

Compte rendu de la 2^{ème} journée du Club des biologistes en hémostase

Cette réunion s'est tenue le 21 octobre 2011 et a rassemblé 26 biologistes.

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

1.- Présentation par Claire Pouplard des résultats de l'étude multicentrique sur le rôle du facteur Von Willebrand dans le déficient en FVIII utilisé pour le dosage du FVIII.

Cette étude a été réalisée par les laboratoires d'hémostase des CHU de Bicêtre, Lille, Marseille, Nantes, Lyon et Tours. Chaque centre a utilisé son propre automate d'hémostase et son propre réactif de TCA et devait doser le FVIII sur des échantillons congelés ayant des taux de FVIII variables : (< 1%, 1%, 5%, 30% et 80%). Chaque dosage a été réalisé 4 fois sur 4 jours différents. Quatre déficients en Facteur VIII ont été étudiés : 1 déficient avec VWF (Siemens) et 3 autres déficients sans VWF (Stago, Biopep, IL).

- En préambule :

1. tous les facteurs de la coagulation ont été mesurés sur chaque déficient et le taux de FVIII a été mesuré par méthode coagulante, chromogénique et antigénique. Les 4 déficients possédaient des taux de FVIII < 1% en méthode coagulante et chromogénique, mais avec un déficient nous avons mesuré des taux de FVIII Ag > 50%. Ce résultat surprenant doit être approfondi : s'agit-il de la reconnaissance de fragments de FVIII ou du FVIII entier ?
 2. la recherche d'Anti VIII par méthode Bethesda s'est révélée négative sur les 4 déficients
 3. le VWF:Ag était < 1% avec les déficients Stago et Biopep alors qu'il était égal à 10% avec le déficient IL et à 53% avec le déficient Siemens.
 4. les taux des facteurs II, V, X, IX, XI et XII variaient selon les déficients entre 54% et 129% ; le taux de fibrinogène entre 2.15 et 3.2 g/l.
- Lors de l'étude multicentrique, les calibrations étaient effectuées chaque jour et validées par un CQI Normal et Pathologique. Quelque soit le déficient utilisé, les CV des CQI variaient selon les centres entre 4.5% et 7.9% pour le CQI Normal et entre 4.5% et 8.7% pour le CQI Pathologique.
 - Avec l'échantillon FVIII < 1%, des taux de FVIII > 1% (extrême 1.5%) ont été mesurés dans 9% des dosages. Ces valeurs > 1% sont retrouvées avec deux déficients (l'un sans VWF et l'autre avec VWF) et dans 3/6 centres.
 - La valeur médiane de l'échantillon 1% est à 1.7% avec des extrêmes compris entre 0.9 et 7.3%. Dans deux centres les valeurs sont très groupées proches de 1% et ce quelque soit le déficient utilisé alors que dans les 4 autres centres de tels résultats ne sont obtenus qu'avec deux déficients. Les 2 déficients, avec lesquels nous avons dans certains centres des taux de FVIII > 1% pour

des valeurs attendus $< 1\%$, donnent une mesure de FVIII significativement plus élevée comparé aux 2 autres déficients (sans VWF).

- La valeur médiane de l'échantillon 5% est à 6.9% (extrêmes: 1.6% et 21%). Les valeurs extrêmes basses sont dues à de mauvais duplicatas qui doivent être éliminés tandis que les valeurs plus élevées résultent de la même observation que celle décrite avec le point 1%. Pour le point à 5%, le CV de chaque centre varie entre 9.6% et 45%. Le CV de 45% obtenu dans un centre est dû à des valeurs très dispersées des taux de FVIII mesurés avec deux déficients (l'un avec VWF et l'autre sans VWF).
- La valeur médiane de l'échantillon 30% est à 32% avec une répartition gaussienne des valeurs (extrêmes : 24% et 46%). Les CV de chaque centre varient entre 5.5% et 10.6% et nous observons des nuages de points comparables à ceux obtenus avec le CQI Pathologique sans noter d'influence du déficient.
- Enfin avec l'échantillon 80%, nous confirmons la tendance observée avec l'échantillon 30%, c'est-à-dire une absence de variation du taux de FVIII mesuré et ce quelque soit le déficient utilisé.

En conclusion :

1. **La présence du VWF dans le déficient ne semble pas modifier le dosage du FVIII et ce quelque soit le système céphaline/automate utilisé**
2. **La variabilité des dosages inter-centre est moindre avec deux déficients quelque soit la céphaline**
3. Tout au long de cette étude, nous avons observé que dans deux centres les résultats étaient très proches des valeurs cibles et ce quelque soit le déficient utilisé. Ces deux centres n'utilisent pas le même automate mais la même céphaline. **Une céphaline semble donc diminuer considérablement la variabilité du dosage du FVIII avec tous les déficients**
4. **Les recommandations selon lesquelles il est préférable d'utiliser les gammes de réactifs propres à chaque automate ne sont pas soutenues par les résultats de notre étude**
5. A la vue des résultats présentés en préambule, il nous semble très important dans un avenir proche d'exiger de la part de **nos fournisseurs une fiche qualité pour chaque déficient**. Cette fiche est déjà fournie par certains d'entre eux et mentionne les taux mesurés pour chaque facteur de la coagulation présents dans le déficient.

