

ProBioQual

BP 4016 69615 VILLEURBANNE Cedex
Association régie par la loi du 01/07/1901

Section Contrôle de Qualité
Tél : 04 72 65 34 90 -
Fax : 04 78 85 97 77

e-mail hemostaselprobioqual.com
<http://www.probioqual.com>



CONTROLE HEMOSTASE

Chantal BON

Villeurbanne, le 31 mai 2005

Cher Confrère,

Nous vous adressons ci-joint les réponses aux sujets proposés lors de notre appel à questions, au cours du programme ponctuel 2004.

Les commentaires ont été rédigés avec la participation de Monsieur le Professeur B. BONEU du CHU de Rangueil (TOULOUSE).

Nous espérons que les réponses correspondront à votre attente et restons à votre disposition pour toute question complémentaire.

Chantal BON

FIBRINOLYSE

Ch. BON

▪ **Question**

Quels sont les paramètres actuels de mise en évidence d'une fibrinolyse pathologique ?

▪ **Réponse**

Rappels sur la fibrinolyse

La fibrinolyse intervient de façon physiologique pour assurer la reperméabilisation d'un vaisseau après formation d'un thrombus. La destruction du thrombus fibrinoplaquettaire fait intervenir une enzyme protéolytique, la plasmine, qui provient d'un précurseur inactif, le plasminogène ; le plasminogène est activé en plasmine grâce à l'action d'activateurs plasmatiques ou tissulaires.

La plasmine agit sur la fibrine, mais également sur le fibrinogène, et les facteurs V et VIII de la coagulation, pour lyser le caillot et former des produits de dégradation de la fibrine (D-Dimères) et du fibrinogène.

L'activation du plasminogène survient à la surface et au contact du thrombus fibrineux, et non pas dans le plasma.

Toute génération de plasmine dans le plasma est bloquée par plusieurs systèmes inhibiteurs extrêmement efficaces : inhibiteurs de la plasmine (α_2 – antiplasmine et α_2 – macroglobuline), et inhibiteurs des activateurs du plasminogène.

Il existe également une fibrinolyse cellulaire, au sein même des cellules.

- Les tests d'exploration de la fibrinolyse restent peu nombreux ; ils ont été développés initialement à la recherche d'une hyperfibrinolyse, risquant de s'accompagner de saignements.
On admet qu'une hypofibrinolyse peut accroître le risque thrombotique.

Le temps de lyse des euglobulines ou test de VON KAULLA permet d'apprécier une activité fibrinolytique globale.

La précipitation des euglobulines par dilution et acidification du plasma entraîne l'élimination de la majorité des inhibiteurs de lyse et permet d'évaluer la fibrinolyse ; le temps de lyse est normalement supérieur à 3 heures.

Les syndromes de défibrination peuvent relever de plusieurs processus

- La plupart des accidents hémorragiques par défibrination résultent d'une coagulopathie de consommation (CIVD), provenant d'une activation anormale de la coagulation, aboutissant à une génération excessive de thrombine, et s'accompagnant d'une activation réactionnelle de la fibrinolyse.
Le diagnostic différentiel d'une coagulopathie de consommation se pose essentiellement avec l'insuffisance hépatocellulaire et les défibrinations primitives par fibrinolyse aiguë.

- Les CIVD doivent être évoquées dans certains contextes cliniques particuliers : chirurgicaux, obstétricaux ou médicaux (néoplasiques, septicémies, brûlures étendues). Les modifications biologiques observées peuvent être variables en fonction du degré d'évolution du processus, et c'est souvent la répétition des examens qui permet de faire le diagnostic.

- Le tableau biologique montre une diminution des facteurs consommés lors de la coagulation avec un allongement des tests globaux (temps de Quick, TCA, temps de thrombine) ; le facteur V est le plus sévèrement touché, ainsi que le facteur VIII. Le taux de fibrinogène est soit effondré, soit modérément diminué, selon l'intensité du processus de consommation.

Des tests complémentaires permettent d'affirmer le diagnostic :

- Les plaquettes sont consommées au cours de cette activation de la coagulation, et une thrombopénie de sévérité variable est constatée.

- Le processus de fibrinolyse réactionnelle entraîne l'apparition de produits de dégradation du fibrinogène et/ou de la fibrine (PDF et D-Dimères), qui sont trouvés augmentés dans le plasma.

- Les PDF peuvent se complexer à des monomères de fibrine, formant des "complexes solubles", détectables par agglutination d'hématies sensibilisées, ou gélification du plasma en présence d'éthanol.

Des tests spécialisés, comme la recherche des complexes thrombine/antithrombine, et celle des complexes plasmine/antiplasmine, permettent de faire la différence entre les CIVD à hypercoagulabilité dominante et les CIVD à fibrinolyse dominante.

→ L'insuffisance hépatocellulaire peut donner un tableau proche de celui de la CIVD, parce qu'au déficit en facteurs de la coagulation, peut s'ajouter une thrombopénie par séquestration splénique, ainsi qu'une augmentation du taux de D-Dimères, en raison de dépôts de fibrine dans les espaces extra-vasculaires (ascite).

Toutefois, les D-Dimères ne sont que modérément augmentés et les complexes solubles sont négatifs. Une diminution de l'antithrombine peut être constatée.

→ Les fibrinolyse primitives et aiguës constituent une cause rare du processus de défibrination. Elles sont caractérisées par une hyperfibrinogénolyse, non réactionnelle à une activation de la coagulation, mais secondaire à une libération massive d'activateurs du plasminogène.

En dehors des traitements thrombolytiques, les hémorragies par hyperactivité fibrinolytique circulante sont exceptionnelles, en raison de la grande affinité de la plasmine pour son inhibiteur naturel, l' α_2 – antiplasmine.

L'activation isolée du système de la fibrinolyse peut s'observer chez les insuffisants hépatiques, ou au cours d'interventions chirurgicales, notamment sur le poumon, l'utérus et la prostate, et exceptionnellement au cours d'affections tumorales malignes.

Le tableau biologique montre un fibrinogène effondré, des plaquettes généralement normales, des taux très élevés de PDF (produits de dégradation du fibrinogène), en l'absence de D-Dimères et de complexes solubles, ainsi qu'un temps de lyse des euglobulines très raccourci.

Les PDF allongent considérablement le temps de thrombine ; les facteurs V et VIII sont modérément diminués.

