

# 3 DIAGNOSTIC EN LABORATOIRE

1. Il est essentiel de poser un diagnostic correct pour que le patient reçoive le traitement dont il a besoin. Dans différents troubles de coagulation, les symptômes peuvent être très semblables.
2. Ce n'est que grâce à l'appui d'un service de laboratoire complet et précis, qu'il est possible de poser un diagnostic exact. Pour ce faire, le laboratoire doit respecter des procédures et des protocoles rigoureux, lesquels nécessitent :
  - connaissance et expertise en matière de tests de coagulation ;
  - utilisation de matériel et de réactifs appropriés ;
  - assurance de la qualité.
3. Pour obtenir des informations détaillées sur les aspects techniques et les instructions spécifiques des tests de dépistage et la détermination du dosage des facteurs, veuillez consulter la deuxième édition du guide en laboratoire de la FMH intitulé *Le diagnostic de l'hémophilie et des autres troubles de coagulation: Manuel de laboratoire* [1].

## 3.1 Connaissance et expertise en matière de tests de coagulation

---

### *Principes diagnostiques*

1. Comprendre les caractéristiques cliniques de l'hémophilie et la pertinence du diagnostic clinique.
2. Utiliser les tests de dépistage pour identifier la source possible du saignement, par exemple, la numération plaquettaire et le temps de saignement (TS ; dans des cas particuliers), ou d'autres tests de dépistage de la fonction plaquettaire, du temps de prothrombine (TP) et de la détermination du temps de thromboplastine partielle activée (APTT), plus souvent appelé temps de céphaline activé (TCA).
3. Confirmer le diagnostic par des dosages de facteurs et d'autres investigations spécifiques appropriées.

### *Aspects techniques*

#### *Préparation des patients avant le prélèvement d'un échantillon sanguin*

1. Les patients ne doivent pas nécessairement être à jeun avant un prélèvement sanguin visant à déceler de possibles troubles de la coagulation, même si un excédent de lipides peut fausser les résultats de certains analyseurs automatiques.
2. Les patients doivent éviter de prendre des médicaments susceptibles d'influencer les résultats des tests tels que l'aspirine, qui peut avoir d'importantes répercussions sur la fonction plaquettaire, et de prolonger le temps de saignement ou le temps d'arrêt de l'hémorragie.

3. Les patients doivent éviter de pratiquer des exercices exténuants immédiatement avant la ponction veineuse.
4. Si un patient est particulièrement angoissé par le prélèvement d'échantillon, les taux du facteur VIII et du facteur VW peuvent provisoirement augmenter.

#### *Prélèvement d'échantillon*

1. L'échantillon doit être prélevé conformément aux lignes directrices standards [2].
2. L'échantillon doit, de préférence, être prélevé à proximité du laboratoire pour assurer un transport rapide.
3. Les échantillons doivent être testés dans les quatre heures suivant le prélèvement.
4. Les résultats des tests peuvent changer selon les conditions de stockage des échantillons. Des températures plus élevées (> 25 °C) provoquent une perte de l'activité du facteur VIII à mesure que le temps s'écoule, alors que le stockage des échantillons dans le froid (de 2 à 8 °C) provoque une activation par le froid. L'échantillon doit donc être conservé à des températures variant de 20 °C à 25 °C si possible, mais pendant moins de quatre heures.
5. La ponction veineuse doit être franche, et l'échantillon doit être prélevé dans la minute qui suit l'application du garrot sans stase veineuse prolongée.
6. Le sang doit être extrait dans une seringue plastique ou un dispositif de prélèvement à vide. L'aiguille doit être de calibre 19 à 21 pour les adultes et de 22 à 23 pour les jeunes enfants. Le prélèvement par des cathéters veineux périphériques ou des cathéters veineux centraux non héparinisés peut être efficace pour de nombreux tests de l'hémostase.
7. Il faut éviter d'utiliser le sang prélevé sur un cathéter permanent pour effectuer les tests de coagulation.
8. Il faut également éviter de faire mousser l'échantillon sanguin. Il est souvent utile de jeter les deux premiers millilitres de sang prélevés.
9. L'échantillon doit être prélevé dans des tubes de citrate contenant une solution aqueuse de dihydrate de citrate trisodique de 0,105 M à 0,109 M (concentration : 3,2 %), qui maintient la proportion du sang par rapport au citrate à 9 pour 1. Si le tube contient moins de 80 % de volume cible, les résultats peuvent être affectés de façon négative. Une teneur plus élevée de citrate trisodique de 3,8 % n'est plus recommandée.
10. Le mélange avec la solution de citrate doit être effectué avec rapidité et précision, et ce, par inversion délicate.
11. Si l'échantillon ne peut pas être traité dans les quatre heures suivant le prélèvement, le plasma pauvre en plaquettes (PPP) peut être congelé à -30 °C et stocké pendant quelques semaines, ou jusqu'à six mois s'il est stocké à -70 °C. [3] Le stockage à -20 °C n'est généralement pas approprié.
12. Les échantillons congelés doivent être décongelés rapidement pendant quatre à cinq minutes à 37 °C pour éviter la formation de cryoprécipité.

