

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2012

THESE N°

LE DOSAGE QUANTITATIF DES MONOMERES DE FIBRINE :
VERIFICATION DE METHODE SELON LA NORME NF EN ISO 15189 ET
ETUDE OBSERVATIONNELLE DE L'INTERET DANS L'EVALUATION DES
COMPLICATIONS HEMORRAGIQUES APRES CHIRURGIE CARDIAQUE

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE
TENANT LIEU DE THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

Le 29 juin 2012

Par

Marc BELABED

né le 21 mars 1985, à Vichy

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame le Professeur Sylvie ROGEZPrésident
Monsieur le Professeur Gilles DREYFUSS.....Juge
Madame le Professeur Nathalie NATHAN-DENIZOTJuge
Madame le Docteur Magali SARU-DONNARD.....Juge
Monsieur le Professeur Jean FEUILLARDMembre invité

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES :**

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<u>PROFESSEUR CERTIFIE :</u>	
MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
<u>ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :</u>	
IMBERT Laurent	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, Professeurs des Universités de Bactériologie et Virologie, Biologiste des Hôpitaux, Praticien Hospitalier, de me faire l'honneur de présider ce jury. Vos compétences en Virologie m'ont beaucoup apporté. Veuillez trouver ici l'expression de tout mon respect.

A Monsieur le Professeur Gilles DREYFUSS, Professeur des Universités de Microbiologie-Parasitologie et Immunologie, d'avoir accepté de juger ce travail. J'ai pu apprécier vos compétences lors de mon passage dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie. Veuillez trouver ici toute ma considération.

A Madame le Professeur Nathalie NATHAN-DENIZOT, Professeur des Universités d'Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale, Médecin des Hôpitaux, Chef de service, de me faire l'honneur d'avoir accepté de participer à ce jury. Vos conseils avisés ont permis la réalisation de ce travail. Croyez-en mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD, Professeur des Universités d'Hématologie Biologique, Praticien Hospitalier, Chef de Service, de me faire l'honneur de siéger à ce jury. Je vous remercie pour vos conseils et l'enseignement de qualité que vous m'avez dispensé. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Docteur Magali SARU-DONNARD, Biologiste des Hôpitaux, Praticien Hospitalier, de m'avoir encadré dans la réalisation de ce travail. Je tiens à vous exprimer ma plus sincère reconnaissance pour vos conseils, votre confiance, votre soutien ainsi que votre gentillesse.

Je remercie les personnes ayant participé à la réalisation de ce travail :

Aux techniciennes du laboratoire d'Hémostase, Martine, Monique et Claire pour votre aide et votre implication dans ce travail. Je remercie plus particulièrement Delphine pour ton aide précieuse lors de la vérification de méthode.

A l'ensemble des personnes du laboratoire d'hématologie ayant participé de près ou de loin à ce projet.

Au Docteur Sébastien PONSONNARD, médecin du service d'Anesthésie-Réanimation. Je te remercie pour l'intérêt que tu as porté à ce projet, tes précieux conseils, ta disponibilité et ta sympathie lors de nos divers échanges.

A Pierre GUILBAUT, interne du service d'Anesthésie-Réanimation, pour avoir veillé au bon déroulement des prélèvements, pour les données cliniques que tu as recueillies et ton aide sur les modalités de gestion du saignement postopératoire.

A la société STAGO pour leur participation matérielle. Je tiens à remercier en particulier Amélie GIMENEZ pour ton aide et ta gentillesse tout au long de ce travail.

Aux personnes des services de CTCV et d'Anesthésie-Réanimation qui ont participé au projet et sans qui ce travail n'aurait pu exister.

Je remercie tous ceux qui ont contribué à ma formation au cours de mon internat :

A l'ensemble des biologistes, techniciens et tous les membres des laboratoires d'Hématologie, de Parasitologie-Mycologie, de Bactériologie-Virologie-Hygiène, de Biochimie et Génétique moléculaire, d'Immunologie et d'Immunogénétique du CHU de Limoges et du laboratoire du CH de Guéret pour votre accueil et votre participation active à ma formation.

A tous mes co-internes qui m'ont accompagnés au cours de ces années : Chloé, Laura, David, Fanny, Coralie, Laurie, Pauline, Aurélie, Vincent, Ana, Marilyne, Violaine, Jenifer, Albertine, Amélie, Caroline, Céline, Coralie, Isabelle et Laure.

A mes amis

A ma famille

A mes parents et à Alice

A Sandy

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ASPECTS REGLEMENTAIRES DE L'ACCREDITATION
 - 1.1 Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale
 - 1.2 Norme NF EN ISO 15189
2. RAPPELS SUR LA PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE [7–10]
 - 2.1 Acteurs cellulaires
 - 2.2 Acteurs moléculaires
 - 2.3 Déroulement de l'hémostase primaire
 - 2.4 Déroulement de la coagulation
 - 2.5 Déroulement de la fibrinolyse
3. PRESENTATION DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE AUTOMATISE DES MONOMERES DE FIBRINE
 - 3.1 Précision sur le terme « monomères de fibrine »
 - 3.2 Historique du dosage des monomères de fibrine
 - 3.3 Principe de la méthode de dosage STA[®] Liatest[®] FM
 - 3.4 Intérêts du dosage quantitatif des monomères de fibrine
4. SAIGNEMENT ET CHIRURGIE CARDIAQUE AVEC CIRCULATION EXTRACORPORELLE
 - 4.1 Généralités [42–44]
 - 4.2 Mécanismes à l'origine du saignement en chirurgie cardiaque
 - 4.3 Prise en charge du saignement postopératoire

DEUXIEME PARTIE : ETUDES EXPERIMENTALES

1. MATERIELS ET METHODES
 - 1.1 Etude de vérification de la méthode
 - 1.2 Etude prospective observationnelle
2. RESULTATS
 - 2.1 Résultats de l'étude de vérification de la méthode
 - 2.2 Résultats de l'étude prospective observationnelle

3. DISCUSSIONS

3.1 Discussion de l'étude de vérification de la méthode

3.2 Discussion de l'étude prospective observationnelle

CONCLUSION

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES TABLEAUX

TABLE DES ANNEXES

SERMENT DE GALIEN

ABREVIATIONS

ACT	Activated Clotting Time
ADP	Adénosine diphosphate
AFNOR	Association Française de Normalisation
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AVK	Anti-Vitamine K
CEC	Circulation Extracorporelle
CGR	Concentré de Globules Rouges
CIQ	Contrôle Interne de Qualité
CIVD	Coagulation Intravasculaire Disséminée
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
CTCV	Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire
CV	Coefficient de Variation
DDI	D-Dimères
DM-DIV	Dispositifs Médicaux de Diagnostic In Vitro
EEQ	Evaluation Externe de la Qualité
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ET	Ecart-Type
FM	Monomère de fibrine
FT	Facteur tissulaire
GEHT	Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose
HNF	Héparine Non Fractionnée
INR	International Normalized Ratio
ISO	International Organization for Standardization
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
KHPM	Kininogène de Haut Poids Moléculaire
LBM	Laboratoire de Biologie Médicale
Moy	Moyenne

p	indice de probabilité
PAI-1	Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène de type 1
PDF	Produits de Dégradation de la Fibrine et/ou du Fibrinogène
PFA	Platelet Function Analyzer
PFC	Plasma Frais Congelé
PK	Prékalllicréine
PVC	Polychlorure de Vinyle
rFVII	Facteur VII recombinant
TCA	Temps de Céphaline avec Activateur
TEG	Thromboélastographie
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TP	Taux de Prothrombine
tPA	Activateur tissulaire du Plasminogène
TQ	Temps de Quick
TT	Temps de Thrombine
TXA2	Thromboxane A2
UI	Unité Internationale
VWF	Facteur Von Willebrand

