

## Compte rendu de la 12<sup>ème</sup> journée du Club des biologistes en hémostase

Cette réunion s'est tenue le 7 Octobre 2016 et a rassemblé 37 biologistes.

### 1. Quelle surveillance biologique dans l'Hémophilie A acquise ? Sophie Voisin (Toulouse)

L'hémophilie A acquise est une maladie hémorragique acquise rare (1 à 2 cas/ an /million d'habitants) liée à la présence d'un auto - anticorps dirigé contre le FVIII survenant chez un patient sans antécédent hémorragique. Le traitement associe la prise en charge des épisodes hémorragiques par des traitements pro coagulant, un traitement immunosuppresseur et le traitement de la pathologie sous - jacente si celle-ci est retrouvée. La mortalité est élevée et le pourcentage de rechutes est important estimé à environ 20%. La surveillance clinique et biologique de rémission, est donc capitale.

Les critères de rémission sont multiples et variables selon les études :

- Si le titre de l'inhibiteur anti-FVIII doit toujours être négatif, les seuils retenus pour F VIII :C peuvent être supérieurs à 70, voire 40%.
- Certaines études tiennent compte de l'arrêt du traitement immunosuppresseur pour définir la rémission, d'autres non.
- Les critères définis selon les recommandations actuelles (*Huth Kuhne 2009*) sont F VIII :C  $\geq$  50%, inhibiteur anti F VIII  $<$  0,6 unités Bethesda/ml.

Le diagnostic d'hémophilie A acquise est porté devant l'allongement du TCA, le déficit en F VIII :C et la présence d'un auto-anticorps anti F VIII  $>$  0,6 UB/ml. Dans une étude récente (*Werwitzke 2016*), le diagnostic biologique a été porté également par la recherche d'anticorps anti F VIII de nature IgG par méthode Elisa (Zymutest Hyphen).

Nous rapportons les résultats d'une étude rétrospective menée entre 1995 et 2011 au CHU de Nantes et de Toulouse. Soixante-quatre patients (24 femmes et 40 hommes) ont présenté une hémophilie A acquise diagnostiquée sur les critères suivants : F VIII :C  $<$  30% et inhibiteur anti F VIII  $>$  0,6 unités Bethesda/ml. Pour chaque patient, nous avons vérifié que le ratio FVIII/ VWF :Ag était inférieur à 0,6 puisque c'est un critère diagnostique de déficit en FVIII (*Fressinaud Hématologie 2012*)

Le suivi biologique de l'évolution a été conduit par les dosages de F VIII :C, la recherche d'inhibiteur et le calcul du rapport F VIII :C /VWF:Ag.

Les valeurs de ce rapport ont été à partir d'une population de 46 hémophiles A acquis, 39 hémophiles A modérés, 26 patients atteints de maladie de Willebrand de type 2N et 40 sujets sains. La moyenne de ce rapport est  $<$  0,1 dans l'hémophilie A acquise, 0,35 dans l'hémophilie A atténuée, 0,20 dans la maladie de Willebrand de type 2N, alors qu'elle atteint 1,13 chez 40 sujets sains, dans notre étude. Dans ce groupe, la valeur moyenne -3DS correspondant à un rapport FVIII / VWF:Ag à 0,7, cette valeur a été retenue comme limite inférieure de la normale.

Parmi les 64 patients, 55 (86 %) ont obtenu une première rémission selon les critères définis par Huth Kuhne (tableau 1). Le délai d'obtention du F VIII :C  $\geq$  50% et de l'anti-FVIII  $<$  0,6 UB/ml, sont respectivement de 75 et 85 jours en moyenne ; par contre le délai d'obtention du ratio F VIII :C / VWF:Ag à 0,7 est en moyenne de 213 jours. La rémission n'a jamais été obtenue pour 9 patients, 4 d'entre eux étant décédés et 4 d'entre eux perdus de vue.

L'exploration des données de patients ayant rechuté après une première rémission, montre que le rapport F VIII :C / VWF:Ag < 0,7 est le premier élément de la rechute, malgré l'absence de chute du F VIII :C.

Par ailleurs, l'étude de Werwitzke a montré l'intérêt de la recherche de l'anticorps anti F VIII de nature IgG, pour le diagnostic et le suivi des patients porteurs d'une HA acquise ; l'association de cette recherche pourrait être envisagée en complément des autres tests.

Nous proposons donc que ces critères biologiques de rémission et de rechutes : F VIII :C, anti F VIII inférieur à 0,6 UB/ml, ratio F VIII/ VWF:Ag et anti-FVIII IgG, puissent être étudiés dans des études prospectives. Les valeurs cibles du ratio F VIII/ VWF:Ag, pourront ainsi être définies dans une étude multicentrique.

**Tableau 1** : évolution biologique des 64 patients après le traitement immunosuppresseur, et classification des critères de rémission selon les recommandations (Huth Kunhe 2009)

Première rémission	Critères biologiques	Délai d'obtention de la rémission moyenne +/- SD (intervalle)	Commentaires
Oui (N 55)	F VIII ≥ 50%	75+/-130 (5-940)	
	Anti-FVIII <0,6 UB	85+/-107 (6-604)	
	F VIII ≥ 50% & Anti-FVIII <0,6 UB	91+/-137 (6-940)	
	FVIII/VWF:Ag > 0,7	213+/-353 (23-5989)	Pour 11 patients, ce ratio est toujours ≤ 0,7
Non (N 9)	1 F VIII ≥ 50%		Déficit constitutionnel en facteur Willebrand
	2 Anti-FVIII <0,6 UB	Si	1 décès 133e jour 1 décès 96e jour 1 perdu de vue après J 160
	3 2 critères associés		1 décès 4e jour 1 décès 8e jour 1 perdu de vue après J 39 1 perdu de vue après J 54 1 perdu de vue après J 70

