVIII était inférieure ou égale à 5.3% dans les différents systèmes analytiques, que ce soit pour la courbe haute ou la courbe basse (Tableau 1). La reproductibilité (CV%, n=6-24 selon les centres), évaluée en utilisant les mêmes plasmas lyophilisés, était inférieure à 6.4% pour les contrôles passés sur la courbe haute et inférieure à 14.6% pour les contrôles passés sur la courbe basse.

	Courbe haute		Courbe basse	
	Normal	Anormal	Normal 1/10	Anormal 1/10
Valeur cible (UI/dL)	94	39	9.4	3.9
Répétabilité (CV%)	0.9% à 3.0%	2.1% à 4.3%	1.4% à 5.3%	2.2% à 5.3%
Reproductibilité (CV%)	1.9% à 6.4%	0.7% à 5.8%	1.1% à 14.6%	2.4% à 11.8%

**Tableau 1** : Performances du réactif Biophen FVIII:C : répétabilité (n=20) et reproductibilité (n=6-24), exprimées en coefficient de variation (CV%), évaluées dans différents systèmes analytiques en utilisant des plasmas lyophilisés contenant différents taux de FVIII.

##### **Résultats dans les plasmas de patients**

Les résultats de FVIII obtenus avec le réactif Biophen FVIII:C dans les plasmas de patients ou de sujets sains couvrant tout le domaine de mesure (n=80-116, différents dans chaque centre) étaient bien corrélés avec ceux des tests chronométriques (r Spearman compris entre 0.949 et 0.995) (Tableau 2). La comparaison analytique des résultats obtenus avec la technique chromogénique et les différentes techniques chronométriques était néanmoins significative dans tous les cas (non rapporté). Les biais moyens, calculés selon Bland-Altman, étaient inférieurs à 4.5 UI/dL (en valeur absolue) sauf dans un système analytique (14.5 UI/dL).

Centre	Automate	Céphaline	n	FVIII chromo	FVIII coag	r	Biais (UI/dL) (%)
1	ACL TOP	SynthASil	98	66.7 (0 294.2)	75.7 (0 264.5)	0.988	-0.5 (-14.5%)
2	ACL TOP	SynthASil	100	62.0 (0.2 422)	65.5 (0. 439)	0.995	-4.5 (-11.8%)
3	BCS XP	Actin FS	98	51.8 (1 161.5)	70.9 (0.8 217.7)	0.989	-14.5 (-19.5%)
4	BCS XP	Actin FS	100	69.6 (0.5 127.5)	77.5 (0.3 134.3)	0.987	-2.7 (-4.0%)
5	CS-5100	Actin FS	80	19.8 ((0 286.4)	18.7 (0.4 301.1)	0.977	-2.5 (-1.8%)
6	STA R	CK Prest	116	69.0 (0.4 124)	65.5 (1.0 123)	0.949	+3.1 (+5.7%)
7	STA R	CK Prest	105	69.0 (1.0 157)	68.0 (1.0 142)	0.969	+0.5 (+0.7%)

**Tableau 2 :** Résultats du dosage du FVIII (valeurs médianes et extrêmes, exprimées en UI/dL) obtenus par la technique chromogénique (chromo) et par les techniques chronométriques (coag) dans les différents systèmes analytiques. Les corrélations ont été évaluées selon Spearman, et les biais calculés selon Bland-Altman (exprimés en UI/dL et en %).

Les seules discordances significatives retrouvées entre les résultats du dosage chromogénique et du dosage chronométrique l'ont été chez deux hémophiles A mineurs (33 UI/dL /12 UI/dL, et 31 UI/dL / 11 UI/dL). Il en était de même chez deux patients avec lupus anticoagulant (85.2 UI/dL / 32.4 UI/dL, et 81.4 UI/dL / 34.6 UI/dL) ainsi que chez deux patients traités par le rivaroxaban (113 UI/dL / 64 UI/dL, et 69 UI/dL / 50 UI/dL), le test chromogénique paraissant moins sensible à leur présence dans le plasma. Ces résultats discordants n'ont pas été inclus dans les calculs rapportés dans le Tableau 2.