INTRODUCTION

Les monomères de fibrine (FM) représentent les précurseurs de la formation du caillot de fibrine lors du processus de coagulation. Une augmentation de ce paramètre est donc le reflet précoce d'un état d'hypercoagulabilité. Cette situation se rencontre en cas de pathologies thrombotiques mais également, paradoxalement, dans certaines situations hémorragiques telles que le syndrome acquis de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

Il n'existe pas de tests d'hémostase spécifiques pour la mise en évidence de ce syndrome. Le diagnostic se base sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques, dont font partie les monomères de fibrine. Nous utilisons jusqu'à présent une méthode ancienne et uniquement qualitative pour les mettre en évidence : le test à l'éthanol. Ce test présentant des limites techniques et diagnostiques, nous souhaitons adopter une méthode de dosage d'apparition récente : la technique STA[®]Liatest[®]FM (Diagnostica Stago[®]) permettant un dosage quantitatif automatisé des FM. Le test a montré son efficacité dans le diagnostic précoce des CIVD, en particulier d'origine septique [1].

Avant de mettre en place la technique en pratique courante au laboratoire, la première partie de notre travail a consisté à tester les performances analytiques du coffret dans le respect des exigences réglementaires et normatives de la réforme de la biologie médicale.

La deuxième partie de notre travail s'est attachée à préciser les indications d'utilisation de ce nouveau paramètre. Le test à l'éthanol était utilisé dans notre laboratoire, en association avec le dosage des D-dimères, lorsque le contexte clinique et les paramètres d'hémostase de première intention faisaient suspecter une CIVD.

Le test à l'éthanol était également intégré et réalisé systématiquement dans les bilans complets d'hémostase pour le suivi postopératoire d'une chirurgie cardiaque avec circulation extracorporelle (CEC). En effet, la procédure expose le patient à de nombreuses complications postopératoires. Parmi elles, un saignement anormal est retrouvé fréquemment[2]. En plus de l'acte chirurgical en lui-même, plusieurs facteurs, liés à l'intervention, entraînent des troubles acquis de la coagulation (utilisation d'un circuit artificiel de CEC, anticoagulation importante...). Un suivi de l'hémostase du patient est primordial avant, pendant et après l'opération pour optimiser la prise en charge et limiter le saignement. Cette complication représente un facteur de mauvais pronostic. Les patients vont avoir besoin de transfusions importantes de produits sanguins avec les effets indésirables possibles inhérents à ces pratiques (réaction allergique, erreur transfusionnelle, infections...). Dans certains cas, une reprise chirurgicale est nécessaire, associée à une morbidité et mortalité plus élevées [3].

A notre connaissance, peu de données existent sur l'intérêt de l'utilisation du dosage des FM dans ce contexte. Une des raisons est le manque de fiabilité et de précision des techniques qualitatives et semi-quantitatives jusqu'alors disponibles.

L'apparition de techniques quantitatives, entièrement automatisées, comme le test STA-Liatest[®] FM[®], ouvre de nouvelles perspectives d'utilisation. Karkouti *et al.* [4] ont démontré une relation entre les taux de FM après intervention cardiaque et les saignements postopératoires.

Nous souhaitons évaluer l'intérêt d'intégrer le dosage des FM dans les bilans de surveillance de l'hémostase pour la prévision et/ou le diagnostic des complications hémorragiques au cours d'une CEC.

Pour cela, une étude prospective observationnelle a été menée entre décembre 2011 et février 2012, en collaboration entre les services de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire (CTCV), d'Anesthésie-Réanimation et le laboratoire d'Hématologie du CHU de Limoges.

Dans un premier temps, nous ferons une mise au point sur les aspects réglementaires de l'accréditation à laquelle doivent se soumettre les laboratoires de biologie médicale (LBM), puis un rappel sur la physiologie de l'hémostase ainsi qu'une présentation de la technique STA[®]Liatest[®]FM et enfin des précisions sur la problématique du saignement lors d'une CEC. Nous présenterons et analyserons, dans un second temps, les résultats obtenus lors de l'étude de vérification de la méthode et ceux de l'étude prospective observationnelle.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ASPECTS REGLEMENTAIRES DE L'ACCREDITATION

1.1 Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale

Trente-cinq ans après la précédente loi régissant le domaine de la biologie médicale, la loi du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires, aboutit à l'adoption de l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale [5]. Le texte vise à réformer les conditions de création, d'organisation et de fonctionnement des LBM. Les dispositions du texte concernent en partie la mise en place d'une procédure d'accréditation obligatoire, visant à mieux garantir la qualité des examens de biologie médicale.

L'accréditation est une reconnaissance formelle par un organisme faisant autorité, le comité français d'accréditation (Cofrac) dans le cas présent, de la compétence des LBM à effectuer l'ensemble des examens de biologie médicale qu'ils réalisent. Le Cofrac, créé en 1994, a été désigné comme unique instance nationale d'accréditation en France par le décret du 19 décembre 2008.

L'accréditation porte sur les trois phases de l'examen de biologie médicale :

- la phase pré-analytique, qui comprend la prescription, le prélèvement d'un échantillon biologique, le recueil des éléments cliniques pertinents, la préparation, le transport et la conservation de l'échantillon biologique jusqu'à l'endroit où il est analysé
- la phase analytique, qui est le processus technique permettant l'obtention d'un résultat d'analyse biologique
- la phase post-analytique, qui comprend la validation, l'interprétation contextuelle du résultat ainsi que la communication appropriée du résultat au prescripteur et au patient, dans un délai compatible avec l'état de l'art.

Les laboratoires existants, pour continuer à fonctionner, doivent justifier de leur entrée effective dans une démarche d'accréditation avant le 1^{er} novembre 2013 avant d'être accrédités pour l'ensemble de leurs analyses au 1^{er} novembre 2016.

Le processus d'accréditation s'appuie sur un référentiel normatif : la Norme NF EN ISO 15189 [6].

1.2 Norme NF EN ISO 15189

La norme NF EN ISO 15189:2007 est une norme internationale publiée par l'Association française de normalisation (AFNOR). Elle a été créée, en 2007, spécifiquement pour les LBM à partir de normes conçues pour les laboratoires d'essais : ISO/CEI 17025 et ISO 9001.

Elle définit les exigences particulières de qualité et de compétence auxquelles doivent se soumettre les LBM pour satisfaire aux besoins du prescripteur et du patient. Le texte s'articule autour de deux grands axes : les exigences relatives au management et les exigences techniques. A cela s'ajoute, en annexe, des recommandations sur la protection des systèmes informatiques des laboratoires et sur l'éthique.