Perspectives :

Une deuxième étude multicentrique est en cours d'élaboration afin d'étudier l'influence de la présence du VWF dans le déficient en FVIII lors de la recherche d'un inhibiteur anti VIII par méthode Bethesda.

2.- Point d'avancement de l'étude multicentrique anti FVIII par méthode ELISA (Claudine Caron)

L'objectif est d'évaluer le coffret FVIII Antibody ® Screen GenProbe-GTI pour la détection précoce d'un anti FVIII chez les enfants hémophiles A sévères PUPs lors des 1^{ères} expositions au FVIII.

Le protocole d'étude a été distribué à tous les participants ; la méthodologie (étude *in vitro* observationnelle prospective effectuée dans le cadre des soins) et la logistique de l'étude (7 centres investigateurs ayant à disposition un coffret GenProbe-GTI) ont été présentées.

Les inclusions ont débuté officiellement en mai 2011, mais le taux d'inclusion est très faible (1 à Lille). Il est donc proposé

- d'élargir l'étude au recrutement rétrospectif, si tous les plasmas sont disponibles, c'est-à-dire avant traitement et jusque 50 JCPA (environ un prélèvement tous les 5 JCPA jusqu'au 20^{ème} puis tous les 10 JCPA jusqu'au 50^{ème})
- d'élargir la participation aux sites non-investigateurs, avec envoi des plasmas pour test à l'un des 7 centres investigateurs (Le Kremlin-Bicêtre, Lille, Lyon, Marseille, Nantes, Paris Necker, Toulouse)

3.- Place des tests chromogéniques dans l'exploration de l'hémophilie constitutionnelle et acquise (Claudine Caron, Catherine Ternisien)

Le développement des substrats chromogéniques a permis le développement du dosage du Facteur VIII par méthode chromogénique (FVIII am). Le principe de cette technique est basé sur une étape d'incubation pour générer du FXa en utilisant du FIXa bovin purifié et du FX. La quantité de FXa générée est proportionnelle au taux de FVIII :C. La quantité de FXa générée est évaluée par l'hydrolyse induite du substrat. Une présentation comparative des 3 réactifs commerciaux principaux (Hyphen, IL et Siemens) en matière de contenu et de performances analytiques a été rapportée; entre ces 3 kits de dosage, il est en particulier souligné les différences des temps d'incubation de l'échantillon dilué avec le réactif activateur (300, 120 ou 90 sec)

Les différents points abordés ont été :

- l'identification des phénotypes discordants dans l'hémophilie A mineure

Dans la grande majorité des cas, le diagnostic d'hémophilie A est assuré par un dosage de FVIII :C par technique chromométrique en 1 temps. Toutefois, la confrontation du F VIII :C avec le FVIII am a permis de déterminer des discordances. Ainsi de telles discordances sont rapportées, soit avec un dosage FVIII :C supérieur

au FVIII am (rapport FVIII :C/FVIII am élevé) soit à l'inverse un dosage de FVIII :C inférieur au FVIII am (rapport FVIII :C/F VIII am abaissé).

a. Discordance avec FVIII :C > FVIII am

Initialement plusieurs auteurs ont montré que le F VIII :C pouvait être mis en défaut dans le diagnostic de l'Hémophilie A. Chez ces patients, le dosage du FVIII am permet de diagnostiquer une hémophilie qui serait passée inaperçue par la technique usuelle. Ce type de discordance serait lié à des mutations situées préférentiellement dans les domaines A1, A2 et A3 du F VIII. Etant donné que la technique chromogénique comprend une phase de pré-incubation avant la mesure, de nombreuses études permettent d'affirmer qu'une augmentation de la vitesse de dissociation du domaine A2 induit une augmentation de l'inactivation du FVIIIa et donc une réduction de l'activité globale. Ce mécanisme d'inactivation serait essentiel dans la régulation in vivo de l'activité du FVIIIa et il a été démontré qu'une augmentation de la dissociation spontanée de la sous unité A2 induit une hémophilie clinique.

b. Discordance avec FVIII :C < FVIII am

Ces anomalies sont liées à une réduction d'affinité du FVIII pour la thrombine. Le dosage du FVIII par méthode chromométrique est extrêmement sensible aux effets d'une fixation insuffisante de la thrombine pour la formation du FVIIIa. En revanche si les temps d'incubation sont prolongés comme dans le test chromogénique l'activation du FVIII est donc accrue et le taux de FVIII mesuré normal. Les conséquences cliniques de cette activation retardée du FVIII restent difficiles à affirmer

- le dosage du FVIII, la détection et le titrage d'un anti-FVIII en présence d'un anticoagulant lupique

L'interférence d'un anticoagulant lupique dans le dosage du FVIII par méthode chromométrique est bien connue ; cette interférence peut se répercuter sur le dosage du FVIII résiduel lors de la recherche d'un anti-FVIII par méthode Bêthesda, et ainsi détecter ou élever faussement le titre d'un antiFVIII. Le test chromogénique permet de s'affranchir de cette interférence ; d'autres solutions ont été discutées comme l'utilisation d'une céphaline insensible aux anticoagulants lupiques pour le dosage chromométrique, ou encore l'apport de phospholipides en excès dans le test chromométrique.