**En conclusion,** les performances du test Biophen FVIII:C sont satisfaisantes et permettent d'envisager son utilisation en pratique courante pour le dosage du FVIII chez les patients hémophiles ou non.

## 2. Evaluation d'un réactif chromogénique de dosage du facteur IX

**Introduction :** actuellement, le dosage du facteur IX (FIX) est le plus souvent réalisé par une technique chronométrique en un temps fondée sur le TCA (1,2). L'intérêt pour son dosage par technique chromogénique a été renforcé par l'introduction de nouvelles molécules à demi-vie prolongée pour le traitement de l'hémophilie B pouvant se comporter différemment des FIX traditionnels plasmatiques ou recombinants dans les tests de coagulation (3).

Le but de cette étude multicentrique, impliquant 7 centres, était d'évaluer les performances d'un réactif de dosage chromogénique du FIX, adapté sur différents automates, et de comparer les résultats obtenus dans des plasmas de patients avec ceux du dosage chronométrique utilisant les principaux réactifs utilisés en France.

### Patients, Matériels et Méthodes

#### Réactifs utilisés

Le réactif Biophen FIX (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise) permet le dosage colorimétrique du FIX, avec deux courbes de calibration pour des activités comprises entre 20 et 180 UI/dL (courbe haute) ou entre 0.8 et 25 UI/dL (courbe basse). Schématiquement, en présence de phospholipides et de calcium, le FXIa active le FIX, présent dans l'échantillon testé, en FIX activé. Le FVIII activé par la thrombine, forme un complexe enzymatique avec le FIXa pour activer le FX. Le FXa ainsi formé hydrolyse un substrat chromogène spécifique qui libère de la paranitroaniline (pNa). La quantité de pNa libérée (mesurée par l'absorbance à 405nm) est directement proportionnelle à la concentration de FIX dans l'échantillon (le FXIa, le FVIII et le FX étant en quantité constante et en excès).

Ce réactif a été adapté sur différents automates (par ordre alphabétique) : ACL TOP 700 CTS (Instrumentation Laboratory, IL, Le Pré Saint Gervais, n=2), BCS XP (Siemens Healthineers, Saint Denis, n=2), CS-5100 (Siemens Healthineers, n=1) et STA R (Stago, Asnières, n=2).

Les dosages chronométriques utilisaient différents réactifs, HemosIL SynthASil (IL), Actin FSL (Siemens) et STA-CK Prest 5 (Stago), adaptés sur les automates de leurs fournisseurs respectifs.

### **Echantillons biologiques analysés**

La répétabilité et la reproductibilité, exprimées en coefficient de variation (CV%), ont été évaluées en utilisant des plasmas lyophilisés contenant des taux normaux et pathologiques de FIX (Biophen Normal Control et Biophen Abnormal Control, Hyphen BioMed). Pour le contrôle de la courbe basse, ces plasmas ont été préalablement dilués au 1/10<sup>ème</sup>.

Des plasmas de patients ou de sujets sains couvrant tout le domaine de mesure ont été évalués (n=90-111, différents dans chaque centre) incluant des hémophiles B non traités ou sous traitement substitutif, des patients avec syndrome inflammatoire, des patients avec anticoagulant lupique et des patients sous rivaroxaban.

### **Analyse statistique**

La distribution des taux de FIX (en UI/dL) n'étant pas normale, les résultats, rendus en médianes avec valeurs extrêmes, ont été comparés par le test non-paramétrique de Wilcoxon. Les résultats ont également été comparés selon Bland-Altman (4), les biais moyens (exprimés en UI/dL et en %) étant rapportés. La corrélation entre les résultats de FIX obtenus par les techniques chromogéniques et chronométriques a été évaluée par le test de Spearman.