Plusieurs points sont abordés dans la norme concernant les exigences techniques. Le travail présenté a pour but de vérifier les performances analytiques de la méthode de dosage des monomères de fibrine et s'appuie donc en particulier sur les paragraphes 5.3 (matériel de laboratoire) et 5.5 (procédures analytiques) de la norme. Ces paragraphes soulignent la nécessité pour le laboratoire de documenter et de démontrer que les performances de la méthode sont conformes aux spécifications attendues.

2. RAPPELS SUR LA PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE [7–10]

L'hémostase est le processus physiologique visant à maintenir l'équilibre de la circulation sanguine en protégeant, d'une part, des phénomènes de thromboses et d'autre part, en limitant les hémorragies au niveau d'une brèche vasculaire.

Lorsque le vaisseau est intact, le sang est au contact de la monocouche de cellules endothéliales qui, de part ses fonctions régulatrices, permet le maintien de la fluidité sanguine. Lorsque la continuité de l'endothélium vasculaire est rompue, les structures sous-endothéliales, au contact du sang entraînent une activation et l'adhésion des plaquettes au site de la lésion ainsi que l'activation de la coagulation conduisant à la formation de fibrine. Le thrombus constitué de plaquettes agrégées, de fibrine et de globules rouges comble la brèche vasculaire et arrête le saignement. Le phénomène est rapide et régulé par des systèmes activateurs et inhibiteurs afin de maintenir le processus localisé, sans extension à distance. On décrit classiquement trois étapes, qui, *in vivo*, sont simultanées et interdépendantes :

- l'hémostase primaire qui consiste en une adhésion et une agrégation plaquettaire formant un caillot plaquettaire (ou thrombus blanc) colmatant la brèche vasculaire en trois à cinq minutes
- la coagulation qui comprend une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la formation d'un réseau de fibrine insoluble consolidant le thrombus blanc en cinq à dix minutes
- la fibrinolyse constituée de réactions enzymatiques permettant la destruction du caillot et la limitation de l'extension du processus en quarante-huit à soixante-douze heures en parallèle de la réparation vasculaire.

Nous allons tout d'abord présenter les différents acteurs de l'hémostase puis nous décrirons les étapes successives de ce phénomène.

2.1 Acteurs cellulaires

2.1.1 Plaquettes

Les plaquettes sont des cellules anucléées de petite taille (2-4 micromètres de diamètre) issues de la fragmentation des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Elles circulent sous forme non activée.

Elles participent à la fois à l'hémostase primaire en constituant la base du thrombus blanc colmatant la brèche vasculaire et jouent également un rôle primordial dans la coagulation en servant de support aux réactions de coagulation.

La membrane plaquettaire est composée d'une double couche de phospholipides répartis de façon asymétrique. Schématiquement, les phospholipides anioniques sont situés dans le feuillet interne lorsque la plaquette est au repos et seront externalisés après activation pour servir de support aux réactions de la coagulation (flip-flop membranaire). La membrane est également constituée de glycoprotéines et de récepteurs divers comme le récepteur de la thrombine. Nous pouvons citer les glycoprotéines principales dont les rôles, dans les fonctions plaquettaires, ont pu être décrits : le complexe des glycoprotéines GpIb/V/IX, récepteur du facteur Von Willebrand (VWF) impliqué dans l'adhésion plaquettaire et le complexe GpIIb/IIIa, récepteur du fibrinogène impliqué dans l'agrégation plaquettaire.

Deux systèmes membranaires particuliers coexistent dans le cytoplasme des plaquettes : d'une part le système canaliculaire ouvert formé des invaginations de la membrane plasmique permettant des échanges rapides de molécules impliquées dans les fonctions plaquettaires entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire ; et d'autre part le système tubulaire dense, lieu de stockage du calcium utilisé par les structures contractiles (microtubules et microfibrilles). Celles-ci assurent le maintien de la forme discoïde au repos et permettent les changements morphologiques lors de l'activation plaquettaire avec l'émission de prolongements cytoplasmiques augmentant la surface disponible pour les réactions de coagulation.

Au niveau intra-cytoplasmique, on distingue trois types de granules plaquettaires constituées de différentes molécules intervenant dans les processus d'hémostase, d'inflammation et de cicatrisation : les granules denses contenant des facteurs pro-agrégants, les granules alpha contenant des cytokines, des facteurs d'adhésion, de la coagulation et de cicatrisation et les lysosomes contenant diverses enzymes à activité antibactérienne ou protéolytique.

2.1.2 Endothélium

La paroi vasculaire de tous les vaisseaux de l'organisme comporte trois tuniques :

- l'intima formée d'une monocouche de cellules endothéliales (au contact du sang) et du sous-endothélium
- la média, plus ou moins développée en fonction des vaisseaux, constituée de fibroblastes et de cellules musculaires lisses à l'origine des phénomènes de vasoconstriction-dilatation
- l'adventice formée de tissu conjonctif et de vaisseaux nourriciers

L'endothélium participe à de nombreux processus physiologiques dont l'hémostase, le contrôle du tonus vasculaire, l'inflammation et l'angiogénèse.

Concernant l'hémostase, l'endothélium intervient dans toutes les étapes du processus. La paroi vasculaire est hémocompatible par l'intermédiaire des cellules endothéliales dont le profil global au repos est thromborésistant. En cas de rupture de continuité, les cellules endothéliales activées, et surtout les structures sous-endothéliales, sont thrombogènes et induisent les phénomènes de l'hémostase primaire et de la coagulation.

L'endothélium joue son rôle dans l'hémostase primaire en modulant l'activité plaquettaire et la vasomotricité des cellules musculaires lisses de la média. La cellule endothéliale synthétise à la fois des facteurs antiagrégants et vasodilatateurs (monoxyde d'azote...) et des facteurs proagrégants (collagène, glycosaminoglycanes...) disponibles au niveau du sous endothélium après une brèche vasculaire.

Lors de la coagulation, les cellules endothéliales activées expriment le facteur tissulaire (FT), récepteur du facteur VII. Le complexe [FT-facteur VIIa] représente la voie d'initiation principale de la coagulation *in vivo*. L'endothélium participe également à la régulation du phénomène en modulant l'activité des inhibiteurs de la coagulation par l'intermédiaire de la thrombomoduline, du récepteur à la protéine C et des glycosaminoglycanes.

En ce qui concerne le phénomène de fibrinolyse, les cellules endothéliales libèrent le principal activateur du plasminogène (l'activateur tissulaire du plasminogène, tPA) et son inhibiteur (l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, PAI-1).

2.2 Acteurs moléculaires

2.2.1 Facteur Von Willebrand

Le VWF est une protéine synthétisée à la fois par les cellules endothéliales, où elle est stockée dans les corps de Weibel-Palade, et également par les mégacaryocytes, contenu au sein des granules α mégacaryocytaire et plaquettaire. Son précurseur est un monomère de poids moléculaire de 270 kilodalton qui se polymérise sous formes de multimères de haut poids moléculaire reliés par des ponts disulfures. Leurs tailles varient de 0,5 à 20 millions de multimères.

Le rôle du VWF est double dans le déroulement de l'hémostase. Lors de l'hémostase primaire, il permet aux plaquettes d'adhérer aux structures endothéliales par le récepteur plaquettaire GpIb/V/IX en cas de forces de cisaillement élevées. Dans le cadre de la coagulation, il sert de transporteur et de protecteur au facteur VIII de la coagulation.