#### *Préparation du plasma pauvre en plaquettes (PPP)*

1. Le PPP doit être préparé conformément aux lignes directrices standards. (CLSI 2008a)
2. Le PPP est préparé par centrifugation d'un échantillon à un minimum de 1 700 g pendant au moins 10 minutes à température ambiante (c'est-à-dire non réfrigéré).
3. Le PPP peut être conservé à température ambiante (20 °C à 25 °C) avant de réaliser les tests.
4. Le plasma qui a été hémolysé au cours du prélèvement et du traitement ne doit pas être analysé.

#### *Détection du point final*

1. Bon nombre de laboratoires disposent maintenant d'analyseurs de coagulation automatisés ou semi-automatisés. La détection exacte du point final de la coagulation au moyen d'une technique manuelle requiert un savoir-faire considérable, notamment si le temps de coagulation est prolongé ou si la concentration de fibrogène est basse, et si le caillot est mince et filandreux.
2. Pour les tests manuels, le tube doit être incliné trois fois toutes les cinq secondes à un angle d'environ 90 ° au cours de l'observation. Le tube doit être immergé dans un bain-marie à 37 °C après chaque inclinaison.

#### *Tests de dépistage*

1. La numération plaquettaire, le temps de saignement (TS), le temps de prothrombine (TP) et de la détermination du temps de thromboplastine partielle activée (APTT/TCA) peuvent servir à dépister un patient que l'on soupçonne de souffrir d'un trouble de coagulation [4].

TABLEAU 3-1 : INTERPRÉTATION DES TESTS DE DÉPISTAGE

DIAGNOSTIC POSSIBLE	TP	APTT/TCA* TCA	TS	NUMÉRATION PLAQUETTAIRE
État normal	Normal	Normal	Normal	Normale
Hémophilie A ou B**	Normal	Prolongé*	Normal	Normale
Maladie de von Willebrand	Normal	Normal ou prolongé*	Normal ou prolongé	Normale ou réduite
Déficit plaquettaire	Normal	Normal	Normal ou prolongé	Normale ou réduite

\*Les résultats des mesures de l'APTT/TCA reposent largement sur la méthode que le laboratoire utilise pour réaliser l'analyse.

\*\*Le même schéma peut se produire en présence de facteur XI, de facteur XII, de prékallïcricéine ou de déficit en kininogène de haut poids moléculaire (KHPM).