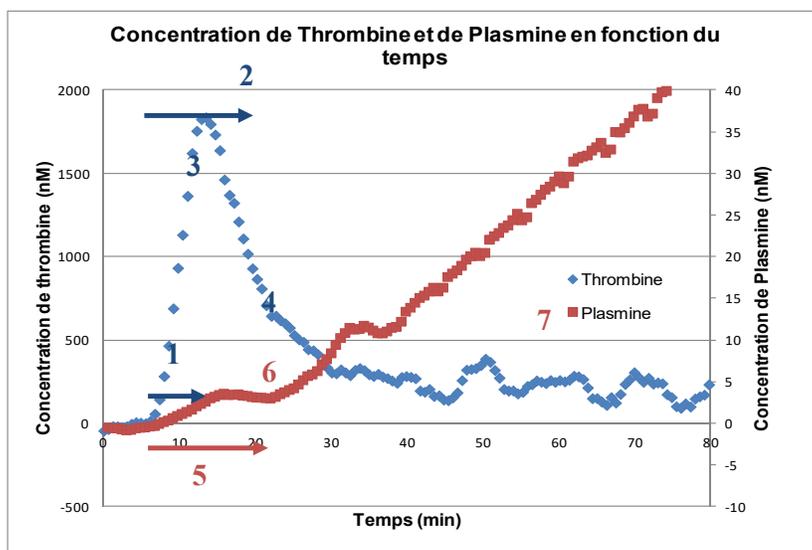
## 2. Test de génération de Thrombine-Plasmine : Intérêt chez les patients présentant un déficit constitutionnel en facteur XI et autres perspectives. Emmanuelle Jeanpierre (Lille)

Afin de disposer d'un test permettant d'étudier à la fois la coagulation plasmatique et la fibrinolyse ainsi que les nombreuses interactions entre ces deux systèmes, nous avons souhaité développer un test de génération simultanée de Thrombine-Plasmine.

Deux équipes ont développé des tests de génération simultanée de thrombine et de plasmine : *Simpson et al (Thromb Res. 2011;127(4):317-323)*, test en 2 puits réactionnels et *Van Geffen et al (Hematology. 2011 Nov;16(6):327-36)*, test en un seul puits. Dans ces 2 tests, la coagulation est initiée par le FT, la céphaline et le

CaCl<sub>2</sub>, et conduit à la génération de thrombine puis à la formation de fibrine. L'addition de t-PA dès le début du test permet son incorporation dans le caillot de fibrine et permet l'initiation de la fibrinolyse. Nous avons choisi d'adapter au laboratoire le test en un seul puits mis au point par l'équipe de Van Geffen. Ce test utilise le même principe que la thrombinographie CAT mais avec 2 substrats fluorescents différents, un spécifique de la thrombine et un de la plasmine qui n'interfèrent pas entre eux.

Concernant le préanalytique, nous travaillons sur Plasma Pauvre en Plaquettes (PPP) (centrifugation 2500g, 15 min, 20°C), sans CTI. Dans notre étude l'impact de la phase contact est négligeable étant donné la faible concentration en Facteur Tissulaire (0,28pM). Nous travaillons sur microplaque noire, 96 puits. Chaque patient est passé en triplicata (3 puits consécutifs). Les volumes déposés sont très faibles, nous travaillons donc en 1/2 plaques. La fluorescence est mesurée toutes les 30sec pdt 70 min puis les résultats sont transformés en dérivée 1<sup>ère</sup> et comparés par rapport aux données d'une courbe étalon thrombine et plasmine. Contrairement à la technique de thrombinographie CAT (Calibrated Automated Thrombography), il n'existe pas de logiciel permettant de convertir automatiquement les valeurs de fluorescence en concentration. La mise au point des formules mathématiques et des Macros Excel, pour réaliser de façon automatisée les calculs et les courbes de génération de thrombine et de plasmine, a été une étape complexe de cette étude.



Les paramètres du profil (Profil d'un témoin)

Le lag time de génération de thrombine (en min) (1) Le temps de lyse de la fibrine (min) (5)

Le pic de thrombine (en nM) (2)

Le pic de plasmine (nM) (6)

Le temps du pic de thrombine (en min) (3)

L'aire sous la courbe de plasmine (nM.min) (7)

L'aire sous la courbe de thrombine ou AUC (en nM.min) (4)

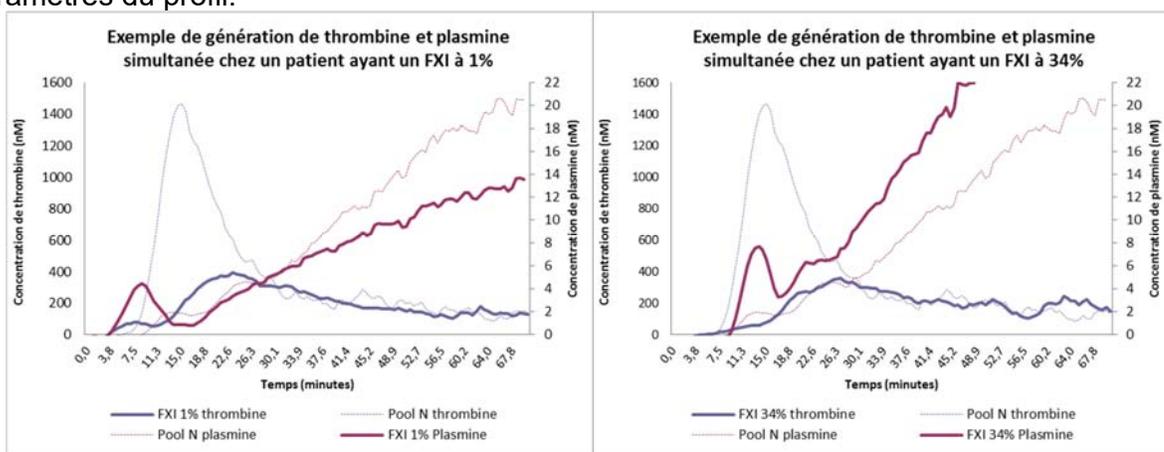
### Etude des profils de génération de Thrombine-Plasmine chez les patients présentant un déficit constitutionnel en facteur XI :

Le déficit en FXI a été décrit pour la première fois par Rosenthal et al. en 1953. Il s'agit d'un déficit rare, sa prévalence est d'environ 1/1 000 000 (*De Raucourt E et al, hématologie. 2010 ; 2016(4) :284-92*). Cependant, le déficit en FXI est retrouvé à plus grande fréquence chez certains groupes ethniques tels que les Juifs

Ashkénazes (8% d'hétérozygotes), les Juifs d'Irak (3.3% d'hétérozygotes) ou les Basques français (*He R et al, Thromb Res. 2012 ; 129(5) :541-50*).