2.2.2 Protéines de la coagulation (facteurs et inhibiteurs de la coagulation)

2.2.2.1 Facteur tissulaire

Le FT est une glycoprotéine membranaire synthétisée par les fibroblastes de la tunique externe des vaisseaux. En cas de brèche vasculaire, son exposition au contact du sang constitue la voie d'initiation principale de la coagulation *in vivo*. Il sert de récepteur et active le facteur VII circulant, entraînant la cascade enzymatique à l'origine de la formation du caillot fibrine.

2.2.2.2 Facteurs de la coagulation

Les facteurs de la coagulation comprennent douze protéines plasmatiques intervenant dans la cascade de la coagulation (figure 1). Ils sont désignés à la fois par un nom usuel et par un chiffre romain selon une nomenclature internationale. Ils sont synthétisés au niveau hépatique et circulent

sous forme inactive. Leur état d'activation est représenté par le suffixe « a » à la suite de leurs noms. Ils peuvent être classés en trois catégories selon leur structure et leur fonction : les précurseurs enzymatiques intervenant dans la cascade enzymatique de la coagulation, les cofacteurs de ces réactions et enfin le substrat final.

Facteur	Nom	Fonction	Lieu de synthèse	Vitamine K dépendance
Facteurs de la coagulation				
I	Fibrinogène	Substrat	Foie	
II	Prothrombine	Zymogène	Foie	+
V	Proaccélérine	Cofacteur	Foie	
VII	Proconvertine	Zymogène	Foie	+
VIII	Facteur antihémophilique A	Cofacteur	Foie	
IX	Facteur antihémophilique B	Zymogène	Foie	+
X	Facteur Stuart	Zymogène	Foie	+
XI	Facteur Rosenthal	Zymogène	Foie	
XII	Facteur Hageman	Zymogène	Foie	
XIII	Facteur stabilisant la fibrine	Zymogène	Foie	
	Facteur tissulaire	Récepteur VIIa	Multicellulaire	
Facteurs inhibiteurs				
	Antithrombine	Inhibiteur	Foie	
	Protéine C	Zymogène	Foie	+
	Protéine S	Cofacteur	Foie	+
	Thrombomoduline	Récepteur IIa	Cellule endothéliale	

Figure 1 : Facteurs de la coagulation, d'après [7]

- Les précurseurs enzymatiques (ou zymogènes)

Les facteurs II, VII, IX, X, XI, XII et prékallikréine (PK) circulent sous forme de proenzymes de sérine protéases. L'activation de ces facteurs consiste en une hydrolyse démasquant leur site catalytique (constitué en partie d'une sérine). Une fois activé, un facteur peut alors activer un autre facteur selon une cascade de réactions enzymatiques. Ces réactions nécessitent que les facteurs se lient aux surfaces phospholipidiques par l'intermédiaire du calcium. Les facteurs II, VII, IX et X ont besoin de la vitamine K pour acquérir cette capacité.

Le facteur XIII est un zymogène de transglutaminase. Après activation par la thrombine, il permet de stabiliser le caillot de fibrine en créant des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine.

- Les cofacteurs

Les facteurs V et VIII agissent en accélérant les réactions enzymatiques de la coagulation. Ils sont activés par la thrombine .

Le facteur VIII circule associé au VWF.

- Le fibrinogène

Le fibrinogène est formé de trois paires de chaînes polypeptidiques : les chaînes $A\alpha$, $B\beta$ et $\gamma\gamma$ (figure 2). La structure tridimensionnelle de cette molécule forme trois domaines : un domaine E entouré de deux domaines D.

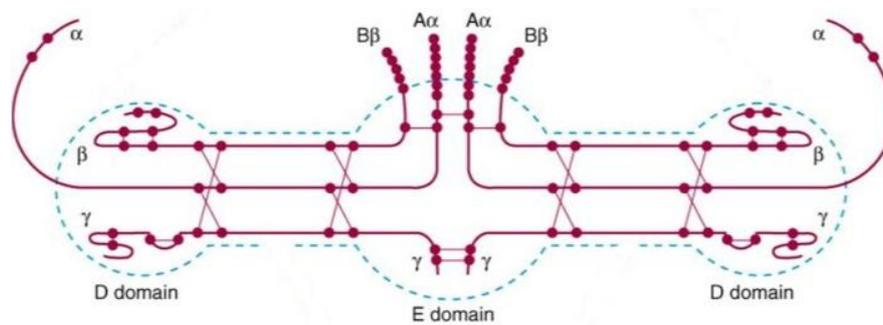


Figure 2 : Structure d'une molécule de fibrinogène, d'après [11]

Il intervient à la fois dans l'hémostase primaire en permettant l'agrégation plaquettaire et lors de la coagulation, en constituant le substrat final du processus à l'origine du réseau de fibrine insoluble.

2.2.2.3 Les inhibiteurs de la coagulation

On distingue trois systèmes inhibiteurs physiologiques.

- Les inhibiteurs des sérine-protéases de la famille des serpines

L'antithrombine en est le principal représentant. Elle constitue l'inhibiteur physiologique principal de la coagulation. Son action permet de limiter la propagation du processus de coagulation en neutralisant les facteurs activés circulants. Elle agit en formant des complexes inactifs irréversibles, principalement avec le facteur IIa mais aussi avec les facteurs Xa, IXa, XIa et XIIa.

La liaison aux glycosaminoglycanes des cellules endothéliales induit un changement conformationnel de l'antithrombine et potentialise ainsi son action. En thérapeutique, l'héparine possède une structure proche de ces molécules et exerce son activité anticoagulante en fixant l'antithrombine.

- Le système Protéine C/Protéine S

Ces deux molécules sont synthétisées au niveau hépatique sous la dépendance de la vitamine K.

La protéine C circule sous forme de proenzyme de sérine-protéase. Elle est activée par la thrombine préalablement fixée sur la thrombomoduline située sur la cellule endothéliale.

Elle agit en inactivant les cofacteurs Va et VIIIa. La protéine S sert de cofacteur aux réactions.

- Le Tissue Factor Pathway inhibitor (TFPI)

Le TFPI est à la fois présent dans la circulation et également fixé sur les glycosaminoglycanes de la paroi vasculaire. Il inhibe l'activation du facteur Xa et le système [FT-facteur VIIa].

2.2.3 Le Plasminogène et ses protéines régulatrices (figure 3)

Le plasminogène est une glycoprotéine synthétisée au niveau du foie. Elle possède une affinité pour la molécule de fibrine par l'intermédiaire de sites de haute affinité pour la lysine (Lysin Binding Site, LBS) au niveau de boucles d'acides aminés, appelées kringles.

La molécule circule sous forme inactive. Elle constitue le précurseur de la plasmine, sérine-protéase permettant la destruction de la fibrine.

La formation de plasmine est régulée par des systèmes activateurs et inhibiteurs. Les activateurs principaux du plasminogène sont le tPA et la pro-urokinase. Les inhibiteurs consistent soit en des molécules inhibitrices de la plasmine circulante comme l' α 2-antiplasmine, soit en des molécules inhibitrices des activateurs du plasminogène comme le PAI-1.