2. Le temps de coagulation manque de sensibilité et de spécificité et est également enclin à des erreurs de performance. Par conséquent, d'autres tests de fonction plaquettaire, tels que l'agrégométrie, sont privilégiés, le cas échéant [5, 6].
3. En fonction des résultats obtenus, il peut être possible de caractériser partiellement la catégorie du trouble de coagulation afin d'orienter une analyse ultérieure (consulter le tableau 3-1 ci-dessus).
4. Ces tests de dépistage risquent de ne pas détecter les anomalies des patients atteints de troubles de coagulation légers, notamment certains déficits de la fonction plaquettaire, le déficit en facteur XIII, et les rares déficits de fibrinolyse, pouvant être corrélés à une tendance au saignement.
  - La récupération plus faible que prévu ou la demi-vie réduite du facteur de coagulation injecté peut être un signe précurseur de la présence d'inhibiteurs.
  - Pour tester la qualité du cryoprécipité ;
    - Il est utile de vérifier la présence de concentrés de facteur VIII dans le cryoprécipité à des fins de contrôle de la qualité de ce produit.

2. Les tests phénotypiques manquent de sensibilité et de spécificité pour détecter les femmes conductrices. Chez certaines femmes obligatoirement conductrices, le rapport entre le facteur VIII : C et l'antigène du facteur von Willebrand VWF : Ag peut être normal. Il est conseillé de pratiquer des tests génétiques car ils constituent une méthode de détection plus précise des femmes conductrices.

#### Études de correction

1. Les études de correction ou de mélange utilisant un pool de plasma normal (PPN) aideront à définir si les temps de coagulation allongés sont dus au déficit en facteurs ou à des anticoagulants circulants inhibiteurs. Les études de correction avec le plasma dépourvu de facteurs VIII/IX peuvent être utilisées pour déceler un déficit lorsque le dosage de facteurs n'est pas disponible.

#### Dosage de facteurs

1. Le dosage de facteurs est requis dans les cas suivants :
  - Pour poser un diagnostic ;
  - Pour faire le suivi du traitement ;
    - Le suivi en laboratoire des injections de concentrés de facteurs de coagulation est possible en mesurant les taux des facteurs de coagulation avant et après l'injection.
3. Les dosages en un temps selon l'APTT/TCA sont les techniques les plus fréquemment utilisées. Les caractéristiques suivantes des dosages sont importantes :
  - Les facteurs VIII et IX doivent être complètement absents du plasma dépourvu de facteurs VIII et IX, c'est-à-dire contenir < 1 UI/dl, et les taux des autres facteurs de coagulation doivent être normaux.
  - Le plasma de référence/étalon, qu'il soit commercial ou préparé localement, doit être étalonné en unités internationales (c'est-à-dire par rapport à la norme internationale appropriée de l'OMS).
  - Pour que l'analyse soit valable, il faut au moins trois différentes dilutions du plasma de référence et de l'échantillon test en cours d'analyse.
  - L'utilisation d'une seule dilution d'échantillon-test réduit considérablement la précision du test et peut fausser complètement les résultats en présence de certains inhibiteurs.

- Lors de l'analyse des échantillons-tests des sujets atteints d'hémophilie modérée ou sévère, il peut être nécessaire de disposer d'une courbe d'étalonnage étendue ou séparée. Il n'est pas tolérable d'étendre simplement la courbe d'étalonnage par extrapolation sans analyser les autres dilutions du plasma étalon.
- Chez certains sujets atteints d'hémophilie A légère génétiquement confirmée, l'activité du facteur VIII est normale en utilisant les dosages en un temps pour le diagnostic, mais lors des dosages de coagulation chromogènes et en deux temps, l'activité est réduite. L'inverse peut également se produire. Par conséquent, il est nécessaire de disposer de plus d'un type de dosage du facteur VIII pour détecter toutes les formes d'hémophilie A légère [7, 8].