## **Résultats**

### **Performances analytiques**

La répétabilité, exprimée en coefficient de variation (CV%, n=20), évaluée en utilisant des plasmas lyophilisés contenant des taux normaux et pathologiques de FIX était inférieure ou égale à 8.3% dans les différents systèmes analytiques pour la courbe haute (Tableau 1). Concernant les contrôles passés sur la courbe basse, les CV% étaient inférieurs à 14.3%. La reproductibilité (CV%, n=6-24) évaluée en utilisant les mêmes plasmas lyophilisés était inférieure à 15.0% pour les contrôles passés sur la courbe haute et inférieure à 16.1% pour les contrôles passés sur la courbe basse. Il est à noter une très grande variabilité des CV% selon l'analyseur utilisé.

	Courbe haute		Courbe basse	
	Normal	Anormal	Normal 1/10	Anormal 1/10
Valeur cible (UI/dL)	82	36	8.2	3.6
Répétabilité (CV%)	1.1% à 8.0%	2.4% à 8.3%	1.4% à 9.9%	2.0% à 14.3%
Reproductibilité (CV%)	6.7% à 14.5%	5.8% à 15.0%	5.1% à 13.6%	8.9% à 16.1%

**Tableau 1** : Performances du réactif Biophen FIX:C : répétabilité (n=20) et reproductibilité (n=6-24), exprimées en coefficient de variation (CV%), évaluées dans différents systèmes analytiques en utilisant des plasmas lyophilisés contenant différents taux de FIX.

### **Résultats dans les plasmas de patients**

Les résultats obtenus avec le réactif Biophen FIX dans des plasmas de patients ou de sujets sains couvrant tout le domaine de mesure (n=90-111, différents dans chaque centre) étaient bien corrélés avec ceux des tests chronométriques (r Spearman compris entre 0.948 et 0.995), sauf dans deux systèmes analytiques (0.870 et 0.891) (Tableau 2). La comparaison analytique des résultats obtenus avec la technique chromogénique et les différentes techniques chronométriques était néanmoins significative dans tous les cas (non rapporté). Les biais moyens entre résultats des tests chromogéniques et chronométriques étaient inférieurs à 10.0 UI/dL (en valeur absolue) dans tous les centres sauf un (-14.3 UI/dL) (Tableau 2).

Centre	Automate	Céphaline	n	FIX chromo	FIX coag	r	Biais (UI/dL) (%)
1	ACL TOP	SynthASil	100	62.0 (0.2 422)	65.5 (0 264.5)	0.995	-4.5 (-11.8%)
2	ACL TOP	SynthASil	96	47.1 (5.1 178)	54.7 (8.6 220)	0.958	-10.0 (-16.9%)
3	BCS XP	Actin FS	99	82.6 (0.5 185)	75.3 (0.8 133.7)	0.870	+6.2 (+9.0%)
4	BCS XP	Actin FS	100	68.6 (0.5 148)	83.2 (5.0 144.5)	0.948	-14.3 (-29.0%)
5	CS-5100	Actin FSL	90	23.1 (0 240.6)	18.5 (1.0 296)	0.987	0 (+4.8%)
6	STAR	CK Prest	97	85.0 (12 134)	80.0 (13 145)	0.891	+2.7 (+5.0%)
7	STAR	CK Prest	111	71.0 (1.0 124)	71.0 (1.0 144)	0.970	-5.0 (-3.5%)

**Tableau 2 :** Résultats du dosage du FIX (valeurs médianes et extrêmes, exprimées en UI/dL) obtenus par la technique chromogénique (chromo) et par les techniques chronométriques (coag) dans les différents systèmes analytiques. Les corrélations ont été évaluées selon Spearman, et les biais calculés selon Bland-Altman (exprimés en UI/dL et en %).