Contrairement aux déficits en FVIII et FIX, le déficit en FXI ne cause que très rarement des saignements spontanés. Il s'agit dans la majorité des cas de saignements après des gestes invasifs, surtout au niveau des tissus avec une activité fibrinolytique élevée (oropharynx, tractus urinaire). L'une des problématiques du déficit en FXI est que les taux de facteur ne sont pas corrélés à l'intensité du saignement, les tendances hémorragiques sont différentes en fonction des patients pour un même taux (*Gomez K et al ; Haemophilia. 2008 27 ;14 :1183-1189*). Aussi, une même mutation génétique peut conduire à différents phénotypes hémorragiques (*Rugeri L et al, Haemophilia. 2010 ;16(5)771-7*). Les raisons de cette hétérogénéité clinique ne sont pas claires, possiblement fonction des autres taux de facteurs, de la coexistence d'autres pathologies hémorragiques. Cependant, Zucker (*Zucker et al, J Thromb haemost. 2014 ; 12(7) :1121-30*) a montré une différence de structure du caillot de fibrine chez les patients hémorragiques déficitaires en FXI par rapport aux patients non hémorragiques déficitaires en FXI. En effet, chez les patients hémorragiques, le caillot de fibrine présente une densité diminuée par rapport aux patients non hémorragiques, ce qui serait associé à un défaut de stabilité du caillot et donc coopérerait à la tendance hémorragique.

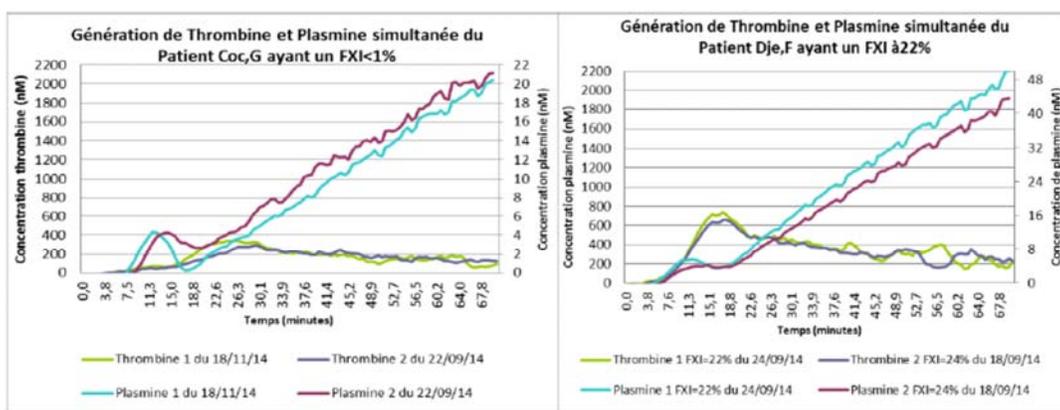
Nous avons étudié rétrospectivement les profils de génération de thrombine et plasmine simultanée des patients présentant un déficit constitutionnel en FXI, suivis en Hémostase au CHRU de Lille. Deux groupes de patients ont été définis en fonction du taux de FXI, le groupe 1 (FXI <10%) et le groupe 2 (FXI entre 10-50%). Les profils de l'ensemble des patients présentent tous des caractéristiques communes, quel que soit le groupe auquel ils appartiennent, mais ils sont différents de la population de référence. Des différences, statistiquement significatives, ont été retrouvées entre les groupes 1, 2 et le groupe de référence, pour différents paramètres du profil.



En ce qui concerne la thrombine, la génération est faible et très retardée. Pour la plasmine, la génération semble conservée mais apparaît avant le pic de thrombine. En s'intéressant au groupe 1, plusieurs corrélations entre les paramètres se sont révélées statistiquement significatives et nous ont permis de confirmer ces observations. En effet, plus le pic de thrombine est faible ou tardif, plus le pic de plasmine sera élevé ( $p < 0.02$ ). Quand on étudie spécifiquement les patients déficitaires en FXI, on note une diminution plus marquée dans le groupe 1 que le groupe 2, et dans le groupe 2 par rapport au groupe de référence. Par exemple, le pic de thrombine apparaît plus tardivement dans le groupe 1 que dans le groupe 2 et

le pic de plasmine est plus élevé dans le groupe 1 que dans le groupe 2 et le groupe de référence. Cependant, il n'a pas été démontré de corrélation entre le taux de facteur XI et les paramètres du profil de génération Thrombine-Plasmine, comme l'attestent les graphes ci-dessous, montrant des profils très différents pour des taux de facteur XI identique, et ce aussi bien chez des patients du groupe 1 que du groupe 2.

Un de nos résultats majeurs est la mise en évidence de profils de base chez 15 patients pour lesquels nous disposons de plusieurs échantillons. Pour un même patient, des échantillons différents, prélevés à des dates différentes et dont les tests de GTP ont été réalisés à des dates différentes montrent des profils identiques, que ces patients appartiennent au groupe 1 ou 2. Et ce malgré les CV qui peuvent paraître importants mais comparables avec ceux de l'équipe de Van Geffen. Les profils de génération de thrombine et plasmine sont reproductibles, un même patient a donc un profil de base qui lui est propre. Cette caractéristique pourrait être utile dans le suivi des patients, notamment pour le suivi du traitement substitutif.