2.3 Déroulement de l'hémostase primaire

L'hémostase primaire représente les étapes aboutissant au thrombus blanc plaquettaire. Celui-ci permet de limiter temporairement les pertes sanguines après une brèche vasculaire.

Une vasoconstriction localisée au site de la lésion réduit, en premier lieu, le flux sanguin. Les modifications hémodynamiques qui en découlent favorisent les interactions moléculaires et cellulaires du processus d'hémostase. On peut distinguer trois étapes dans l'hémostase primaire : l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire.

2.3.1 Adhésion plaquettaire

Les lésions endothéliales mettent à nu le sous-endothélium composé entre autres de microfibrilles et de collagène. Les plaquettes adhèrent à ces structures à l'aide de plusieurs glycoprotéines plaquettaires dont la GpIb/V/IX par l'intermédiaire du VWF.

2.3.2 Activation plaquettaire

Les plaquettes s'activent ensuite, ayant pour conséquence une stimulation des voies métaboliques et un changement conformationnel. Les cellules deviennent sphériques et émettent des pseudopodes. Les phospholipides membranaires se réorganisent (flip-flop membranaire). Les plaquettes sécrètent alors leurs contenus granulaires dans la circulation (substances proagrégantes, procoagulantes et vasomotrices) participant à l'amplification du phénomène et favorisant la réaction de coagulation.

L'activation de la glycoprotéine GpIIbIIIa par modification conformationnelle est à l'origine de l'agrégation plaquettaire.

2.3.3 Agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est activée par plusieurs stimuli : la thrombine formée par le processus de coagulation parallèle, l'adénosine diphosphate (ADP) provenant des globules rouges et des cellules endothéliales, le collagène, l'adrénaline. Les plaquettes activées sécrètent également des agents activateurs.

Les molécules de fibrinogène créent des ponts interplaquettaires en se liant, en présence de calcium, aux GpIIbIIIa des plaquettes activées.

Le thrombus blanc ainsi formé colmate temporairement la brèche vasculaire. Il doit être consolidé par un réseau protéique de fibrine formé suite aux réactions de coagulation.

2.4 Déroulement de la coagulation

Les réactions de coagulation aboutissent à la formation de thrombine, molécule clé du processus d'hémostase.

Historiquement, le modèle était divisé en deux voies d'activation aboutissant à une voie commune (figure 3) :

- La voie intrinsèque : le système contact (facteur XII, PK, KHPM) active le facteur XI qui active le facteur IX. Le facteur IXa, en présence de facteur VIIIa, de phospholipides et de calcium, représente le complexe ténase qui active le facteur X.
- la voie extrinsèque : le FT active le facteur VII. Le complexe [FT-facteur VIIa] active alors le facteur X en présence de phospholipides et de calcium .
- la voie commune : les deux voies aboutissent au facteur Xa. Ce facteur, en présence de facteur Va, de phospholipides et de calcium forme le complexe prothrombinase qui génère la thrombine à partir de prothrombine. La molécule possède de multiples rôles dont celui de former la fibrine à partir du fibrinogène.

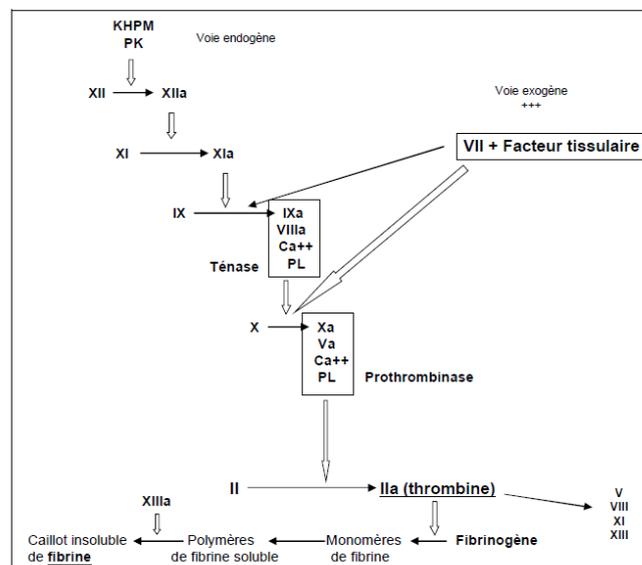


Figure 3 : Concept ancien du processus de coagulation, d'après [12]

Ce modèle a permis de comprendre le rôle individuel des facteurs de la coagulation, l'importance des phospholipides comme support de réactions et l'interprétation des tests *in vitro* d'hémostase. Mais il ne représente pas le déroulement *in vivo* du processus.

Le concept aujourd'hui admis est un modèle cellulaire (figure 4) [13,14]. Il découpe le processus non plus en cascade mais en trois étapes se déroulant à la surface de différentes cellules : l'initiation sur différentes cellules exprimant le FT puis l'amplification à la surface des plaquettes en voie d'activation et enfin la propagation à la surface des plaquettes activées. Le processus aboutit à la génération de thrombine.

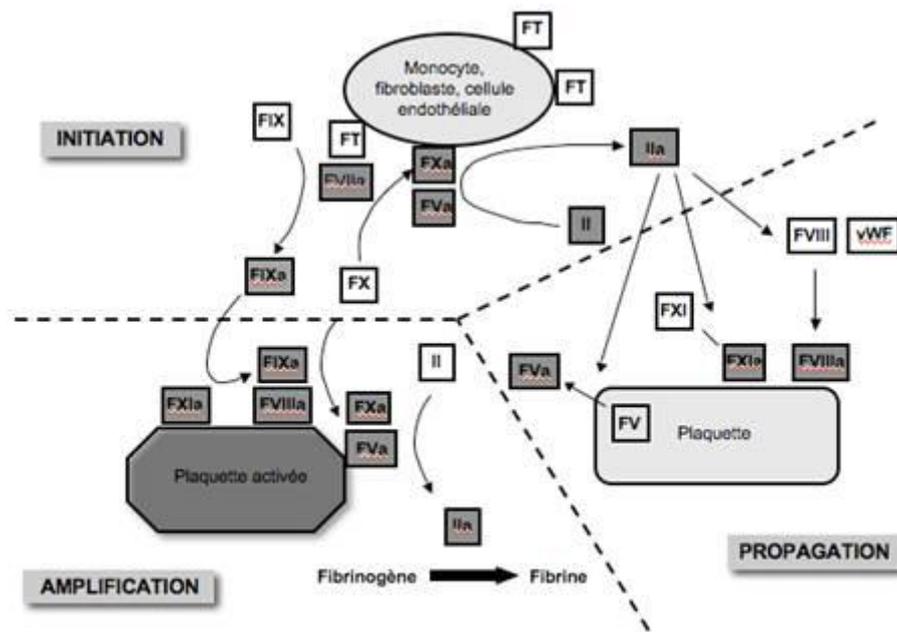


Figure 4 : Modèle cellulaire de la coagulation, d'après [15]

FT=Facteur Tissulaire ; VWF=Facteur Von Willebrand

2.4.1 Initiation de la coagulation

La voie aujourd'hui admise d'initiation de la coagulation est la voie du FT. Cette molécule n'est physiologiquement pas au contact du sang. Elle le devient en cas de rupture endothéliale ou d'expression sur des cellules activées (monocytes, cellules endothéliales) ou tumorales.