Le tableau ressemble à celui d'une coagulopathie de consommation, mais la numération des plaquettes est normale.

Des complications hémorragiques par hyperactivité fibrinolytique localisée peuvent survenir en cas de présence d'un caillot dans une cavité close ; cette fibrinolyse de contact explique la persistance d'un suintement hémorragique capillaire.

Des observations de déficit congénital en α_2 – antiplasmine, ont été rapportées. Ce déficit autosomal récessif est responsable de manifestations hémorragiques sévères spontanées et provoquées ; le traitement repose sur l'utilisation d'inhibiteurs de la fibrinolyse.

- Hypofibrinolyse

Une diminution de l'activité fibrinolytique est observée chez environ 10 à 30 % des patients ayant des accidents thromboemboliques veineux, généralement par augmentation de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1).

Cependant, ce pourcentage est identique chez les sujets sains, et actuellement, la recherche d'une hypofibrinolyse ne fait plus partie du bilan de thrombophilie.

Tous les facteurs de la fibrinolyse peuvent être explorés dans les laboratoires spécialisés : plasminogène, activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et son inhibiteur (PAI-1), α_2 – antiplasmine ; il existe des méthodes immunologiques et des méthodes fonctionnelles.

Un test, commercialisé par D STAGO, permet d'évaluer l'activité fibrinolytique globale ; il est disponible sous forme d'un kit : appelé "capacité fibrinolytique globale".

Ce test, conçu pour mettre en évidence une hypofibrinolyse, mesure les D-Dimères générés à partir d'une quantité de fibrine standardisée ; il s'agit d'une méthode semi-quantitative.

RÉSISTANCE À LA PROTÉINE C ACTIVÉE

B. BONEU

▪ **Question :**

Certains cliniciens nous demandent une recherche de la mutation facteur V Leiden, sans recherche de la résistance à la protéine C activée, plus à notre portée, en tant que laboratoire de proximité. Pourquoi ? Ont-ils raison de pratiquer ainsi ?

▪ **Réponse :**

La protéine C activée est un enzyme qui protéolyse le facteur V et le facteur VIII. En présence de protéine C activée, le TCA s'allonge d'un certain facteur. Il s'allonge moins en cas de mutation du facteur V et on dit qu'il y a résistance à la protéine C activée (rPCa). Trois à quatre pour cent de la population est porteur de cette mutation facteur V Leiden dont on sait qu'elle constitue un facteur de risque de thrombose veineuse (risque relatif 4 à 5).

Au fil des années les tests de rPCa ont évolué. Les tests de première génération consistaient à faire un TCA en l'absence et en présence de PCa. Ces tests étaient peu spécifiques, car sensibles à toutes les causes d'allongement du TCA. Notamment ces tests étaient ininterprétables en cas de traitement AVK. Les tests de deuxième génération font appel à un plasma dépourvu de facteur V dans lequel on dilue le plasma à tester. Le plasma dépourvu en facteur V est censé normaliser les éventuelles anomalies du plasma à tester et ce test devient plus spécifique de la mutation V Leiden. Ce test est interprétable même en cas de traitement AVK. Les tests de troisième génération ne reposent plus sur le principe du TCA mais font intervenir un venin de serpent activateur direct du facteur X. La spécificité de ces tests pour détecter la mutation facteur V Leiden augmente entre la première et la troisième génération.

Il a été décrit des rPCa indépendamment de la mutation facteur V Leiden. Ces observations ont été faites principalement avec les tests de première génération. Les augmentations de taux de facteur VIII, fréquemment observées chez les patients qui présentent des phlébites constituent un des facteurs qui peut expliquer ce phénomène, mais il y a probablement d'autres causes actuellement inconnues. Ces rPCa indépendantes de la mutation facteur V Leiden constituent pour certains un facteur de risque de thrombose veineuse indépendant.

Compte tenu de la forte prévalence de la mutation facteur V Leiden dans la population, les cas d'homozygotie ne sont pas exceptionnels et alors le risque relatif de thrombose veineuse est fortement augmenté (risque relatif 50 à 100). Les tests biologiques de détection du phénomène rPCa distinguent mal les hétérozygotes et les homozygotes. Or cette distinction est très importante pour les décisions thérapeutiques concernant le traitement AVK. C'est pour cela que certains prescripteurs demandent d'emblée la recherche de la mutation facteur V Leiden en négligeant le test biologique de rPCa.

Il existe une deuxième mutation au niveau du gène de la prothrombine indépendante du facteur V Leiden dont la prévalence dans la population est comprise entre 1 et 2%. Chez ces patients, le taux de facteur II est modérément augmenté, mais la mesure du taux de facteur II insuffisamment sensible et spécifique pour détecter cette mutation qui constitue également un facteur de risque de thrombose veineuse (risque relatif 3 à 4). La problématique de la mutation facteur II (hétéro-homozygote) est la même que celle du facteur V Leiden. Ces deux mutations peuvent également être associées chez un même patient ce qui constitue un facteur de risque plus important.

Ces considérations peuvent justifier les demandes directes de recherche de mutation sans passer par le test de rPCa. Dans le projet de révision de la nomenclature, ces examens d'hémostase figureront. Le texte est prêt depuis plus de deux ans et n'est toujours pas sorti à ce jour (01.01.05).

TEMPS DE SAIGNEMENT

B. BONEU

▪ **Question :**

Nous réalisons actuellement les temps de saignement IVY 3 points avec des microlances BD qui ne sont plus commercialisés. Que préconisez-vous à part le PFA100 Surgicutt ou Microlances ?

▪ **Réponse :**

La valeur prédictive du temps de saignement pour évaluer le risque hémorragique lié aux anomalies quantitatives et qualitatives des plaquettes et pour détecter les maladies de Willebrand est actuellement très critiquée. Ce test est peu reproductible, opérateur dépendant, et il ne permet pas de prédire le risque hémorragique lié à la prise d'un antiagrégant (Aspirine, Plavix).

Dans le projet de révision de la nomenclature le test de Duke a été supprimé ; les méthodes de IVY 3 points et IVY incision ont été conservées. Ne pratiquant plus les IVY 3 points depuis longtemps, nous ne savions pas que le matériel (microlances) n'existait plus. Le matériel Simplate (Organon) n'est plus distribué. Nous utilisons donc la méthode d'IVY incision avec Surgicutt.