Des discordances significatives entre les résultats du dosage chromogénique et du dosage chronométrique ont été retrouvées chez 5 hémophiles B traités par l'albutrèpénonacog alfa, un FIX à demi-vie prolongée (182 UI/dL / 43 UI/dL, 166 UI/dL / 38 UI/dL, 95 UI/dL / 29 UI/dL, 60 UI/dL / 16 UI/dL, et 8 UI/dL / 4 UI/dL), le dosage chronométrique sous-estimant systématiquement les taux de FIX. Il en était de même dans des proportions moindres chez deux patients avec lupus anticoagulant (103 UI/dL / 75 UI/dL, et 93 UI/dL / 81 UI/dL) et chez sept patients traités par le rivaroxaban (89 UI/dL / 58 UI/dL, 85 UI/dL / 50 UI/dL, 87 UI/dL / 49 UI/dL, 93 UI/dL / 81 UI/dL, 91 UI/dL / 38 UI/dL, 84 UI/dL / 22 UI/dL, et 86 UI/dL / 30 UI/dL), le test chromogénique paraissant moins sensible à leur présence dans le plasma. Ces résultats discordants n'ont pas été inclus dans les calculs rapportés dans le Tableau 2.

**En conclusion**, les performances du test Biophen FIX semblent variables selon l'analyseur utilisé, des évaluations complémentaires paraissent donc nécessaires avant de conclure à une possible utilisation en routine.

#### 4. Bibliographie : Claire Flaujac (Versailles)

**Effect of treatment delay on the effectiveness and safety of antifibrinolytics in acute severe haemorrhage: a meta-analysis of individual patient-level data from 40 138 bleeding patients**

Angèle Gayet-Ageron, David Prieto-Merino, Katharine Ker, Haleema Shakur, François-Xavier Ageron, Ian Roberts, for the AntifibrinolyticTrials Collaboration. Lancet. 2017 Nov 7

#### 5. Le point sur le réactif Céphascreen® : Véronique Le Cam-Duchez (Rouen)

Le Cephascreeen est un réactif de TCA dont la céphaline est un tissu cérébral de lapin et l'activateur un polyphénol en milieu tamponné (brevet Stago); un peu différent d'un acide ellagique. Le réactif est liquide, limpide sans agitation et stable à bord de l'automate. Il est peu influencé par les paramètres HIL (*Int Jnl Lab Hem* 2016, 38 :375-388).

Plusieurs travaux d'évaluation de ce réactif ont montré qu'il n'y avait pas de différence avec le CK prest® (Diagnostica Stago) :

- pour les valeurs de références 29,1±4.96 versus 29,5±4,72 pour le CKPrest
- pour les bilans préopératoires
- chez les hémophiles substitués ou non mais > 25 %
- dans une population de TCA allongé avec le PTTa (Diagnostica Stago)

Pour les patients sous héparine, il y a une bonne corrélation avec le PTTa et le CKPrest mais les temps sont plus courts.

La sensibilité aux facteurs VIII et IX est identique à celle du CK Prest mais la comparaison avec d'autres céphalines est variable:

Patients	Taux de FVI II (%)	STA* - C.K. Prest* (valeur moyenne)	Ratio M/T STA* - C.K. Prest*	STA* - Cephascreeen* (valeur moyenne)	Ratio M/T STA* - Cephascreeen*
1	49	36,8	1,29	34,4	1,21
2	49	42,6	1,49	41,4	1,45
3	44	44,0	1,54	42,3	1,48
4	33	46,6	1,63	46,8	1,64
5	29	37,1	1,30	41,4	1,45
6	12	55,0	1,92	56,0	1,96
7	1	80,1	2,80	65,7	2,30

Table 1. Results obtained with the three APTT reagents.