Le FT active le facteur VII circulant et forme avec celui-ci un complexe [FT-Facteur VIIa]. Ce dernier fixe également des traces de facteurs VIIa circulants qui amplifient le phénomène d'activation.

Le complexe [FT-facteur VIIa] active localement les facteurs IX et X. Les premières traces de thrombine sont alors produites. Cette étape d'initiation semble se dérouler continuellement à l'état basal dans le secteur extravasculaire mais ne conduit pas aux étapes suivantes de la coagulation en raison de la séparation anatomique avec d'autres molécules clés (plaquettes, facteur VIII, VWF).

Ces dernières deviennent disponibles en quantité importante en cas de brèche vasculaire.

2.4.2 Formation de thrombine et amplification du phénomène

En cas de brèche vasculaire, les traces de thrombine activent les éléments alors disponibles au site de la lésion. La thrombine agit sur :

- l'adhésion et l'activation des plaquettes
- l'activation des cofacteurs VIII et V
- l'activation du facteur XI qui augmente la génération de facteur IXa
- la formation des complexes enzymatiques ténases et prothrombinases à la surface plaquettaire.

2.4.3 Propagation

Le facteur IXa joue un rôle primordial dans la propagation du phénomène. Contrairement au facteur Xa rapidement inhibé par le TFPI, le facteur IXa peut diffuser à la surface des plaquettes activées. Il forme le complexe ténase au contact du facteur VIIIa et augmente la production de facteur Xa. Le facteur Xa forme alors le complexe prothrombinase avec le facteur Va, à l'origine de la production accrue de thrombine, nécessaire pour la formation du caillot de fibrine à partir de fibrinogène.

2.4.4 Fibrinoformation (figure 5) [9]

La thrombine se fixe au domaine E de la molécule de fibrinogène. Elle clive l'extrémité N-terminale des chaînes A α et B β en séparant les fibrinopeptides A puis B des monomères de fibrine. Les nouveaux sites du domaine E des monomères se lient de manière non-covalente au niveau des chaînes γ du nodule D d'un autre monomère. Ils polymérisent alors spontanément en formant des doubles brins appelés protofibrilles. L'accroissement se fait ensuite en largeur pour former des fibrilles puis des fibres.

Le facteur XIII, activé par la thrombine, stabilise ensuite les fibres en créant des liaisons covalentes entre des domaines D adjacents.

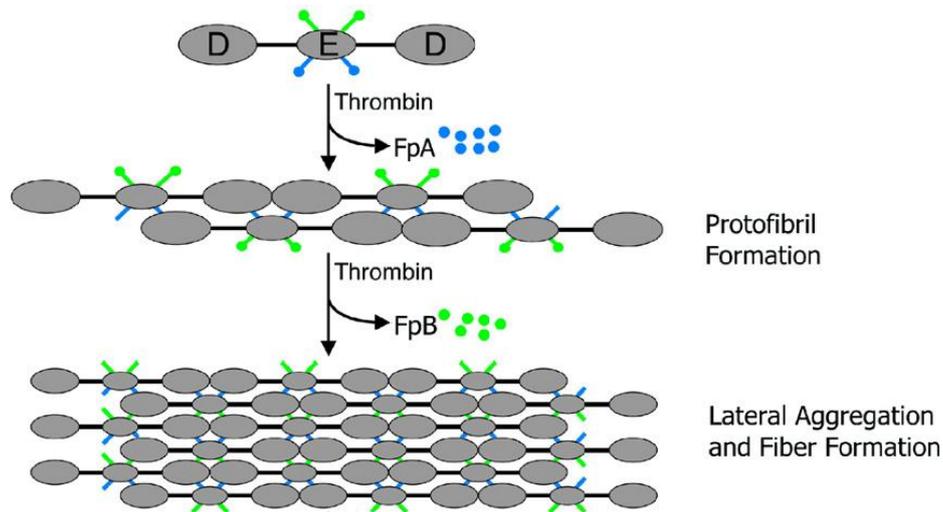


Figure 5 : Etape de la formation de fibrine, d'après [9]

Fp=Fibrinopeptide

2.4.5 Contrôle du phénomène

Les réactions restent localisées aux cellules activées près de la brèche vasculaire en grande partie par l'intermédiaire des cellules endothéliales. L'inhibition de la thrombine par l'antithrombine est, en effet, potentialisée par les héparanes sulfates situées à la surface endothéliale.

De plus, la thrombine circulante se fixe à la thrombomoduline endothéliale. Le complexe [facteur IIa-Thrombomoduline] active le système protéine S/protéine C qui inhibe les cofacteurs Va et VIIIa présents sur les surfaces endothéliales.

Enfin, le TFPI inhibe le facteur Xa en formant un complexe [TFPI-facteur Xa] lors de l'initiation du processus de coagulation. Ce complexe se lie ensuite au système [FT-FVIIa] et l'inhibe.

2.5 Déroulement de la fibrinolyse

La fibrinolyse permet d'empêcher l'installation et l'extension du caillot de fibrine. Elle intervient pour dissoudre le thrombus en parallèle de la réparation et de la cicatrisation vasculaire.

En l'absence de fibrine, le plasminogène est inactif. La présence de fibrine favorise la libération endothéliale de tPA et l'activation de la prourokinase. L'activation du plasminogène se déroule uniquement au contact du caillot de fibrine en raison de liaison préférentielle par les domaines Lysine Binding Site, à l'origine de la localisation du phénomène. Il y a alors génération de plasmine qui clive les molécules de fibrine en divers fragments de tailles variables appelés produits de dégradation de la fibrine (PDF). Les D-dimères (DDi) constituent un des produits de dégradation spécifique de la fibrine. La plasmine clive également les molécules de fibrinogène en PDFg et altère certains facteurs de la coagulation.

3. PRESENTATION DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE AUTOMATISE DES MONOMERES DE FIBRINE

3.1 Précision sur le terme « monomères de fibrine »

Comme nous l'avons vu dans le rappel sur la physiologie de la coagulation, lors de la conversion du fibrinogène en fibrine, la thrombine agit en clivant les fibrinopeptides A puis B, respectivement des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$ situées dans le domaine E de la molécule de fibrinogène. Il y a alors formation de monomères de fibrine. Ces molécules polymérisent ensuite pour former un caillot de fibrine, secondairement stabilisé par le facteur XIII, à l'origine d'un caillot insoluble.

In vivo, en présence d'un excès de fibrinogène, une partie des FM ne conduit pas à la formation du caillot. Certaines molécules restent liées au fibrinogène entier ou partiellement clivé sous forme de différents fragments, de même qu'à certains PDF.

Les appellations « monomères de fibrine (FM) » ou « fibrine soluble », que nous utiliserons par la suite, désignent à la fois les monomères de fibrine qui circulent seuls et ceux associés au fibrinogène ou ses dérivés sous forme de complexes solubles.

3.2 Historique du dosage des monomères de fibrine

La détection des monomères de fibrine existe depuis de nombreuses années.