Le test PFA100 est plus sensible que le temps de saignement pour détecter la prise d'aspirine, mais il est insensible au Plavix. Par contre il est beaucoup plus sensible que le temps de saignement pour détecter une maladie de Willebrand. En pratique un résultat normal de PFA100 élimine une maladie de Willebrand.

A noter dans le projet de révision de la nomenclature le temps de saignement par la méthode de IVY a été réévalué et le test de PFA100 a été introduit avec la même cotation. Ces deux tests seront exclusifs l'un de l'autre.

ANTICOAGULANTS CIRCULANTS

B. BONEU

▪ **Question :**

Nous réalisons actuellement la recherche des anticoagulants circulants en faisant le test de Rosner avec le PTT-LA de STAGO, et le TTD, avec le réactif Thromborel de D. Behring.

Nos TTD sont plus difficilement positifs que les tests de Rosner.

Quels réactifs préconisez-vous pour la réalisation des ACC ?

▪ **Réponse :**

Il s'agit en effet d'un problème important puisque la recherche d'un anticoagulant circulant (ACC) fait désormais partie du bilan de thrombophilie et les fausses couches à répétition. Si on teste un même plasma contenant un ACC avec 10 réactifs TCA différents, il est possible que l'ACC sera mis en évidence par 8 réactifs et ignoré par 2 réactifs. Ceci est dû à l'hétérogénéité des ACC et à l'hétérogénéité des phospholipides constituant le réactif céphaline. Le PTT-LA de Stago est un réactif TCA optimisé pour la détection des ACC. Vous faites probablement bien de l'utiliser pour le calcul de l'index de Rosner. Nous ne savons pas si cette hétérogénéité de réponse s'observe également pour les thromboplastines que l'on utilise pour réaliser un TTD. Il est difficile de préconiser un réactif pour la recherche et la caractérisation d'un ACC antiphospholipide. En raison de la variation des réponses des réactifs la recommandation officielle est d'utiliser au moins deux réactifs phospholipides dépendants et de principe différent.

Pour la pratique, il faut distinguer deux situations. Dans la première, il existe un allongement du TCA et un Rosner positif. Il est généralement facile, dans la plupart des cas, de mettre en évidence la nature phospholipidique de l'anticoagulant en utilisant soit le TTD (peu onéreux) soit l'un des réactifs spécifiques proposés par les fabricants qui font intervenir un excès de phospholipide qui normalise le temps de coagulation (temps de céphaline activée ou temps de Stypven réalisé avec un venin de vipère Russel). Dans la seconde situation, où le TCA standard est normal, on doit faire deux tests différents avant d'éliminer le diagnostic d'ACC. La stratégie diffère selon les équipes. A titre d'exemple, à l'hôpital Purpan de Toulouse la stratégie est de faire un PTT-LA puis un LAC screen-LAC confirm (IL) ; à l'hôpital Rangueil, la stratégie est de faire un TTD (témoin Behring, thromboplastine Behring) suivi d'un LAC screen LAC-confirm. Le LAC est un temps de Stypven.

Compte tenu de ces problèmes méthodologiques nous recommandons de ne faire ces recherches qu'en l'absence de traitement antivitamine K et héparinique. Pour tenir compte de ces difficultés et du prix des réactifs utilisés, le projet de révision de la nomenclature des actes d'hémostase a demandé une réévaluation significative pour la caractérisation des ACC.

THROMBOPHILIE

B. BONEU

▪ **Question :**

Interprétation des bilans de thrombophilie; interférences médicamenteuses et variations physiologiques

▪ **Réponse :**

Le bilan de thrombophilie comprend l'évaluation des 3 inhibiteurs (antithrombine, Protéine C, Protéine S) la recherche des mutations facteur V Leiden et de la prothrombine, la recherche d'un ACC et des anticorps antiphospholipides, le dosage de l'homocystéine. Certains y ajoutent le dosage de facteur VIII parce qu'il a été montré que les fortes augmentations de facteur VIII (> 150%) constituent un facteur de récurrence. Il a également été rapporté que les augmentations de facteur IX et XI étaient un facteur de récurrence, toutefois moins important que celle du facteur VIII.

Plusieurs facteurs peuvent modifier les résultats d'un bilan de thrombophilie. L'héparine peut faire baisser le taux d'antithrombine, l'héparine non fractionnée plus que les HBPM. Les AVK diminuent toujours les taux de protéine C et protéine S qui sont alors ininterprétables. A l'arrêt du traitement, le taux de protéine C dont la demi-vie est courte remonte beaucoup plus vite que le taux de protéine S. En pratique, il faut un sevrage des AVK pendant au minimum 10 jours, mieux 15 jours, pour éviter cette interférence médicamenteuse. Les résultats de dosage de ces 3 inhibiteurs sont ininterprétables en cas d'insuffisance hépatocellulaire puisqu'ils sont synthétisés par le foie.

Le taux de protéine S est très sensible aux conditions préanalytiques. Il n'est pas rare que nous ayons à vérifier de faux taux abaissés de protéine S lorsque le prélèvement a été adressé à un laboratoire qui centralise ces analyses. Les augmentations de taux de facteur VIII sont également décapitées si le prélèvement n'est pas congelé rapidement et maintenu congelé jusqu'au dosage. Le taux de protéine S diminue fortement dès le début de la grossesse. Un taux bas de protéine S chez une femme enceinte est ininterprétable.

Le taux de protéine S peut diminuer en phase aiguë de thromboembolisme parce que l'état inflammatoire augmente le taux de facteur VIII et cette augmentation peut faire baisser le taux mesuré de protéine S. La limite inférieure de normalité est plus basse chez la femme que chez l'homme, chez la femme jeune que chez la femme ménopausée. Le taux de protéine S diminue en cas de contraception orale par oestroprogestatif. Pour notre laboratoire, nous avons fixé la limite inférieure de normalité à 55% pour la femme jeune, 60% pour la femme ménopausée, 65% pour l'homme. La contraception orale par oestroprogestatif peut faire encore baisser ces taux de 10%. On voit donc que il peut y avoir confusion entre un authentique déficit en protéine S et une limite inférieure de normalité chez la jeune femme. Dans ces cas, il convient de refaire le dosage après suppression d'oestrogenothérapie pendant 3 cycles, ou d'effectuer une enquête familiale chez les parents puisque l'hérédité est autosomale dominante.