**Profils d'un même patient du groupe 1 (FXI <10%)**

**Profils d'un même patient du groupe 2 (FXI 10-50%)**

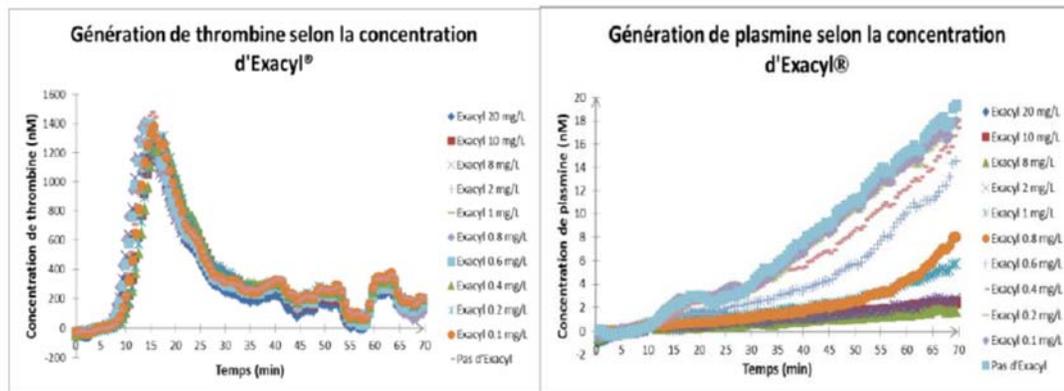
La prochaine étape de ce travail sera de confronter ces profils à la symptomatologie hémorragique de chaque patient afin d'évaluer si un ou plusieurs paramètres du profil de génération de Thrombine Plasmine pourrait être discriminant et permettre de prédire le risque hémorragique en cas de geste invasif. Le choix d'un « score » hémorragique sera difficile du fait de l'absence de saignements spontanés. Différentes équipes ont évalué ces symptomatologies hémorragiques par différentes approches. *Zucker et al (JTH 2014)* a évalué les saignements après 2 extractions dentaires différentes sans prophylaxie ; *Santoro (Haemophilia 2015)*, et *Rugeri (Haemophilia 2010)* ont évalué les saignements objectifs (Hb, transfusion, retour bloc) après toute intervention. *Pike (Blood 2015)* a fait la même évaluation mais seulement après amygdalectomie et/ou extraction dentaire. L'équipe de Brest (*Gueguen, BJH 2011*) a réalisé un score type Tosetto (réalisé par 2 cliniciens).

### **Autres perspectives :**

Le test de génération de thrombine/plasmine mis au point sera prochainement utilisé dans l'étude TRACES (en Obstétrique) portant sur la relation effet-dose de l'Exacyl® au cours de la césarienne hémorragique. Une gamme a été réalisée (en

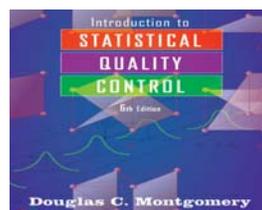
pool de patients témoins sains) afin d'étudier la relation effet-dose de l'Exacyl® sur la génération de plasmine. Les valeurs du pic de plasmine et de l'AUC sont fortement diminuées en présence d'Exacyl® par rapport aux tests sans Exacyl® et ce de façon dose dépendante.

### Résultats de la gamme Exacyl®



### 3. Règles de gestion des CIQ et suivi longitudinal de l'erreur analytique des méthodes : application au TCA Frédéric Sobas (Lyon), K Bourazas – P Tsiamyrtzis (Département statistique -Université Athènes)

Frédéric Sobas a présenté dans la continuité de sa précédente présentation le fruit des réflexions et applications concrètes de l'utilisation des outils bayésiens de façon longitudinale pour le suivi des méthodes via la gestion des CIQ. Ce travail a été mené dans le cadre d'une année recherche avec le département statistique de l'université d'Athènes. En premier lieu ce travail a conduit à repreciser ce qui conditionne sous l'angle statistique l'appréciation de la pertinence des règles / outils pour analyser et exploiter les résultats de CIQ. Il y a deux aspects à prendre en compte dans cette appréciation. En premier lieu, il ne faut pas perdre de vue que la maîtrise statistique des procédés (MSP) a vocation à détecter les deux types de problèmes que sont les OUTLIERS (sauts brutaux ponctuels impactant l'acceptabilité des méthodes) et les TENDANCES (Dérives insidieuses persistantes encore sans impact mais pouvant le devenir en l'absence de traitement). Les biologistes doivent donc choisir leurs outils par rapport à leur propriété intrinsèque à détecter les OUTLIERS ou les TENDANCES. Il n'y a en effet pas d'outil unique capable de détecter efficacement les deux types de problème comme le demande la MSP. En second lieu le choix doit être pondéré par la nécessité d'être le moins fréquemment possible confronter à des faux rejets. Dans un souci d'efficacité, les biologistes doivent donc choisir des outils sensibles pour détecter OUTLIERS ou TENDANCES et spécifiques pour n'avoir à traiter que de vrais problèmes. Il est une nouvelle fois conseillé au quorum de se plonger dans la bible de l'ASA (American Statistical Association) :