Les premières méthodes mises au point, comme le test à l'éthanol ou le test au sulfate de protamine, sont qualitatives et reposent sur des propriétés physico-chimiques particulières [16,17]. Après ajout du réactif (éthanol ou sulfate de protamine) et incubation, la gélification du plasma est observée macroscopiquement en cas d'augmentation des complexes solubles. Ces tests, dits de para-coagulation, manquent de sensibilité et de spécificité avec des résultats faussement négatifs en cas d'hypofibrinogénémie ou positifs en cas d'hyperfibrinogénémie [18,19]. De plus, l'interprétation est dépendante de l'opérateur.

Des méthodes semi-quantitatives sont ensuite apparues. Elles sont basées sur le principe d'agglutination de particules (hématies ou latex) recouvertes de monomères de fibrine selon le principe méthodologique mis en place par Largo *et al* [20]. Un résultat chiffré peut être rendu en fonction du titre de la dernière dilution donnant une réaction positive. Ces tests gagnent en sensibilité mais présentent toujours des performances diagnostiques inconstantes.

Enfin, des méthodes quantitatives ont pu voir le jour. La mise en place de tels tests est complexe car la structure des FM est hétérogène, en raison des actions variées de la thrombine, de la plasmine et du facteur XIII. Les méthodes les plus anciennes, basées sur la chromatographie, n'étaient pas adaptées à la routine, nécessitant un appareillage complexe et un temps de rendu des résultats ne convenant pas aux situations d'urgence. Une technique spectrophométrique a ensuite été commercialisée mais elle ne permet qu'une détection indirecte du paramètre [21]. Le principe de la méthode repose sur la transformation par les FM du plasminogène en plasmine qui agit alors sur un substrat chromogénique. Des méthodes ont ensuite été décrites avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux [22,23]. Ces anticorps reconnaissent des néo-épitopes générés pendant la conversion du fibrinogène en fibrine. Les premières méthodes manquent de standardisation, en particulier liée à l'hétérogénéité du néo-épitope reconnu par l'anticorps. De plus, certains tests nécessitent un pré-traitement de l'échantillon pour rendre accessible le site de liaison de l'anticorps, provoquant la détection non spécifique des PDF (en particulier ceux avec les motifs DDi issus de la fibrine stabilisée) [24].

La technique, que nous voulons adopter, présente l'avantage d'être entièrement automatisée, de rendre un résultat quantitatif et d'utiliser un anticorps spécifique des FM [22].

3.3 Principe de la méthode de dosage STA[®] Liatest[®] FM

La technique repose sur le dosage quantitatif des monomères de fibrine par immuno-turbidimétrie sur les automates de la gamme STA[®] (Diagnostica STAGO[®]).

Des microparticules de latex, recouvertes d'anticorps monoclonaux spécifiques, sont mises en contact avec le plasma à tester. L'anticorps utilisé dans le kit (anticorps F405) cible un site spécifique au niveau N-terminal de la chaîne α des monomères de fibrine, disponible uniquement après action de la thrombine. Il ne nécessite pas de pré-traitement de l'échantillon. De plus, il n'a

pas été montré de réactions croisées avec le fibrinogène ou ses dérivés en particulier avec les produits de dégradation de la fibrine stabilisée.

En cas de présence de fibrine soluble, la réaction antigène-anticorps entraîne une agglutination des microsphères, ce qui provoque un trouble du milieu réactionnel. L'augmentation de la turbidité du milieu, mesurée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de monomères de fibrine.

3.4 Intérêts du dosage quantitatif des monomères de fibrine

L'augmentation des monomères de fibrine, précurseurs du caillot de fibrine, se rencontre dans les situations de formation aiguë de thrombine et de fibrine. Le paramètre est donc utilisé comme marqueur d'activation de la coagulation, en particulier dans le diagnostic de CIVD [25–28].

3.4.1 Coagulation Intravasculaire Disséminée [29–33]

La CIVD est un syndrome clinicobiologique hétérogène acquis. Il est consécutif à de nombreuses situations pathologiques (figure 6). Son pronostic est souvent péjoratif.

- Sepsis
- Choc hémorragique
- Pancréatite aiguë
- Traumatisme
 - Traumatisme cérébral
 - Contusions tissulaires étendues dans le cadre des polytraumatismes
 - Embolie graisseuse
- Cancer
 - Hémopathies myéloprolifératives (leucémie aiguë myéloblastique à promyélocyte)
 - Tumeurs solides (prostate, pancréas...) métastasées
- Complications de la grossesse
 - Embolie amniotique
 - Hématome rétro-placentaire
 - Mort *in utero*
- Pathologies vasculaires
 - Hémangiomes géants
 - Anévrismes aortiques
- Réactions toxiques et immunologiques massives
- Hémolyses massives notamment post-transfusionnelles
- Venins de serpents
- Rejet de greffe humoral

Figure 6 : Principales situations cliniques pouvant être associées à une CIVD, d'après [34]

Ce syndrome résulte de l'activation systémique de la coagulation. Il y a alors formation de dépôt de fibrine, essentiellement dans la microcirculation, pouvant être à l'origine de thromboses. La consommation des facteurs de la coagulation et des plaquettes entraînent un risque secondaire hémorragique.

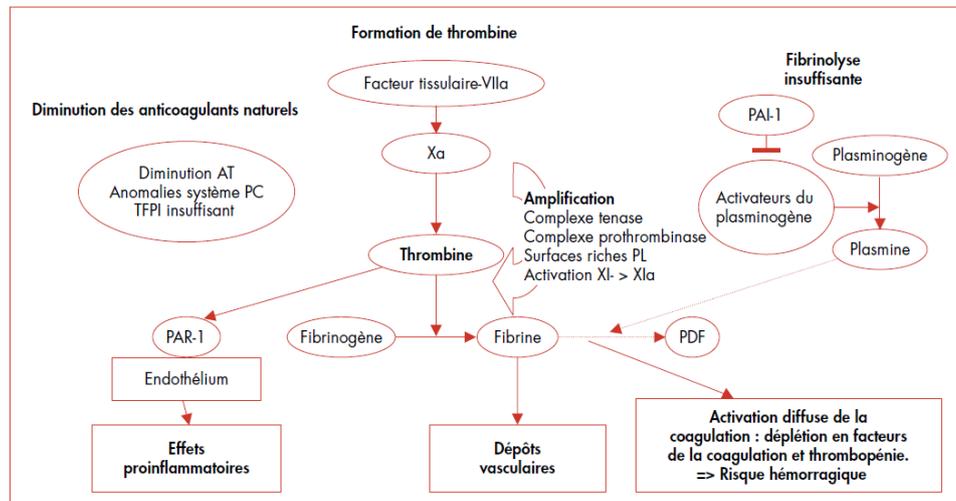


Figure 7 : Schéma simplifié des mécanismes biologiques à l'origine d'une CIVD, d'après [34]

*AT=Antithrombine ; PC=Protéine C ; TFPI=Tissue Factor Pathway Inhibitor ;
PL=Phospholipides ; PDF=Produits de dégradation de la fibrine*

Les mécanismes biologiques responsables de la survenue d'une CIVD peuvent être regroupés en trois grands principes (figure 7) :

- Une génération exagérée de thrombine par l'exposition de FT résultant de trois mécanismes :
 - l'induction de FT à la surface des monocytes et des cellules endothéliales lors de stimuli inflammatoires
 - l'exposition de FT suite à une brèche vasculaire lors de traumatisme
 - l'expression de FT sur des cellules malignes circulantes

- Une défaillance des systèmes inhibiteurs par consommation excessive et défaut de synthèse

- Un dysfonctionnement du système fibrinolytique :
 - une inhibition rapide du processus de fibrinolyse par production accrue de PAI-1 favorisant la thrombose
 - une hyperfibrinolyse secondaire pouvant participer aux complications hémorragiques.