#### *Dépistage des inhibiteurs*

1. On soupçonne la présence d'une certaine forme d'inhibiteurs en cas d'APTT/TCA prolongé qui n'est pas complètement corrigé en mélangeant le plasma des patients avec du PPN.
  2. Les inhibiteurs fonctionnels d'hémostase que l'on rencontre le plus fréquemment sont les anticoagulants lupiques (AL) qui ne sont pas dirigés contre les facteurs de coagulation spécifiques et qui doivent être exclus.
  3. Les résultats des tests d'APTT/TCA sur des mélanges de plasma test et normal peuvent être difficiles à interpréter, en particulier en raison du fait que dans l'hémophilie acquise, il peut initialement y avoir une correction complète de l'APTT/TCA en présence d'un anticorps antifacteur VIII.
  4. La plupart des inhibiteurs du facteur VIII qui apparaissent après la thérapie de remplacement chez des sujets atteints d'hémophilie A révèlent un schéma caractéristique : l'APTT/TCA d'un patient par rapport au mélange de PPN est intermédiaire, c'est-à-dire entre l'APTT/TCA des deux éléments testés, et se prolonge ultérieurement lorsque le mélange est incubé à 37 °C pendant 1 à 2 heures.
  5. Un dosage spécifique de l'inhibiteur est requis pour confirmer qu'il est dirigé contre un facteur de coagulation spécifique.
6. **La modification Nijmegen du dosage de l'inhibiteur du facteur VIII améliore la spécificité et la sensibilité par rapport au dosage Bethesda initial (Niveau 1) [9, 10].**
  7. Il est effectué comme suit :
    - Le PPN tamponné (apport en facteur VIII) est mélangé au plasma test et est incubé à 37 °C.
    - Après deux heures, le facteur VIII résiduel est mesuré par rapport au facteur VIII présent dans le mélange témoin comprenant du PPN tamponné et du plasma dépourvu de facteur VIII, qui a été incubé avec le mélange test.
    - Le facteur VIII résiduel est converti en unités de l'inhibiteur au moyen du graphique semi-logarithmique du facteur VIII résiduel par rapport à la convention de l'inhibiteur, interprétée selon l'hypothèse que 100 % de facteur VIII résiduel équivaut à 0 BU/ml d'inhibiteur, et que 50 % de facteur VIII résiduel équivaut à 1,0 BU/ml (la dernière étant la convention acceptée à l'échelle internationale pour définir l'activité des inhibiteurs).
    - Lorsque l'activité du facteur VIII résiduel est de < 25 %, le plasma du patient doit faire l'objet d'un nouveau test après dilution pour éviter de sous-estimer la puissance de l'inhibiteur.
    - Le titre d'un inhibiteur de  $\geq 0,6$  BU/ml doit être considéré comme important sur le plan clinique. [11]

#### ***Personnel compétent***

1. Même les tests de dépistage de coagulation les plus simples sont complexes par nature.
2. Un chercheur/un technicien de laboratoire qui s'intéresse à la coagulation doit avoir une compréhension approfondie des tests afin d'obtenir des résultats fiables.
3. Dans certains cas, il peut être utile de disposer d'un chercheur/technicien de laboratoire qui a suivi une autre formation dans un centre spécialisé.

## 3.2 Utilisation du matériel et des réactifs appropriés

1. Le matériel et les réactifs constituent les outils de travail de n'importe quel laboratoire. Les exigences qui suivent sont indispensables pour garantir la précision des tests de laboratoire.
8. Il est possible d'obtenir des résultats fiables en utilisant un matériel et une technologie de base, à la condition qu'une bonne pratique de laboratoire soit respectée. Ces compétences peuvent ensuite être adaptées à une technologie plus automatique.

### Matériel

1. Un bain-marie de 37 °C, plus ou moins 5 °C.
2. Une bonne source d'éclairage doit être placée près du bain-marie pour observer la formation de caillots.
3. Des chronomètres.
4. Les pipettes automatiques (à un volume fixe ou variable) permettant d'ajouter 0,1 ml et 0,2 ml avec exactitude et précision.
5. Des tubes en verre sodocalcique transparents (7,5 cm × 1,2 cm) doivent être utilisés pour réaliser les tests de coagulation. Il faut éviter de réutiliser, dans la mesure du possible, des consommables en verre, à moins de démontrer que les résultats des tests ne sont pas affectés par le procédé utilisé. Il ne faut pas non plus réutiliser les éléments en plastique présents dans les analyseurs de coagulation.
6. Il existe aujourd'hui divers modèles de coagulomètres automatiques ou semi-automatiques. Dans bon nombre de cas, ce matériel présente les avantages suivants :
  - précision de lecture du résultat final ;
  - meilleure fiabilité des résultats des tests ;
  - capacité d'effectuer plusieurs analyses de coagulation ;
  - réduction des erreurs d'observation (le point final de la réponse est généralement mesuré de manière électromécanique ou photoélectrique) ;
  - utilisation de cuvettes en polystyrène (transparentes) au lieu des tubes en verre.
7. Tout le matériel doit être entretenu pour assurer son bon fonctionnement.
  - Lors de l'achat, il faut tenir compte de l'entretien régulier effectué par un spécialiste du produit, et prévoir les ressources en conséquence.
  - Il faut vérifier la précision de la quantité d'échantillons/réactifs délivrée par les pipettes.
  - Il convient de contrôler régulièrement la température des bains-marie, des réfrigérateurs et des congélateurs.