Autour de la notion d'ARL<sub>0</sub> (Nombre de passages de CIQ à partir duquel il y a un faux rejet) et des caractéristiques des outils conventionnels il est ainsi expliqué en exemple que la règle 2<sub>2s</sub> n'est ni spécifique ni sensible pour détecter OUTLIERS et TENDANCES. Les outils bayésiens présentés ultérieurement dans le cadre d'études de cas durant l'exposé sont par contre calibrés pour être sensibles et spécifiques. Le PCC a vocation à détecter les OUTLIERS. Le Location PRC a vocation à détecter les décentrages de carte de contrôle. La Scale PRC a vocation à détecter les dérives sur la variance des méthodes. Par rapport à ce dernier point, il n'existe pas de méthode conventionnelle apte à détecter de façon statistique au fil de l'eau des dérives sur la fidélité intermédiaire (FI) des méthodes. Les laboratoires sont ainsi contraints de calculer leur CV de FI de façon itérative et consommatrice de ressources. Les 3 outils bayésiens fondamentalement sont très peu sujets à de faux rejets en raison de leur capacité à automatiquement réviser leurs paramètres de cartes de contrôle à chaque intégration de nouvelles valeurs de CIQ (Congrès Panhellénique de statistiques Juin 2016). Le PCC est l'équivalent de la règle 1<sub>3s</sub>. Le Location PRC est apte à détecter comme l'EWMA des dérives de 1.5 SD de FI sur la valeur cible (ainsi que des décentrages fins de l'ordre de 0.5 SD de FI sur la valeur cible). Le Scale PRC est capable au fil de l'eau de détecter des augmentations de 10 % sur le SD de FI. Toutes ces caractéristiques apportent un regard éclairant autour des exigences du § 5.6.2.3 de la norme (CIQ et EEQ). Par ailleurs ces outils bayésiens pour le processus analytique permettent de se mettre en parfaite conformité avec les § 4.14.6 Gestion des risques et 4.14.7 Indicateurs qualité de la norme : Le laboratoire doit définir des indicateurs qualité pour surveiller et évaluer la performance au travers des aspects critiques des processus pré analytiques, analytiques et post analytiques. Sur le cas concret du CIQ normal en TCA sur ACL TOP il est fait la démonstration pratique de tout ce qui est écrit précédemment : pas de faux rejet et sensibilité des 3 outils bayésiens sur les 4 scénarios possibles : OUTLIER, TENDANCE SUR LA CIBLE, DECENTRAGE DE LA CARTE et TENDANCE SUR LA PRECISION DE LA METHODE. Les approches conventionnelles se montrent peu informatives et sont sujettes à des faux rejets fréquents s'il n'est pas procédé régulièrement à des révisions des paramètres de la carte de contrôle. Il est fait remarquer également que les outils bayésiens ne perdent pas la mémoire de ce qui a conditionné la libération des méthodes : la valeur du SD de FI défini en début de mise en production de la méthode. En d'autres termes l'approche bayésienne n'expose pas l'utilisateur au risque d'inclusion de valeurs aberrantes comme cela peut être le cas dans une approche conventionnelle de révision des paramètres de la carte de contrôle sur de longues périodes.

En conclusion le changement de paradigme statistique réhabilite en profondeur la gestion des CIQ au sein d'un laboratoire d'analyse médical.

#### **4. A propos d'une Hémophilie B féminine ou la drôle histoire de Lolla. Motalib Smahi (Eaubonne)**

Lolla est née à terme en Août 2013, d'une maman conductrice d'hémophilie B connue. A 14 mois et malgré l'absence de tout antécédent hémorragique, la maman a souhaité connaître le statut de conductrice ou pas de sa fille. Lolla est donc vue en consultation. Après un examen clinique normal, un bilan d'hémostase est effectué. Celui-ci retrouve un allongement du TCA (ratio M/T =4,1) associé à un déficit en FIX dosé à 1,2% accompagné des commentaires suivants (tube limite de remplissage, difficulté de prélèvement ? examen à vérifier ultérieurement...). Dans les jours qui ont suivi cette première consultation, Lolla a développé un hématome au niveau de la

cheville suite à une chute qui a nécessité une consultation en urgence. Le second prélèvement réalisé confirme un déficit sévère en Facteur IX <1%. Un traitement par des facteurs IX plasmatiques est donc instauré. Par la suite, suivront d'autres épisodes hémorragiques (hématome frontal, frein de la lèvre supérieure, cheville ...).

Devant cette hémophilie B féminine, différentes hypothèses diagnostiques ont été soulevées : mutation chez le père? Syndrome de Turner? ou inactivation de l'X?

L'étude génétique a montré :

- absence de monosomie 46 XX,
- pas de statut d'hétérozygote composite car seule la mutation familiale a été retrouvée
- les parents ne sont pas apparentés.

L'étude exhaustive du gène F9 chez Lolla retrouve la présence à l'état hétérozygote de la mutation située au niveau de l'exon 8 du gène F9 (Nomenclature protéique **p.Leu372Profs\*2** associée à une forme sévère). Aucune autre mutation n'a été identifiée sur le gène. Il n'a pas été retrouvée non plus de délétion ni de duplication.

Nous avons donc conclu à une inactivation ou lyonisation du chromosome X et chez Lolla seul l'X muté est actif rendant compte du taux de FIX effondré.

Aujourd'hui la petite Lolla va bien, elle est scolarisée et est sous prophylaxie à une injection par semaine.

## **5. Retour d'audit de l'organisation analytique des analyses d'hématologie au CHU de Tours. Sophie Voisin (Toulouse)**

Le secteur d'hématologie du laboratoire du CHU de Toulouse est présent sur les 3 sites du CHU, l'hôpital Purpan, l'hôpital Rangueil et l'IUC-t Oncopole, pour les activités de routine d'hémostase et de cytologie.

Les délais entre l'horaire de prélèvement, et l'heure d'enregistrement des échantillons au laboratoire sur le site de Purpan ont semblé à plusieurs reprises disproportionnés par rapport à ceux observés sur le site de Rangueil.

Le secteur pré analytique de l'hôpital Purpan est énorme correspondant à toutes les activités de laboratoire (bactériologie, virologie, parasitologie, biochimie générale et spécialisée,...) ; les échantillons y arrivent 24h/24 quelque soit le secteur concerné. Certains services ont déposé, sur ce site, des réclamations en raison de délais trop importants de prise en charge des échantillons et de rendu des résultats d'hématologie.

En pratique, entre 6:00 et 21 :00, les techniciens du pré analytique sont chargés de la gestion de l'ensemble des échantillons du laboratoire, pour la réception, l'enregistrement, le transfert des analyses demandées dans chaque secteur, alors qu'entre 21:00 et 6:00 du matin, un technicien d'hématologie et un technicien de biochimie sont chargés de la prise en charge pré analytique de tous les échantillons arrivant au préanalytique en plus des analyses de leur secteur respectif.

Les techniciens de laboratoire d'hématologie chargés des analyses 7 jours sur 7 et 24 heures sur 24 ont informé les biologistes du flux très intense en fin de nuit (4:00 à 7:00 du matin), montrant leur impossibilité de prendre en charge ensemble des échantillons. Ces surcharges se sont accentuées avec l'installation de pneumatiques entre les différents bâtiments de l'hôpital Purpan et le pré analytique, alors qu'auparavant les livraisons étaient effectuées par des coursiers nuit et jour.