Enfin dans certaines situations où l'association d'un anti-FVIII et d'un anticoagulant lupique est suspectée mais difficile à démontrer, le test ELISA anti FVIII peut alors être un recours.

4.- Interférence des nouveaux anticoagulants sur les dosages des facteurs de la voie endogène et des inhibiteurs de la coagulation: résultats d'une confrontation externe de qualité de l'ECAT (Claudine Caron)

ECAT 2011-2 : plasma normal enrichi par 194 ng/ml de rivaroxaban

	FVIII Chromo	Coag	FIX	FXI	FXII
<i>Nb</i>	11	183	184	177	173
<i>Moy.</i>	59.7%	50.1%	53.6%	40.3%	59.2%
<i>CV</i>	14.1%	23.8%	25%	21%	22.5%
<i>Comparé au CV d'un plasma normal</i>	8.5%	10.7%	12.3%	11.2%	12%

Risque: sujet normal étiqueté déficitaire

	AT antilla	antiXa	PC chromo	coag	Ag	PS Act	AgT	AgL
<i>Nb</i>	158	105	231	77	79	132	87	229
<i>Moy (%)</i>	83.7	102	84.9	115.3	78.8	116.6	80.7	83.8
<i>CV (%)</i>	6.3	7.7	6.1	17.3	9.8	17.4	15.2	10.3
<i>Comparé au CV (%) d'un plasma normal</i>	5.9	6.7	5.4	10.3	11	13.4	15.5	9.4

Risque: sujet déficitaire étiqueté normal

5.- Les performances analytiques diffèrent-elles significativement entre les laboratoires ? Eléments de réponse par le calcul sur les EEQ des incertitudes de mesure (Frédéric Sobas)

Il était convenu que tous les laboratoires envoient à Frédéric Sobas leurs résultats d'EEQ sur le dosage chromométrique en un temps du facteur VIII pour calculer Long term CV (LCV) et biais moyen (B moy) sur au moins 8 exercices des programmes ECAT, Probioqual ou autre programme d'évaluation externe de la qualité. L'objectif via ces calculs de LCV et Bm (agrégés sous la forme d'une somme quadratique correspondant à l'expression d'une incertitude de mesure [IM]) était de quantifier les écarts de performance pouvant exister entre les laboratoires. La méthode de calcul des LCV et Bm utilisée a été celle de P Meijer et al. 2002, méthode présentant l'avantage d'éluder l'hétérogénéité entre les laboratoires en

terme de matériels de contrôles de qualité interne utilisés. 10 laboratoires ont fourni leurs résultats permettant de calculer que le LCV moyen était égal à 6.5 % et que le Bm moyen était égal à 6 %. Il faut noter que malgré l'hétérogénéité entre les laboratoires en terme de participation à tel ou tel programme, le LCV moyen calculé sur cet échantillon de laboratoires est égal au CV inter-essai sur la méthode de dosage et considéré comme étant acceptable par le groupe de travail du GEHT et le référentiel du CRMH en attente de publication. Il a été constaté que les résultats d'IM calculés avec la méthode de Piet Meijer et al. 2002 sont tout à fait comparables à ceux obtenus avec la méthode préconisée par le COFRAC dans le SH GTA 14. Par ailleurs, la valeur de l'IM va fluctuer au sein d'un même laboratoire selon les retours de programme utilisé. Ce résultat complémentaire n'est pas étonnant en regard du fait que les titres en facteur VIII des différents EEQ fournis par les différents organismes d'EEQ embrassent plus ou moins le domaine de mesure du facteur VIII. Il est convenu que Frédéric Sobas réévalue l'IM sur le dosage du facteur VIII en ne prenant en compte les résultats que d'un seul programme d'EEQ / ECAT qui propose la gamme la plus étendue de taux de facteur VIII.

6.- Présentation d'un cas clinique par Fabienne Dutrillaux : « Diagnostic biologique d'un inhibiteur chez un Hémophile A mineur: pertinence clinique? »

7.- Adoption de la charte de fonctionnement du « Club des biologistes en hémostase » par l'ensemble des participants

A l'issue de cette journée, les différents participants ont été sollicités sur les nouvelles thématiques qu'ils souhaiteraient aborder dans le domaine du diagnostic biologique de la maladie hémorragique. En dehors des études en cours dont l'avancement sera présenté lors de la prochaine réunion, le dosage du facteur XI et celui du Willebrand cofacteur de la ristocétine seront à l'ordre du jour ainsi que la revue de la prochaine version du SH GTA 06 qui abordera en outre le management des contrôles de qualité.