### Sélection de coagulomètres

1. Bon nombre d'analyseurs de coagulation sont fournis sous la forme d'un lot d'instruments et de réactifs et les deux composantes peuvent influencer les résultats obtenus. Cet aspect doit être pris en compte en évaluant et en choisissant un système. D'autres aspects importants sont à prendre en compte :
  - le type de tests à effectuer et la charge de travail, ainsi que le flux de travail, dans le laboratoire ;
  - les exigences opérationnelles (puissance, espace, humidité, température, etc.) ;
  - les exigences de service et de dépannage ;
  - le rendement et le répertoire de tests ;
  - les coûts ;
  - la possibilité de combinaison avec des réactifs d'autres fabricants ;
  - des tests programmables par l'utilisateur ;
  - la comparabilité entre les résultats obtenus d'un analyseur principal et les méthodes d'appoint ;
  - la comptabilité avec les tubes d'échantillon sanguin et les récipients de stockage du plasma en utilisation locale ;
  - l'évaluation de la sécurité (mécanique, électrique, microbiologique) ;
  - l'accès à une formation appropriée.
2. Les informations doivent être en lien avec les caractéristiques de performance du système. Elles peuvent être obtenues de plusieurs sources, y compris des publications et des données des fabricants, mais elles peuvent aussi faire l'objet d'évaluations locales. Il faut prendre en compte, entre autres, les aspects suivants :
  - la précision des tests ayant pour cible un coefficient de variation de < 3 % pour des tests de dépistage et de < 5 % pour des dosages de facteurs ;
  - le reliquat ;
  - les substances interférentes ;
  - la stabilité du réactif sur l'analyseur de bord ;
  - la comparabilité avec d'autres méthodes ;
  - l'identification des échantillons ;



- le traitement des données, le logiciel et le contrôle de la qualité ;
  - la formation exigée ;
  - la fiabilité.
3. Un certain nombre de lignes directrices et de recommandations publiées décrivent l'évaluation des analyseurs de coagulation [12, 13].

### Réactifs

1. Il est judicieux de veiller à la continuité de l'approvisionnement du réactif choisi, en prêtant une attention particulière à la continuité des lots et aux longues durées de conservation. À cet égard, il est possible de demander au fournisseur de réserver des lots pour le laboratoire, le cas échéant.
2. Il est déconseillé de changer de source de réactif, sauf en cas de difficultés d'approvisionnement ou en raison de résultats contestables. Les différentes marques peuvent présenter des sensibilités complètement différentes, et ne doivent pas être utilisées simultanément.
3. Il faut respecter les instructions fournies avec le réactif.
4. Il faut prêter une attention particulière à la stabilité du réactif. Dès qu'un réactif est reconstitué ou décongelé pour un usage quotidien, il risque de se détériorer au fil du temps en fonction des conditions de stockage et d'utilisation.
5. Après avoir choisi le test et les réactifs appropriés, il convient idéalement de définir les échelles de normalité ou de référence et de tenir compte des conditions utilisées localement.