L'audit s'est déroulé sur le site de Purpan en 2 étapes, pendant toute la nuit du 7 au 8 octobre 21:00 à 6:00, puis pendant la journée du 20 novembre entre 4:00 à 21:00.

A chaque arrivée d'échantillons, le biologiste devait relever le nombre d'échantillons destinés au laboratoire d'hématologie ou de biochimie générale, et il notait pour un certain nombre d'échantillons pris au hasard l'heure exacte d'arrivée au pré analytique. Les échantillons étaient ensuite enregistrés et traités comme habituellement. Les différents délais entre l'heure de prélèvement, l'heure d'arrivée au laboratoire puis de la prise en charge informatique et de la validation technique des résultats sont présentés ci-dessous.

Pendant la nuit, 25 % des échantillons arrivent entre 21:00 et 23:00, 25% entre 23:00 et 4:00 et 50 % à partir de 4:00, avec un pic à partir de 5:00 du matin. Cet afflux massif du matin correspond aux prélèvements de fin de nuit des patients hospitalisés transportés par pneumatiques.

De la même façon, sur la journée du 20 novembre, 22 % des échantillons sont arrivés entre 4:00 et 6:00 du matin et 38 % entre 6:00 et 10:00 du matin.

Le pic d'arrivée des échantillons après 4h35 induit un retard de leur prise en charge ; en effet, les échantillons arrivés au préanalytique à partir de 4h35 arrivent au secteur d'hématologie en moyenne une heure plus tard que ceux arrivant au pré-analytique avant 4h35.

L'étude sur la journée de novembre, montre que les retards sont principalement liés au retard de prise en charge des échantillons à leur arrivée au pré-analytique variant de 0 à 1h40 alors que les durées des analyses d'hémo-cytologie ou d'hémostase varient peu quelque soit le moment de la journée respectivement 4 et 13 mn. Le retard accumulé en début de journée se répercute sur les délais jusqu'en milieu de matinée.

Les conclusions de cette étude ont permis de mettre en évidence les difficultés d'organisation du préanalytique et du laboratoire, tels que le déplacement des horaires de maintenance au laboratoire, et les modifications des horaires du préanalytique avec la mise en place d'un poste de technicien de nuit qui sera chargé de la gestion de l'ensemble des échantillons parvenant au laboratoire.

Cette étude a permis de mettre en évidence des anomalies de fonctionnement globales. Les modifications prévues seront suivies d'études- audits par échantillonnage. Ce travail a fait l'objet d'un rapport de DU d'Assurance Qualité de l'une des internes du Laboratoire, Mme M Le Parc.

**6. Bibliographie (Dominique Lasne):** Factor VIII–Mimetic Function of Humanized Bispecific Antibody in Hemophilia A (*Midori Shima ,N. N Engl J Med 2016;374:2044-53*).

**7. Existe-t-il des recommandations sur Ponction Lombaire et Hémostase?**  
**Veronique Le Cam – Duchez**

Peu de données dans la littérature :

1) une enquête de pratique chez les patients à risque thrombotique /hémorragique (C Heitz et al. Revue Neurologique 170 (2014) 685-692)

**Contexte** : La ponction lombaire (PL) est un geste médical courant mais pour lequel aucune procédure validée n'existe notamment dans les situations à risque hémorragique ou thrombotique. L'objectif de ce travail était de déterminer les pratiques cliniques de la PL.

**Méthodes** : Réalisation d'une enquête d'opinion nationale par Internet. Un questionnaire anonyme de 19 questions a recueilli des informations concernant la réalisation des PL chez des patients à risque hémorragique ou thrombotique.

**Résultats** : 211 praticiens ont répondu au questionnaire parmi ceux contactés. Sur 13 situations cliniques proposées, aucune des opinions sur les conduites à tenir n'a emporté l'unanimité, 6 pratiques étaient dites « adoptées » par la majorité des participants et 6 par plus d'un tiers. Les pratiques étaient très variables, notamment pour le taux de plaquettes minimal accepté avant la PL, pour la prise en charge des patients sous bithérapie antiagrégante ou traités par les nouveaux anticoagulants par voie orale.

**Discussion** : Ces résultats soulignent l'hétérogénéité des opinions et, probablement des pratiques dans ces situations et la carence de recommandations. Il apparaît essentiel de mettre en place des recommandations claires et uniformes dans ce domaine afin de guider les pratiques dans le futur. Dans le but d'augmenter la représentativité des réponses actuellement collectées, l'enquête est toujours en ligne et ouverte jusqu'au 31 juillet à tous praticiens qui souhaiteraient y participer

2) Des recommandations britanniques : “*The UK joint specialist societies guideline on the diagnosis and management of acute meningitis and meningococcal sepsis in immunocompetent adults*”. F. McGill. *Journal of infection* 72 (2016)405-38 avec des recommandations concernant essentiellement les traitements anti thrombotiques

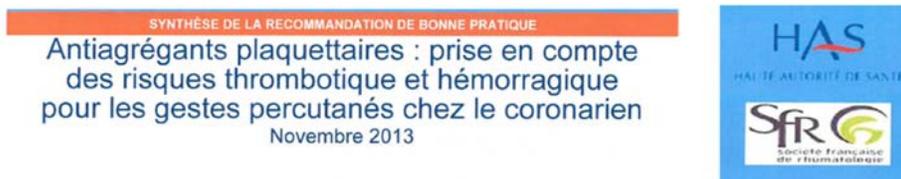
When should a lumbar puncture be performed in patients who are on anticoagulants?