Pour la protéine C, il y a également confusion entre la limite inférieure de normalité et le début des déficits congénitaux, mais les problèmes sont ici moins fréquents qu'avec la protéine S. La limite inférieure de normalité est à 70%.

Tout ceci explique pourquoi nous recommandons de ne réaliser le bilan de thrombophilie que à distance de l'épisode thromboembolique, dans des conditions stables, après sevrage des AVK pendant 10 à 15 jours, avec éventuellement un relais par HBPM à dose préventive. En effet, la découverte d'une thrombophilie ne modifie ni le traitement d'attaque ni le traitement de consolidation par AVK, mais seulement éventuellement la prévention secondaire.

Ch. BON

1. INR anormalement élevé

▪ Question

"J'ai eu un problème d'INR anormalement élevé (INR à 16), avec un patient traité aux antivitamines K + Calciparine. Sa fibrine était à 5,7 g/l ; le TCA ne coagulait pas.

Un deuxième prélèvement, 3 heures plus tard, a donné les mêmes résultats d'INR.

Le lendemain, j'ai transmis le plasma à un laboratoire de ville, qui a trouvé des INR à 5,81 et 4,91, qui semblent plus réalistes.

J'utilise un appareil OPTION 8 et la Simplastin Excel de BIOMERIEUX.

Avez-vous une idée de l'origine de ce problème ? "

▪ Réponse

Du fait d'un traitement par les deux anticoagulants (AVK et héparine), ce patient avait des tests globaux (temps de Quick et TCA) très allongés.

Le TCA incoagulable et le temps de Quick très long (INR à 16), peuvent s'expliquer par une fragilité du caillot de fibrine dans la cupule réactionnelle, bien que le taux de fibrinogène ne soit pas abaissé.

Il est vraisemblable également que les réactifs que vous utilisez soient en cause (une thromboplastine et une céphaline sensibles), de même que le mode de détection du caillot de l'automate OPTION 8.

Le laboratoire qui a fait les tests en seconde intention, utilisait probablement une thromboplastine moins sensible, avec des temps de coagulation plus courts, et un automate dont le mode de détection est différent, moins sensible à la qualité du caillot.

2. Patients normaux avec TP entre 85 et 95 %

▪ Question

"Nous avons des contrôles de qualité, normaux et pathologiques, qui sont corrects en ce qui concerne le taux de prothrombine, et je remarque qu'une grande majorité des patients à priori "normaux" (bilan préopératoire) ont des TP entre 85 et 95 % et rarement 100 %.

Est-ce dû à la précision de l'appareil START 4 et au réactif Néoplastine CI Plus, ou bien à une mauvaise calibration de l'appareil ? "

▪ Réponse

Les valeurs normales du taux de prothrombine sont généralement données entre 70 % et 100 %, car un allongement de 2 secondes par rapport au témoin, suffit à abaisser le taux de prothrombine aux environs de 70 %.

Des patients avec des TP entre 85 % et 95 % peuvent être considérés comme tout à fait normaux.

Cependant, un certain nombre de patients "normaux" devraient avoir des TP à 100 %, et même au-delà de 100 % (temps de Quick inférieur au temps témoin).

Peut-être devriez-vous revoir votre temps témoin et l'allonger de quelques dixièmes de secondes; la droite d'étalonnage sera légèrement déplacée sans que la pente soit modifiée. Cela peut suffire pour que vos patients normaux aient des TP à 100 %, et les résultats de vos contrôles (soit en TP, soit en INR) ne devraient pas être significativement modifiés.

A titre indicatif, au cours des différents contrôles ponctuels, le réactif Néoplastine CI Plus donne un temps témoin compris entre 12 et 14 secondes, selon les lots et les automates.

Dernière enquête de Novembre 2004 : pour le groupe Néoplastine CI Plus/ST4, le témoin pour temps de Quick a une valeur moyenne à 12,54 secondes (limites entre 11,29 et 13,79 secondes).

3. INR et ISI

▪ **Intérêts et inconvénients de l'utilisation d'un réactif thromboplastine avec ISI proche de 1.**

Différentes thromboplastines sont actuellement commercialisées. Selon leur origine et leur préparation, elles présentent des sensibilités différentes, vis-à-vis des déficits induits par les antivitamines K, en particulier vis-à-vis des déficits en facteur VII et en facteur X.

Actuellement, il existe 3 groupes de thromboplastines.

• Thromboplastines à ISI élevé, proche de 2

Elles sont d'origine animale (lapin).

Exemples : Néoplastine CI (STAGO)
IL TP Fib (IL)
Simplastin Excel (Biomérieux)
Thrombomax calcique (Ingen)

• Thromboplastines à ISI faible

→ Soit ISI proche de 1

Exemple : Thromborel (Dade Behring), d'origine placentaire humaine.

→ Soit ISI entre 1,2 et 1,4

Elles sont d'origine animale.

Exemples : Néoplastine CI Plus (Stago)
IL TP Fib HS (IL)
Simplastin Excel S (Biomérieux)
Thromboplastine HS (Ingen)

• Thromboplastines recombinantes, à ISI égal à 1

Exemples : Innovin (Dade Behring)
Recombiplastine (IL)

Ces thromboplastines recombinantes sont constituées du même facteur tissulaire obtenu par génie génétique, mais elles diffèrent par la nature des phospholipides ajoutés aux préparations, et elles ne sont pas identiques en termes de sensibilité. Les thromboplastines recombinantes restent encore très peu utilisées.

→ Actuellement, les experts internationaux recommandent l'utilisation de thromboplastines à ISI faible :

- ♦ Elles ont une pente plus importante que les thromboplastines à ISI élevé et une meilleure sensibilité aux déficits en facteurs VII et X ; une thromboplastine à ISI 1 a, théoriquement, une sensibilité identique ou très proche de celle de la thromboplastine de référence internationale.
- ♦ Un coefficient ISI faible, soit égal à 1, soit très proche de 1, atténue les erreurs liées au calcul de l'INR, alors qu'un ISI élevé les amplifie. L'INR ne corrige pas les erreurs analytiques (erreurs de mesure).

→ Certaines thromboplastines à ISI proche de 1 peuvent cependant avoir l'inconvénient de donner des temps de coagulation longs, à l'origine d'une certaine imprécision, mais cela est compensé par les performances analytiques actuelles des machines.