		PTT-A®	Cephascreeen®	Actin FS®
Reference ranges (n = 41) (seconds) mean ± 2SD		26.8 - 39.3	24.2 - 31.9*	23.8 - 32*
Mean		33	28	27.9
Sensitivity to factor deficiency (threshold of factor at which APTT is above the cut-off)	Factor VIII deficiency (%)	40	40	60
	Factor IX deficiency (%)	25	35	50
	Factor XI deficiency (%)	20	50	60
	Factor XII deficiency (%)	40	30	30

#### Utilisation pour le dosage des « long acting »

- **Facteur VIII recombinant PEGylé ou BAY 94-9027 (Haemophilia 2014;20:593-600) :**

Utilisation de 5 réactifs et 2 automates pour comparer des plasmas surchargés soit en BAY 94-9027 soit en standard WHO-8

- o Quel que soit l'automate utilisé, les silices entraînent des allongements plus importants du TCA que les acides ellagiques et le Cephascreeen®
- o La comparaison entre le Cephascreeen® et le chromogénique Hyphen montre une bonne corrélation pour les 2 types de surcharges

Table 4. FVIII:C activity and precisions (% CV) of WHO-8 and BAY 94-9027 analysed by chromogenic assay and aPTT assay.

Assay		FVIII, IU mL <sup>-1</sup>	1.00	0.25	0.05
WHO-8	Chromogenic	Mean ± SD	1.03 ± 0.07	0.22 ± 0.02	0.04 ± 0.01
		CV (%)	6.71	9.4	25.0
	aPTT	Mean ± SD	1.00 ± 0.05	0.26 ± 0.00	0.04 ± 0.00
		CV (%)	4.68	0.00	1.12
Chromo/aPTT ratio			1.03	0.85	1.0
BAY 94-9027	Chromogenic	Mean ± SD	1.10 ± 0.07	0.25 ± 0.02	0.04 ± 0.01
		CV (%)	6.30	6.05	13.51
	aPTT	Mean ± SD	1.12 ± 0.00	0.32 ± 0.01	0.05 ± 0.01
		CV (%)	0.00	1.15	7.83
Chromo/aPTT ratio			0.98	0.78	0.80

Chromogenic activity measured by Hyphen FVIII:C kit; One-stage APTT measured by STAGO Cephascreeen.

aPTT, activated partial thromboplastin time; CV, coefficient of variation; FVIII, factor VIII; WHO-8, World Health Organization 8th International Standard FVIII concentrate.

- **Facteur IX PEGylé ou N9GP (JTH 2017;15:1901-1912):**

Utilisation du Cephascreeen® et des deux kits de dosage du facteur IX par méthode chromogénique pour comparer des plasmas surchargés en N9GP.

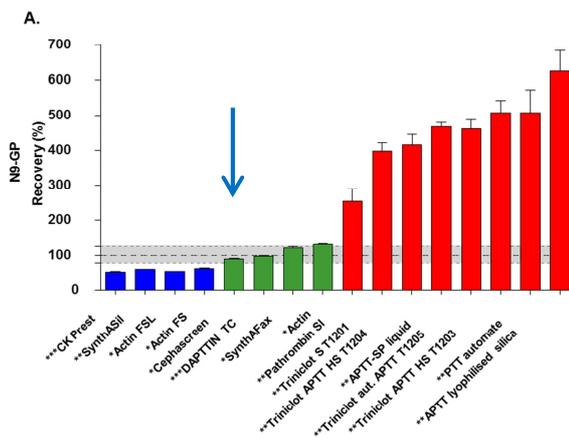
- o Les 3 méthodes sont utilisables avec des performances similaires

	STA- Cephascreen	ROX Factor IX	BIOPHEN Factor IX
Accuracy (interassay)	Mean % recovery	Mean % recovery	Mean % recovery
0.05 IU mL <sup>-1</sup> (TS-1)	118.7	109.8	77.2
0.15 IU mL <sup>-1</sup> (TS-2)	106.3	102.6	82.6
0.30 IU mL <sup>-1</sup> (TS-3)	100.8	112.0	80.0
1.20 IU mL <sup>-1</sup> (TS-4)	90.6	104.0	94.1
2.5 IU mL <sup>-1</sup> (DIL-TS)	75.0	93.2	101.4
Precision (interassay)	%CV	%CV	%CV
0.05 IU mL <sup>-1</sup> (TS-1)	16.2	8.9	10.9
0.15 IU mL <sup>-1</sup> (TS-2)	13.0	8.4	4.5
0.30 IU mL <sup>-1</sup> (TS-3)	14.1	12.3	12.2
1.20 IU mL <sup>-1</sup> (TS-4)	15.0	9.8	5.8
2.5 IU mL <sup>-1</sup> (DIL-TS)	9.2	15.0	3.1

- o Le Cephascreen fait partie des réactifs chromométriques utilisables pour doser ce médicament.