#### Recommendations

4. If a neurological infection is suspected on admission prophylactic subcutaneous low molecular weight heparin (LMWH) should not be started until 4 h after the LP is performed (AR)
5. In patients already on prophylactic LMWH the LP should not be performed until 12 h after the dose (AR)
6. Prophylactic LMWH should be delayed until 4 h after a LP (AR)
7. Patients on therapeutic LMWH should not have an LP until 24 h after a dose (AR)
8. Therapeutic intravenous unfractionated heparin can be restarted 1 h after an LP (2C)
9. In patients on warfarin LP should not be performed until INR is  $\leq 1.4$  (2D)
10. Patients on aspirin and other non-steroidal anti-inflammatories do not need to have their LP delayed (1C)
11. In patients on clopidogrel an LP should be delayed for 7 days or until a platelet transfusion or desmopressin (DDAVP) is given – these should be discussed with a haematologist and the risk benefit ratio of performing a LP discussed (AR)
12. Expert advice, from a haematologist, must be sought for those patients on newer anticoagulants such as apixaban, dabigatran etexilate and rivaroxaban (AR)
13. In patients with known thrombocytopenia LP should not be performed at platelet counts of  $<40 \times 10^9/L$  or with a rapidly falling platelet count (1D)
14. LP should not be delayed for the results of blood tests unless there is a high clinical suspicion of a bleeding diathesis (AR)
15. In situations where a LP is not possible immediately, this should be reviewed at 12 h and regularly thereafter (AR)

3) Des recommandations européennes dont la seule contre-indication est « coagulation disorders ».

#### 4) Enfin les recommandations de la HAS sur antiagrégants plaquettaires et gestes percutanés



#### Stratégies de gestion des AAP pour des gestes percutanés de rhumatologie

Geste percutané	Stratégie	Traitement	Conduite à tenir	Délai d'arrêt en jours avant le geste percutané	Reprise de l'AAP initial
- Infiltrations articulaires postérieures lombaires	I Maintien	Aspirine	Poursuite	-	-
- Ponctions ou infiltrations articulaires périphériques, hors coxo-fémorales		Clopidogrel	Poursuite	-	-
		Aspirine + clopidogrel	Poursuite	-	-
		Aspirine + prasugrel	Poursuite	-	-
- Gestes périarticulaires, en dehors des infiltrations canalaires profondes		Aspirine + ticagrelor	Poursuite	-	-
- Ponctions ou infiltrations épi ou périurales lombaires	II Arrêt partiel	Aspirine	Poursuite	-	-
		Clopidogrel	Relais par aspirine	5 jours	Aussi précoce que possible, au mieux le jour même, en fonction du risque de saignement postopératoire
		Aspirine + clopidogrel	Arrêt clopidogrel	5 jours	
		Aspirine + prasugrel	Arrêt prasugrel	7 jours	
- Infiltration périarticulaire (extra-foraminale) lombaire					
- Ponction ou infiltration coxo-fémorale					
- Autres gestes articulaires périphériques : biopsie ou lavage		Aspirine + ticagrelor	Arrêt ticagrelor	5 jours	

L'idée de cette discussion était de remettre à jour les recommandations sur le CHU de Rouen. Après discussion, les critères retenus sont :

- TP ≥ 50% - INR ≤ 1,4 pour les patients sous AVK
- Plaquettes ≥ 50G/L
- TCA ratio < 1,20 ; si > 1,20 appeler le labo pour TCK en urgence +/- dosage FVIII, IX et XI

### 8. Le point sur les protocoles

#### - Validation des FVIII et FIX chromogènes Hyphen Biomed (Claudine Caron)

Une réunion de synthèse avec l'ensemble des participants à l'étude a eu lieu en septembre. Une présentation détaillée des résultats obtenus sur chaque site a été faite par Claire Dunois et Jean Amiral. L'analyse doit être poursuivie et nécessitera un recueil d'informations complémentaires.

Il est envisagé de poursuivre la collaboration pour le dosage chromogénique des nouveaux concentrés thérapeutiques.

#### - Evaluation du FVIII chromogène Siemens (Claudine Caron)

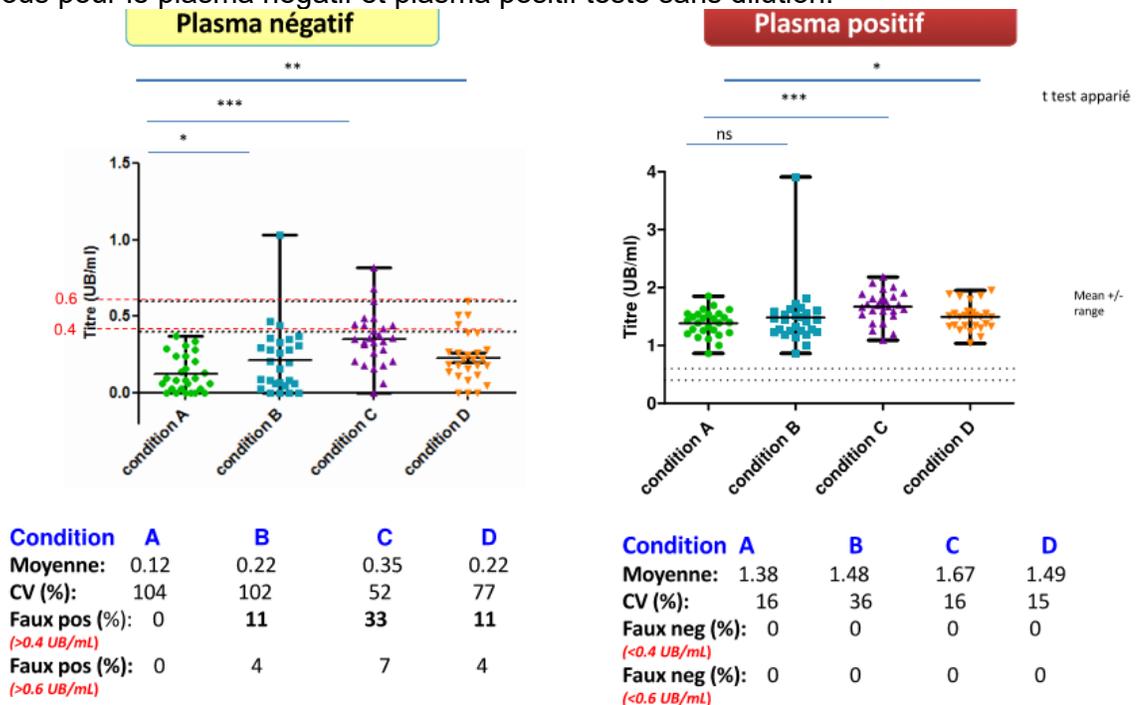
La constitution des plasmathèques de mars à juillet 2016, à laquelle 10 sites ont participé [merci à tous !!], a permis de recueillir 166 échantillons, 73 sous ReFacto AF® (Pfizer), 44 sous NovoEight® (Novo Nordisk), 49 sous Nuwiq® (Octapharma). Les analyses ont été réalisées en août et septembre à Rouen, Dijon et Lille (en novembre à Montpellier). Une présentation des résultats a été faite au GFHT de Tours.