## 3.3 Assurance de la qualité

1. L'assurance de la qualité (AQ) est une expression générique employée pour décrire l'ensemble des mesures prises pour assurer la fiabilité des tests effectués en laboratoire et les comptes-rendus des résultats.
2. L'AQ couvre tous les aspects du processus diagnostique, qu'il s'agisse du prélèvement des échantillons, de la séparation et à l'analyse, du contrôle de la qualité interne jusqu'au compte-rendu des résultats, tout en s'assurant qu'ils parviennent au clinicien.
3. Il incombe à toutes les personnes concernées de veiller à ce que les procédures soient correctement suivies.

### Contrôle de la qualité interne (CQI)

1. Le CQI sert à déterminer si une série de techniques et de procédures est effectuée en toute conformité sur une période donnée.
2. Des mesures relatives au CQI doivent être prises pour assurer que les résultats des expériences en laboratoire sont suffisamment fiables afin d'aider le clinicien à prendre des décisions, d'assurer le suivi thérapeutique et de déceler les anomalies hémostatiques.
3. Le CQI est particulièrement utile pour identifier le degré de précision d'une technique particulière.
4. S'agissant des tests de dépistage de l'hémostase, les échantillons de plasma normaux et anormaux doivent être inclus régulièrement. Il convient d'inclure au moins un niveau d'échantillon ayant fait l'objet du CQI avec tous les lots de tests.

### Évaluation externe de la qualité (EEQ)

1. Il est fortement conseillé aux laboratoires de participer à un programme d'évaluation externe de la qualité pour vérifier l'efficacité des systèmes du CQI mis en place.
2. Les programmes d'évaluation externe de la qualité servent à identifier le degré de concordance entre les résultats obtenus par un laboratoire et ceux obtenus par d'autres laboratoires.
3. La participation d'un laboratoire à ce type de programme permet de gagner la confiance de ses utilisateurs.
4. Le Programme international d'évaluation externe de la qualité (IEQAS) de la FMH est tout particulièrement destiné à répondre aux besoins des centres de soins hémophiliques du monde. Il inclut des analyses servant au diagnostic et à la prise en charge des hémorragies. La FMH peut fournir des renseignements au sujet de ce programme qui collabore avec le *National External Quality Assessment Service for Blood Coagulation* à Sheffield au Royaume-Uni. [14]
5. Il existe également d'autres programmes d'évaluations de la qualité à l'échelle internationale et nationale.
6. Pour qu'un laboratoire atteigne un haut niveau de fiabilité des tests et participe efficacement à un programme d'évaluation externe de la qualité, il doit disposer des réactifs et des techniques appropriés et d'un bon nombre d'effectifs adéquatement formés.

## Bibliographie

---

- Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders: A Laboratory Manual, 2nd edition. Montreal: World Federation of Hemophilia, 2010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays: Approved Guideline—Fifth edition. CLSI H21-A5, Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12(4):229-36.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. One Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved Guideline—Second edition. CLSI H47-A2 Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- Bick RL. Laboratory evaluation of platelet dysfunction. *Clin Lab Med* 1995 Mar;15(1):1-38.
- Rodgers RP, Levin J. Bleeding time revisited. *Blood* 1992 May 1;79(9):2495-7.
- Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, et al. Familial discrepancy between one stage and 2 stage factor VIII assay methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol* 1994;87(4):846-8.
- Oldenburg J, Pavlova A. Discrepancy between one-stage and chromogenic FVIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Haemostaseologie* 2010;30(4):207-11.
- Meijer P, Verbruggen B. The between-laboratory variation of factor VIII inhibitor testing: the experience of the external quality assessment program of the ECAT foundation. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(8):786-93.
- Verbruggen B, van Heerde WL, Laros-van Gorkom BA. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(8):752-9.
- Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemos* 1995; 73:247-251.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocol for the Evaluation, Validation, and Implementation of Coagulometers: Approved Guideline. CLSI document H57-A, Vol.28 No.4. Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute 2008c.
- Gardiner C, Kitchen S, Dauer RJ, et al. Recommendations for evaluation of coagulation analyzers. *Lab Hematol* 2006;12(1):32-8.
- Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, et al. Laboratory Performance in the World Federation of Hemophilia EQA programme, 2003-2008. *Haemophilia* 2009;15(1):571-7.