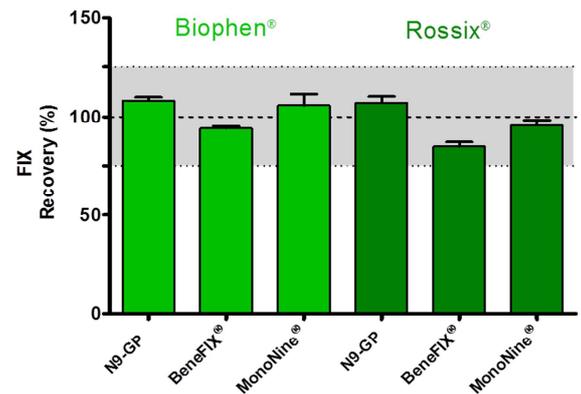
### One stage chromometric Factor IX assays

Most aPTT under or over estimate FIX PEG level



Novo Nordisk N9GP Dat on file

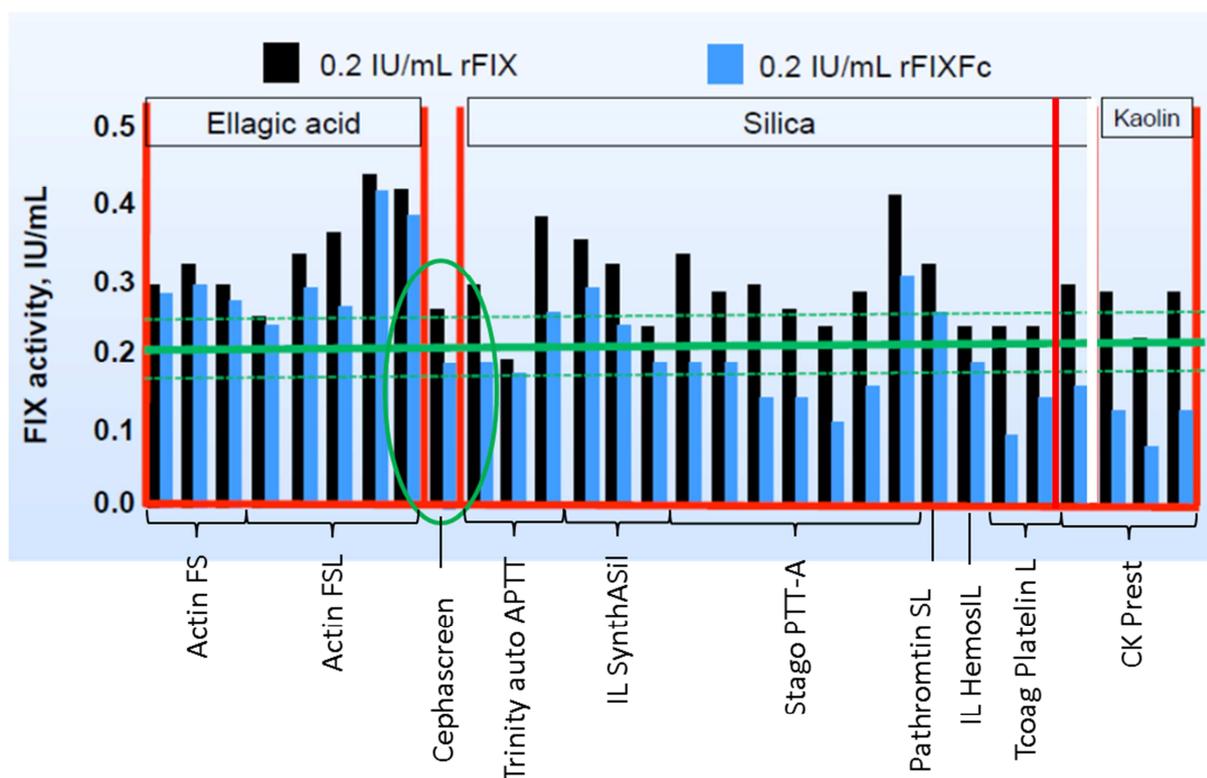
Chromogenic assays **unaffected** by PEG