→ Les thromboplastines à ISI proche de 1 donnent généralement des résultats en pourcentage plus faibles que les thromboplastines à ISI élevé pour les patients sous AVK, et cela peut encore désorienter certains cliniciens, bien que les recommandations soient clairement de n'utiliser que l'INR;

→ Théoriquement, l'utilisation de thromboplastines à ISI faible devrait conduire à des CV plus faibles pour l'INR que les thromboplastines à ISI élevé. Cependant, les résultats des contrôles de qualité ne montrent pas de supériorité de l'une ou l'autre des thromboplastines (ISI bas ou élevé), en termes de dispersion des résultats d'INR. Il semble que ce soit plutôt la détermination exacte de l'ISI pour un couple réactif/automate qui soit un facteur important de standardisation. L'indication précise, par un fabricant, de la valeur d'ISI pour un ensemble thromboplastine/appareil, réduit la dispersion interlaboratoire pour le groupe concerné.

▪ **Procédure détaillée de recalcul de l'ISI. Conditions pour obtenir une homogénéisation interlaboratoires des résultats d'INR.**

L'expression en INR a permis une hiérarchisation des zones thérapeutiques en fonction du contexte clinique, pour les patients sous AVK ; elle est adoptée sur le plan international.

Cependant, la dispersion des résultats d'INR reste encore trop élevée.

- L'ISI est affecté par différents problèmes de standardisation : la détermination d'un ISI correct dépend de la précision de la calibration de la thromboplastine commerciale par le fabricant, par rapport à la thromboplastine de référence internationale.
- Le calcul de l'INR nécessite le calcul du temps témoin et la détermination de l'ISI local. L'ISI est influencé par l'instrument ; le système INR a été à l'origine développé pour la détermination manuelle du temps de Quick. Il peut exister une certaine variabilité de l'ISI en fonction des automates, et même entre deux instruments de même type et de même marque.

Le recalcul de l'ISI local est possible grâce à des plasmas lyophilisés, titrés en INR. Ils peuvent être de plusieurs origines : soit ils proviennent de patients sous traitement AVK équilibré, soit ils sont préparés à partir de plasmas normaux et artificiellement déplétés en facteurs vitamine K dépendants.

Les fabricants proposent généralement avec leur thromboplastine, des plasmas titrés en INR sous forme d'un kit, avec 2, 3, ou 4 niveaux d'INR. Chacun des plasmas est testé ; le temps de Quick et l'INR sont mesurés avec le système local instrument / réactif.

Si les valeurs obtenues d'INR sont différentes des valeurs théoriques, l'ISI peut être recalculé :

$$ISI = \frac{\text{Log INR théorique Etalon 1}}{\text{Log} \left(\frac{\text{temps mesuré Etalon 1}}{\text{temps témoin}} \right)}$$

L'ISI local peut être déterminé à partir de la moyenne des valeurs d'ISI obtenues pour chacun des étalons. Ce recalcul de l'ISI est généralement effectué avec l'aide du fabricant.

- Remarques importantes : on peut cependant recommander actuellement aux biologistes de n'utiliser des plasmas titrés en INR qu'avec une thromboplastine de même marque, c'est-à-dire de ne faire une correction de l'indice ISI que dans un système homogène thromboplastine/calibrant du même fabricant.

Chacun des fabricants doit fournir, avec une thromboplastine donnée, des plasmas titrés en INR.

Ces procédures de calibration ne doivent pas conduire à des modifications importantes de l'indice ISI, mais seulement à un réajustement, afin de tenir compte d'un effet propre à l'automate du laboratoire.

Toute calibration entre réactifs et calibrants de marques différentes est "à risque" et doit être évitée.

- La détermination de l'INR grâce à une calibration directe en INR permettrait vraisemblablement une meilleure homogénéisation des résultats.

Cette procédure évite le recalcul de l'ISI local et ne nécessite pas de connaître la valeur du témoin ; elle est basée sur l'hypothèse d'une relation linéaire entre le logarithme décimal des temps de Quick et le logarithme décimal des INR des mêmes plasmas.

Des plasmas calibrants, d'INR connu et indiqué par le fabricant sont testés avec le système local instrument/réactif.

Les temps de Quick sont reportés en abscisse, les INR étant reportés en ordonnée et une droite de calibration est construite en coordonnées logarithmiques. Les INR des plasmas à tester peuvent être obtenus directement à partir de cette droite.

Cette procédure des plasmas calibrants en INR est en cours de validation à l'échelon national et international ; elle nécessite cependant une adaptation des logiciels informatiques des automates, afin de disposer d'une droite de calibration en INR.

▪ **Etat actuel de la dispersion des résultats d'INR au cours des enquêtes de PROBIOQUAL**

Dans les tableaux ci-dessous, sont présentés les valeurs-cibles et coefficients de variation "toutes techniques", obtenus pour l'expression en TP et en INR, au cours du programme permanent 2005, et au cours du programme ponctuel 2004 (lots III et IV)

Programme permanent 2005	Niveau 1	Niveau 2
Nombre de valeurs	3109	2836
TP	49,83 %	24,34 %
CV %	5,7 %	7,4 %
Nombre de valeurs	2 993	2 501
INR	1,73	3,65
CV %	3,7 %	7,7 %

Lot III Ponctuel 2004	Plasma AD	Plasma AH	Plasma AM
Nombre de valeurs	503	522	501
TP	42,6 %	42,8 %	42,9 %
CV %	5,1 %	5,0 %	4,4 %
INR	2,05	2,03	2,03
CV %	6,3 %	5,4 %	5,9 %

Lot IV Ponctuel 2004	Plasma AB	Plasma AF	Plasma AK	Plasma AP
Nombre de valeurs	516	523	507	493
TP	22,2 %	22,4 %	22,6 %	22,4 %
CV %	7,6 %	7,3 %	7,5 %	7,8 %
INR	4,23	4,22	4,18	4,18
CV %	7,3 %	6,4 %	6,9 %	7,4 %

Au cours de ces différentes enquêtes, la dispersion des résultats d'INR reste acceptable :

- pour des valeurs d'INR à 2, les CV sont proches de **6 %**.
- lorsque les INR sont compris entre 3 et 4,5, les CV atteignent 7 % ; ils sont légèrement inférieurs à ceux du taux de prothrombine pour le lot IV.

L'idéal serait cependant d'avoir des CV **inférieurs à 5 %**, pour une meilleure homogénéisation des INR.