- **Etude multicentrique : Titrage des inhibiteurs anti-VIII : Impact des réactifs (Christophe Nougier, Claire Pouplard).**

L'analyse des résultats a porté sur le dépistage et titrage de 2 plasmas (un plasma négatif et un plasma faiblement positif en antiVIII) ; l'étude a été menée par 27 centres selon 4 conditions (A, B, C et D). Pour rappel :

- Condition A : mode opératoire et réactifs habituels dans chaque laboratoire
- Condition B : même tampon de dilution (tampon imidazole) pour la réalisation du mélange référence et dilution au demi du plasma positif
- Condition C : même tampon de dilution (tampon imidazole) et même référence de FVIII : plasma congelé non tamponné
- Condition D : même tampon de dilution (tampon imidazole) et même référence de FVIII : plasma congelé tamponné

L'étude des titres moyens obtenus en fonction des conditions est présentée ci-dessous pour le plasma négatif et plasma positif testé sans dilution.

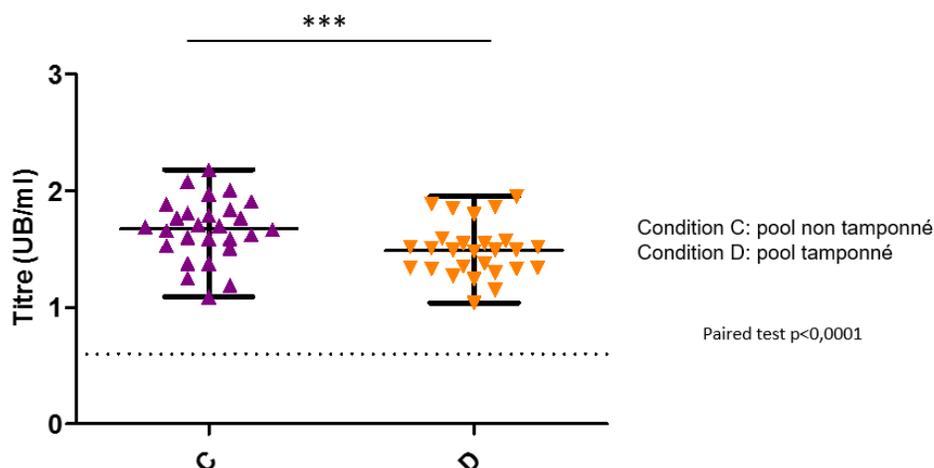


Les conditions propres à chaque laboratoire (condition A) semblent donner les meilleures performances pour ce test puisqu'aucun faux positif n'est détecté dans la condition A contrairement aux autres conditions. Ceci montre que les laboratoires maîtrisent bien la technique qu'ils utilisent habituellement. Le taux de faux positifs est de l'ordre de 33% dans la condition C, condition où une référence non tamponnée est utilisée. Pour le plasma positif, il existe des différences significatives entre les titres moyens obtenus en fonction des conditions montrant que lorsque l'on modifie le tampon ou la référence il existe un impact sur les titres obtenus. Aucun faux négatifs n'est détecté et le titre moyen est de 1, 5UB/mL.

Notre étude montre qu'il existe un impact du tampon utilisé. Pour le plasma positif, des titres plus faibles sont effectivement obtenus lorsque le tampon imidazole est utilisé que le plasma soit testé pur ou au demi. Après incubation de 2h à 37°C de différents mélanges de référence (même référence FVIII+ différents tampons) montrent qu'il existe des différences de stabilité du FVIII. Le tampon imidazole est le

tampon qui permet la meilleure stabilité du FVIII par rapport aux autres tampons (Tampon owren Koller, tampon Hepes, facteur diluant).

Concernant la référence de FVIII (source de FVIII), plus de 6 types de réactifs ont été utilisés dans cette étude. Le taux de FVIII de ces références était compris entre 86% et 116% et il pouvait s'agir de plasma lyophilisé ou congelé, tamponné ou non tamponné. Il existe également des différences de stabilité du FVIII du mélange test après 2H d'incubation à 37°C. L'incubation des différents mélanges tests (plasma négatif+ différentes références) montrent que la référence FVIII lyophilisée tamponnée (standard Siemens) permet une meilleure stabilité du FVIII dans le mélange par rapport à un plasma standard lyophilisé non tamponné ou un plasma congelé tamponné. En revanche cette stabilité est moins hétérogène pour le mélange référence (même tampon + différentes références) car le tampon imidazole utilisée intervient dans la stabilité du mélange durant l'incubation. Il existe donc une différence de stabilité entre les 2 types de mélanges pouvant alors entraîner une surestimation des titres ou des résultats faussement positifs lorsqu'une référence non tamponnée ou insuffisamment tamponnée est utilisée. Ces résultats sont confirmés lorsque les titres obtenus dans les conditions C et D sont comparés. L'utilisation d'un plasma référence non tamponné (condition C) entraîne une surestimation du titre par rapport à l'utilisation d'un plasma tamponné (condition D).



Dans notre étude, il n'existe pas en revanche de différences significatives entre les titres obtenus en fonction du type de déficient en FVIII utilisé, du type de céphalines utilisée ou du type d'automate utilisé.

**En conclusion**, il est recommandé d'utiliser un tampon imidazole pour la réalisation du dépistage et titrage des inhibiteurs antiVIII. La référence en FVIII utilisée a également un impact sur les titres et il est recommandé d'utiliser un réactif tamponné testé auparavant puisque tous les réactifs tamponnés ne sont pas équivalents en termes de maintien de stabilité du FVIII durant 120 minutes à 37°C.

**A vos agendas** : la prochaine réunion du Club des bios est programmée le vendredi 16 juin 2017 sur Paris !