### - Facteur IX Fc fusion protein ou rFIXFc (TH 2014;112:932-940) :

Utilisation de nombreux réactifs différents dans 30 laboratoires pour comparer des plasmas surchargés en BeneFIX® et en rFIXFc. Un seul laboratoire utilise le Cephascreen® sur un STAR et avec un calibrant pool maison.

- o Quel que soit le niveau de surcharge, le Cephascreen® donne des résultats acceptables comme l'acide ellagique. En revanche, la silice et le kaolin sous estiment les dosages de rFIXFc



- **Facteur IX fusion albumine (Idelvion®)** : pas de données dans la littérature mais le Cephascreeen® a été testé à Lille et se comporterait comme le CKPrest en conduisant à une sous-estimation d'environ 50% du résultat.

## 6. Le point sur les protocoles et les études multicentriques en cours : Claire Pouplard (Tours), Catherine Ternisien (Nantes)

### PRESENTATION D'UN PROJET D'ETUDE PROPOSEE PAR STAGO, SUR LE DOSAGE DU FACTEUR IX PAR METHODE CHROMOGENIQUE

STAGO sollicite le club des biologistes afin de réaliser une étude de validation de son nouveau kit FIX chromogénique selon les exigences réglementaires pour obtenir un marquage CE. Dans l'état actuel des discussions entre STAGO et le club des biologistes, STAGO demande la mise à disposition d'une centaine d'échantillons sur une zone de mesure de facteur IX allant de moins de 1 % à 200 %. Cette zone de mesure a été discutée pendant la réunion et nous proposons une zone allant de moins de 1 % à seulement 150 %. Les centres qui souhaitent participer à cette étude peuvent participer au recrutement des échantillons. Il est important que ces centres collecteurs disposent d'une collection biologique déclarée sur les pathologies hémorragiques. Chaque centre collecteur s'engagera à fournir trois aliquots de 500 µl par patient. Les échantillons congelés depuis moins de deux ans et conservés à - 80°C pourront être inclus dans l'étude. Afin d'obtenir un nombre suffisant d'échantillons, il est proposé d'inclure à la fois des hémophiles B traités ou non mais en ayant connaissance du traitement reçu, les patients avec insuffisance hépatocellulaire ou traités par anti-vitamine K (TP < 50%) ainsi que des sujets sains.

Le test chromogénique STAGO sera comparé au test chromogénique HYPHEN, et un dosage par méthode chromométrique sera réalisé. Seuls deux centres testeurs réaliseront les dosages sur STAR et seront proposés à STAGO.

Par ailleurs il sera demandé à STAGO de 'spiker' *in vitro* des échantillons avec les différents facteurs IX long-acting de façon à pouvoir évaluer les deux tests chromogéniques sur ces nouveaux produits. Claire POUPLARD doit reprendre contact avec STAGO rapidement pour finaliser les différentes modalités de l'étude.

## RESULTATS DES DOSAGES *IN VITRO* ET *IN VIVO* DES FACTEURS VIII ET FACTEUR IX COUPLES AUX FRAGMENTS FC.

### Premières analyses des différentes PK réalisées sur des patients de Bordeaux, Dijon, Marseille et Tours, traités avec de l'Elocta®.