ZONES THÉRAPEUTIQUES D'INR

B. BONEU

▪ **Question :**

Quelles sont actuellement les zones thérapeutiques d'INR recommandées pour les traitements aux AVK ?

Les recommandations de l'AFSSAPS (2001) donnent un INR compris entre 3 et 4,5 pour les prothèses valvulaires mécaniques, alors que les recommandations américaines de l'ACCP sont en faveur d'un INR entre 2,5 et 3,5 (cible à 3,0) dans la même indication.

Y-a-t-il un consensus sur les valeurs attendues et recommandées d'INR ?

Quelles sont les zones thérapeutiques à recommander, afin d'éviter les accidents inhérents aux traitements AVK ?

▪ **Réponse :**

Il y a effectivement des choses nouvelles dans ce domaine.

1. Pour le traitement de consolidation d'un épisode de thrombose veineuse-embolie pulmonaire, pour prévention des embolies consécutives à un trouble du rythme cardiaque la règle reste l'INR compris entre 2 et 3.
2. Après la fin du traitement curatif d'une maladie veineuse thromboembolique de survenue idiopathique il y a un risque de récurrence qui est de l'ordre de 5 à 7 pour 100 patients-année. Le maintien du traitement AVK réduit cette incidence à moins de 1 pour 100 patients-année. Les experts discutent pour savoir si il faut maintenir l'INR entre 2 et 3 ou bien entre 1.5 et 2. Un essai clinique a montré que la stratégie INR 2-3 était plus efficace que la stratégie 1.5-2 et pas plus grevée d'incident hémorragique. Un autre essai clinique a clairement montré que la stratégie 1.5-2 était très significativement plus efficace qu'un placebo (l'essai clinique a été arrêté par le comité d'éthique). Les experts de l'ACCP (American College of Chest Physicians) ont tranché en faveur de l'INR 2-3. L'AFSSAPS n'a pas pris position sur ce problème. En réalité cette discussion concerne le clinicien ; le biologiste surveille.
3. Pour le traitement des épisodes thrombotiques survenant en association avec un ACC (syndrome des antiphospholipides), autrefois on conseillait une fourchette d'AVK entre 3 et 4.5 ; aujourd'hui, on conseille une fourchette 2-3.
4. Pour les valvulopathies et les porteurs de valves, effectivement les recommandations récentes de l'ACCP sont à la baisse par rapport à la fourchette antérieure de 3-4.5. Cela est dû à l'évolution permanente des matériaux prothétiques utilisés. L'AFSSAPS n'a pas encore pris position sur ce problème. Cette discussion concerne le cardiologue et non par le biologiste.

SURDOSAGE AUX AVK

B. BONEU

▪ **Question :**

Conduite à tenir ; rôle du laboratoire

▪ **Réponse :**

L'enquête diligentée par l'AFSSAPS en 2001 auprès de 436 laboratoires d'analyse médicale a révélé que lorsque la fourchette d'INR est comprise entre 2 et 3, seulement 43 % des INR sont corrects, 25 % sont insuffisants et 33 % sont trop élevés ; lorsque la fourchette d'INR est comprise entre 3 et 4,5, seulement 36 % des INR sont corrects, 48% sont insuffisants et 16% sont trop élevés. Le surdosage en AVK est donc un problème quotidien. Une fois sur deux le biologiste ne connaît pas l'indication du traitement et donc la zone thérapeutique souhaitable. Trop souvent le biologiste n'agit qu'en prestataire de service et non comme un partenaire actif susceptible de contribuer à un meilleur équilibre du traitement.

La conduite à tenir en cas de surdosage varie selon l'importance du surdosage. Outre l'obligation morale faite au biologiste d'avertir dans les meilleurs délais le prescripteur, les mesures à prendre vont de la réduction de la dose, à la suspension transitoire du traitement, à l'administration de vitamine K, à l'administration de Kaskadil® (anciennement nommé PPSB). Ces mesures sont de la responsabilité du prescripteur. A noter que les indications thérapeutiques sont dictées par la valeur absolue de l'INR. On ne traite pas de la même façon un patient dont l'INR est compris entre 5 et 9, entre 10 et 20 ou supérieur à 20. Le biologiste doit donc donner la valeur de l'INR et non pas un résultat tel que par exemple $INR > 9$. Par ailleurs, les doses de Kaskadil à administrer sont calculées à partir du Taux de Prothrombine. En cas de surdosage, le biologiste doit donc donner non seulement l'INR mais aussi le TP, malgré l'arrêté du 11 juin 2003 qui exige que le résultat d'une surveillance de traitement AVK ne soit exprimé qu'en INR.

TEMPS DE CEPHALINE ACTIVÉE

B. BONEU

▪ **Question :**

Avec le réactif céphaline PTT Automate de STAGO, des allongements relativement fréquents des TCA sont constatés (ratio M/T supérieur à 1,20).

Un TCK réalisé parallèlement avec le réactif CK-Prest de STAGO donne un résultat souvent normal ; ceci est en faveur d'un anticoagulant circulant.

Les autres laboratoires constatent-ils ces allongements du TCA ?

S'agit-il d'anticoagulants circulants transitoires lors des maladies intercurrentes ?

Interprétation des résultats TCA et TCK chez l'adulte et chez l'enfant.

▪ **Réponse :**

Encore une question importante qui appelle de nombreux commentaires.

1. La distribution des TCA dans une population saine n'est pas gaussienne, mais log-normale. Cela signifie que il y a plus de sujets dont le TCA est allongé que de sujets dont le TCA est raccourci. Par convention on considère que le TCA est allongé lorsqu'il est supérieur à 1.2 fois le temps témoin, soit pour un témoin à 34 secondes, au-delà de 41 secondes. Attention ceci a une valeur statistique et non pas individuelle. Une maladie Willebrand dont le taux de facteur VIII est à 50% peut avoir un TCA dans la zone de normalité. L'interrogatoire à la recherche de symptôme hémorragique reste donc très important.
2. Il est vrai que pour ces TCA douteux, entre 38 et 45 secondes, le TCK est normal 2 fois sur 3. Ceci élimine en principe une altération significative du bilan d'hémostase. Dans notre laboratoire, nous réalisons un TCK pour confirmer ou éliminer un allongement du TCA sur 2% à 4% des prélèvements.
3. Nous ne pensons pas que la discordance TCA-TCK soit le reflet de la présence d'un ACC. En réalité, nous ne pouvons pas l'affirmer car quand le TCK normalise l'allongement du TCA, nous ne poursuivons pas vers le diagnostic d'un allongement de TCA.
4. Il est vrai que le TCA est plus long de quelques secondes chez l'enfant que chez l'adulte. Ainsi, dans le cadre d'un bilan d'hémostase préopératoire chez un enfant qui n'a jamais été opéré, on sera plus enclin à poursuivre le bilan pour éliminer un ACC, fréquent à cet âge après virose saisonnière, et éliminer un déficit en VIII, IX, XI, XII, encore que les déficits en XII peuvent être négligés car non hémorragiques .

TEMPS DE CEPHALINE ACTIVÉ

Ch. BON

1. Etude comparée des différents réactifs céphalines disponibles sur le marché, en fonction des critères suivants : sensibilité aux déficits en facteurs, sensibilité aux anticoagulants.

Les céphalines les plus sensibles aux déficits sont les réactifs à activateur particulaire (kaolin, silice micronisée ou silice colloïdale).

Avec un réactif donné, le TCA peut être plus ou moins sensible au déficit en l'un ou l'autre des facteurs de la voie intrinsèque, et il est difficile de classer les réactifs en fonction de leur sensibilité globale ; ces données sont généralement indiquées par les fabricants.

Pour la recherche des anticoagulants circulants (ACC), la sensibilité des réactifs varie en fonction du type et de la concentration des phospholipides contenus dans la céphaline, ainsi qu'en fonction de la nature de l'activateur : le kaolin est le moins sensible des activateurs pour la recherche des ACC et il est préférable d'utiliser des céphalines à activateur liquide (silice ou acide ellagique).

Pour la détection des ACC, il est recommandé d'utiliser une céphaline sensibilisée, comme le PTT-LA de Diagnostica Stago.

Si le laboratoire réalise régulièrement des surveillances de traitement à l'héparine, le choix d'une céphaline sensible, à activateur silice, est recommandé.

Les réactifs contenant du kaolin comme activateur ne sont pas sensibles à l'héparine.

Les réactifs trop sensibles peuvent cependant avoir des inconvénients, avec le risque de donner des TCA incoagulables et ininterprétables.

Dans ces conditions, pour le choix du réactif, il convient de prendre en compte le couple réactif/instrument et le mode de détection du caillot (détection optique ou mécanique).

2. Conditions pour obtenir une homogénéisation interlaboratoire des résultats de TCA

Cette homogénéisation est impossible, car le TCA est un examen réactif – dépendant, et il n'y a pas de processus de standardisation.

Les résultats d'un réactif ne peuvent être comparés à ceux d'un autre, et en contrôle de qualité, les laboratoires doivent se reporter à la valeur-cible du réactif considéré.

La valeur-cible "toutes techniques" n'a qu'une valeur indicative ; elle ne peut être utilisée pour contrôler l'exactitude des résultats.

Exemple des plasmas AN et AP de l'enquête de Novembre 2004.

- Plasma AN : les valeurs cibles vont de 37 secondes (IL Synthafax) à 52 secondes (Pathromtin de Dade Behring), pour une moyenne, tous réactifs confondus, à 47,7 secondes (CV : 8,2 %).
- Plasma AP : les valeurs-cibles sont comprises entre 57 secondes (CK Prest de Stago) et 104,4 secondes (Pathromtin de Dade Behring) pour une valeur-moyenne à 68,4 secondes (CV : 10,8 %).

Pour un même réactif, le TCA peut aussi être variable selon l'automate et le mode de détection.

Autre remarque : quand on veut tester une céphaline (sensibilité à l'héparine, aux déficits en facteurs...), il est nécessaire d'utiliser des plasmas frais ; les plasmas lyophilisés peuvent toujours avoir un comportement particulier avec certains réactifs.

3. Question

"Comment interpréter, chez un enfant, l'allongement d'un TCA (témoin + 8 à 9 secondes), corrigé par addition d'un plasma témoin".

- Chez l'enfant, les temps de coagulation, et en particulier le temps de céphaline activé sont physiologiquement plus longs que chez l'adulte ; car les taux des facteurs de la coagulation sont en moyenne, un peu plus bas que chez l'adulte.

Devant un TCA allongé chez l'enfant et en cas d'intervention, il est préférable de faire le dosage des facteurs différentiels du TCA (en particulier si l'interrogatoire conduit à suspecter un risque hémorragique).

4. Question

"Que faire devant des résultats de TCA systématiquement allongés par rapport aux contrôles, malgré un changement de réactif".

Dans ces conditions, il est nécessaire de :

- s'assurer des conditions de reprise et de conservation des contrôles eux-mêmes,
- vérifier les conditions de réalisation du test (s'agit-il d'une technique manuelle ?),
- enfin, mettre en cause l'automate si la technique est automatisée (distribution du réactif, température...).

PROBLEMES TECHNIQUES

Ch. BON

▪ **Question**

"Les quantités de plasma de contrôle disponibles sont souvent insuffisantes pour réaliser l'ensemble des paramètres (TP, TCA, fibrinogène, facteurs différentiels, antithrombine, protéines C et S)".

Serait-il possible de scinder en deux flacons pour la réalisation sur 2 jours différents."

Pour les laboratoires qui souhaitent contrôler l'ensemble des paramètres, nous proposons, lors de l'inscription, un second coffret, à un coût inférieur ; cela permet de disposer de deux flacons pour chacun des tests et de différer les analyses qui sont réalisées moins fréquemment, comme les protéines C et S et les facteurs différentiels du TCA.

Les analyses plus spécialisées ne concernent en effet que 20 à 25 % des laboratoires inscrits.

PROBLEMES D'EXPRESSION DES RESULTATS

Ch. BON

1. *"Souhait de ne pas réinscrire les codes techniques pour les témoins du temps de Quick et du TCA, et pour l'INR"*

Le codage est obligatoire pour la prise en compte des résultats.

Dans la mesure où le laboratoire n'indique pas de codage pour l'INR ou les temps témoins Quick et TCA, les codes techniques, soit du temps de Quick, soit du TCA, sont repris par défaut, bien entendu.

Pour la prochaine campagne 2006, les laboratoires auront la possibilité de n'inscrire leurs codes techniques que lors de la première enquête ; ils seront conservés, sauf en cas de modification.