Sur ces différents centres, les dosages ont été réalisés par méthode coagulante (CK-Prest ou Synthasil) et par méthode chromogénique (réactif HYPHEN). Sur l'ensemble des dosages, l'écart relatif entre la méthode chromogénique et la méthode coagulante est en moyenne d'environ 22 % lorsque le dosage est réalisé avec du CK-Prest et d'environ 17 % lorsque celui-ci est réalisé avec le Synthasil avec systématiquement des résultats plus élevés avec la méthode chromogénique.

Il est important de souligner que pour des taux de facteur VIII inférieurs à 40 %, la moyenne des différences est inférieure à 5 % entre les mesures par méthode coagulante et chromogénique et que cette moyenne des différences est d'environ 20 % pour les taux supérieurs à 40 %.

L'analyse des taux de récupération a été effectuée sur 28 patients traités par Elocta® et nous avons obtenu un taux de récupération médian par méthode coagulante de 1,77 avec des extrêmes allant de 0,61 à 3,60. Par méthode chromogénique, le taux de récupération est plus élevé, médiane 2,59 - extrême 0,72 – 3,75.

Le calcul de la demi-vie a pu être effectué chez 16 patients avec des demi-vies comparables en méthode coagulante ou en méthode chromogénique : respectivement 13,36 heures et 12,43 heures. Les extrêmes allant de 7,3 heures à 30 heures. La population est trop petite pour mettre en évidence des différences de pharmacocinétique en fonction de l'âge des patients. Sur la population étudiée, l'âge médian était de 14 ans avec des extrêmes allant de 2 à 58 ans.

A ce jour, nous disposons de données de pharmacocinétique issues d'autres centres et qui sont en cours d'analyse. Par ailleurs, un de nos objectifs à court terme est de collecter d'autres données de PK sous Elocta®, PK pour lesquelles les dosages par méthode coagulante et par méthode chromogénique sont disponibles. Ces résultats « *de la vraie vie* » issus de patients substitués seront par la suite comparés à l'étude *in vitro* que nous allons réaliser prochainement avec SOBI. L'analyse de ces données devrait permettre la rédaction d'un article dans une revue internationale.

### Résultats des dosages du rFIX-Fc (Alprolix®) par méthode coagulante.

31 centres ont participé à l'étude internationale proposée par SOBI pour le dosage de l'Alprolix®. Trois plasmas d'HB sévères surchargés en Alprolix® à différentes concentrations (80 %, 20 % et 5 %) ont été dosés par méthode chromométrique avec comme réactif APTT : CK-Prest (n = 20), Synthasil (n= 5), autres activateurs (n = 6).

**Concernant le point 5 %**, les résultats obtenus par méthode coagulante variaient entre 4 % et 9 %. Avec le Synthasil, la valeur médiane est de 8 % et avec le CK-Prest, la valeur médiane est de 5 %.

**Concernant le point 20 %**, la médiane avec le CK-Prest est à 17 % et à 24 % avec le Synthasil. Les résultats obtenus avec les autres réactifs d'APPT se situent entre ces deux valeurs médianes. Globalement, les valeurs extrêmes vont de 12 à 26 % et les valeurs les plus basses sont obtenues avec le CK-Prest.

**Concernant le point 80 %**, la valeur médiane avec le Synthasil est de 84 % et avec le CK-Prest de 60 %. Avec les autres réactifs d'APPT, nous observons également la même dispersion des valeurs qui donnent des résultats entre 65 et 85%.

L'analyse globale des résultats montre, pour le dosage de l'Alprolix®, que le CK-Prest sous-estime les taux de facteurs IX élevés, ce qui ne semble pas être observé avec les autres réactifs APTT. Cependant, il est important de souligner que le CK-Prest est utilisé dans la majorité des centres, ce qui favorise la grande variabilité des résultats. Cette variabilité ne peut être analysée avec les autres réactifs d'APTT. Deux centres ont également réalisé les dosages par méthode chromogénique (Hyphen Biomed) et obtiennent des valeurs proches des cibles attendues.