2. *"Souhait d'avoir uniquement les résultats du laboratoire rassemblés dans un tableau et un graphe"*.

- Pour les laboratoires inscrits par Internet, une feuille récapitulative des résultats et des notations pour l'ensemble des paramètres testés, est envoyée à chaque enquête. Chaque laboratoire peut également visualiser ses résultats sur les histogrammes de fréquence.
- Pour les laboratoires qui sont inscrits uniquement avec la formule "envoi des résultats papiers", nous avons conservé le maintien de l'anonymat (qui peut être souhaité par certains biologistes), et l'appréciation des résultats se fait uniquement sur la feuille de notations.

3. *"Explications pour remplir le bordereau de réponse du contrôle D-Dimères : seuil de détection de la technique et limite des valeurs normales"*.

→ Le seuil de détection de la technique est la concentration la plus faible mesurable avec précision.

Cette valeur est à 45 ng/ml avec la technique ELFA VIDAS ; elle est souvent plus élevée avec les techniques turbidimétriques (taux proche de 200 ng/ml dans la plupart des cas).

Le seuil de détection et la limite de linéarité définissent le domaine de mesure de la technique : les concentrations inférieures au seuil de détection ne peuvent être mesurées avec précision ; à partir de la limite de linéarité, il est nécessaire de diluer le plasma pour mesurer une concentration exacte.

Ces valeurs sont indiquées dans les fiches techniques des différents réactifs.

→ La limite des valeurs normales (différente de la limite de linéarité), correspond au "cutt-off", ou seuil décisionnel, c'est-à-dire concentration au-dessus de laquelle le taux de D-Dimères est considéré comme élevé.

Le seuil décisionnel est le plus souvent proche de 500 ng/ml ; avec certains tests turbidimétriques, il est plus faible, compris entre 100 et 250 ng/ml. Il peut être variable pour un même réactif en fonction de l'automate utilisé.

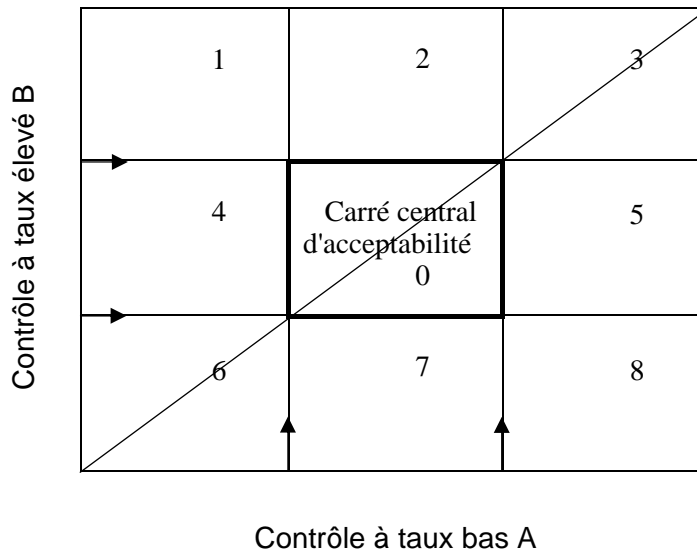
Le seuil décisionnel doit être précisé par le fabricant pour chacune des techniques.

4. Explications pour l'interprétation des diagrammes de YOUDEN

Le diagramme de YOUDEN permet une illustration des résultats obtenus pour deux contrôles de niveaux différents.

- Construction du diagramme

En abscisse, sont placées les valeurs trouvées pour le contrôle à taux bas, et en ordonnée, les valeurs trouvées pour le contrôle à taux élevé.



Les limites acceptables de chacun des 2 contrôles définissent un carré ou rectangle central d'acceptabilité, c'est-à-dire une zone cible pour les 2 plasmas.

Un diagramme de YOUDEN peut être construit avec l'ensemble des résultats, toutes techniques confondues, et il n'est interprétable que dans la mesure où il existe réellement une valeur cible "toutes techniques" ; la position de la zone centrale est influencée par la technique la plus représentée.

Lorsque des techniques ont un comportement très différent et donnent des concentrations très différentes (c'est le cas des D-Dimères), les nuages de points correspondants sont séparés ; il faudrait construire un YOUDEN par technique.

Interprétation des résultats

- Position dans la zone centrale d'acceptabilité : bons résultats.
- Résultats en dehors du carré, mais sur la diagonale (zones 3 et 6) : cela signifie un problème d'exactitude. Les résultats sont systématiquement trop hauts ou trop bas ; cela peut être lié à un problème de calibration, ou bien à la technique ou au réactif lui-même.
- Résultats en dehors du carré central, mais situés loin de la diagonale (zones 2, 4, 5, 7) : cela signifie un comportement différent pour les 2 plasmas (résultats bons pour un niveau, mais hors des limites pour l'autre).
Il s'agit soit d'un problème d'étalonnage (mauvaise pente), soit d'un problème lié à la technique ou à sa réalisation : reproductibilité à contrôler.
- Une position dans la zone 8 peut signifier un manque de linéarité de la technique : résultat trop élevé pour le taux bas, et trop bas pour le taux élevé.

5. Explications pour la saisie des résultats par Internet

Une procédure de saisie des résultats par Internet est donnée avec les notes techniques de chacun des programmes ponctuels (hémostase, héparine, D-Dimères) en décembre.

En cas de difficultés, veuillez contacter le secrétariat.

6. Demande d'interprétation en résultats acceptables ou inacceptables (TB, B⁺, B⁻) pour les contrôles D-Dimères.

Une notation pour les D-Dimères est difficilement réalisable actuellement pour plusieurs raisons :

- il n'existe pas de valeur-cible "toutes techniques", et les résultats en termes de concentration ne sont pas superposables d'un réactif à l'autre ; pour un même réactif, il y a parfois des différences de concentration selon les laboratoires, et les seuils décisionnels utilisés sont différents.
- seuls les réactifs les plus représentés pourraient donner lieu à une notation ; les laboratoires qui utilisent des réactifs moins répandus ne pourraient être notés.
- la définition des limites acceptables serait délicate, car les concentrations sont parfois très différentes pour un même réactif.

7. Demande d'interprétation des résultats par le calcul du Z-score, appelé encore "écart normalisé".

Cette demande est actuellement en cours d'étude.