Ces troubles de l'hémostase forment donc une « CIVD biologique ». Dans certaines circonstances, des complications cliniques peuvent apparaître, entraînant une « CIVD clinique ». La symptomatologie est variée, de signes thrombotiques à hémorragiques, et est dépendante de la pathologie sous-jacente. En cas de mise en jeu du pronostic vital et de signes de défaillance multiviscérale, on parle de CIVD compliquée (figure 8).

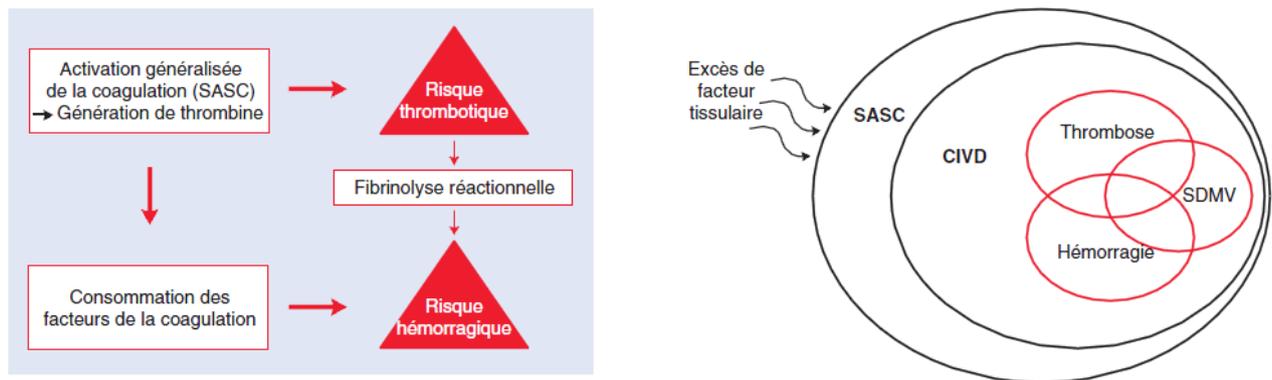


Figure 8 : Représentations schématiques de la physiopathologie de la CIVD, d'après [34]

SASC : Syndrome d'activation généralisée de la coagulation ; SDMV : Syndrome de défaillance multiviscérale

Le diagnostic est complexe et repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. Plusieurs scores existent pour aider à mettre en évidence ce syndrome et pouvoir le prendre en charge de manière appropriée [30,31,35,36]. Certains scores permettent d'évaluer une CIVD manifeste (décompensée ou clinique), d'autres un stade plus précoce de CIVD débutante (compensée ou biologique). Ils sont présentés en annexes 1 et 2. Tous doivent être répétés pour suivre l'évolutivité dans le temps du patient. Ces scores comprennent des paramètres biologiques simples, utilisables en routine dans la plupart des laboratoires, sensibles mais non spécifiques d'où l'intérêt de les associer. Les paramètres explorant la formation/dégradation de fibrine comme les FM, les PDF, les DDi apportent une information pertinente sur l'état du processus de coagulation du patient [37]. Les DDi sont le paramètre actuellement le plus utilisé car ils sont d'utilisation fiable

et ont fait l'objet de nombreuses études. Cependant, le dosage des FM, à la place des marqueurs de dégradation de la fibrine, présente plusieurs avantages [1,28,38] :

- ils sont d'apparition précoce et peuvent donc mettre en évidence les phases de pré-CIVD
- ils ne sont le reflet que du processus de coagulation contrairement aux DDi et PDF qui témoignent également du processus de fibrinolyse. Ainsi, en cours de suivi, une diminution de FM indique l'arrêt du processus de coagulation alors que les PDF peuvent rester positifs en raison de la persistance d'une fibrinolyse secondaire.
- ils ne proviennent que du secteur intravasculaire et ne sont donc pas influencés par la fibrine extravasculaire formée lors d'une inflammation locale.

Il a été montré un intérêt à utiliser préférentiellement la fibrine soluble dans le calcul des scores de CIVD avec un gain de spécificité du diagnostic de CIVD et une meilleure identification des patients à risque de mortalité [28].

3.4.2 Pathologies thrombotiques

Plusieurs études ont démontré une augmentation des FM dans les situations thromboemboliques [25,26,39].

Le paramètre biologique de référence actuellement utilisé pour éliminer une thrombose est le dosage des DDi [40]. Cependant, ce paramètre est augmenté chez certaines catégories de patients (comme les femmes enceintes) rendant son interprétation complexe. Des études récentes ont montré que les FM présentent l'avantage de ne pas être augmentés chez cette population [41].

De plus, les DDi ne sont que le reflet secondaire de la formation du caillot puisqu'ils explorent sa dégradation. Les FM témoignent, pour leur part, de l'état du processus de coagulation au moment du prélèvement chez le patient.

Enfin, les FM sont d'apparition plus rapide que les DDi et constituent donc un marqueur pré-thrombotique potentiellement utile pour diagnostiquer précocement un état thrombotique.

L'apparition de cette méthode quantitative entièrement automatisée ouvre des perspectives dans l'utilisation de ce paramètre comme marqueur précoce de thrombose. Des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser les seuils décisionnels.

4. SAIGNEMENT ET CHIRURGIE CARDIAQUE AVEC CIRCULATION EXTRACORPORELLE

L'activité de chirurgie cardiaque comprend plus de 40 000 interventions par an en France (Base de données EPICARD de la Société de Chirurgie Cardio-Vasculaire et Thoracique pour l'année 2009). Plus de 80% se font sous circulation extracorporelle (CEC). L'épidémiologie des pathologies se répartit en quatre grands groupes : les pathologies coronariennes avec revascularisation myocardique simple (35% des interventions), les pathologies valvulaires comprenant les gestes portant sur une valve (30%) et les chirurgies complexes (14%, plusieurs valves ou valve et pontage), les pathologies congénitales (7%) et les autres interventions (14% dont les transplantations, les chirurgies de l'aorte ou du péricarde).

Les indications ont évolué depuis un certain nombre d'années [42]. Dans le cadre des pathologies coronariennes, les actes de cardiologie interventionnelle (angioplastie coronaire percutanée) se sont développés avec en parallèle une stagnation voire une diminution des pontages aortocoronariens. De plus, les patients adressés pour chirurgie sont plus âgés et présentent plus de comorbidités. En ce qui concerne les pathologies valvulaires, malgré la diminution des indications pour rhumatisme articulaire, le nombre d'intervention est stable en raison de l'augmentation de la prise en charge des causes dégénératives chez des patients de plus en plus âgés. Enfin des techniques à cœur battant ou mini-invasives se sont développées.

Nous allons, dans un premier temps, décrire les grands temps du déroulement d'une CEC, puis nous définirons les mécanismes qui concourent à la tendance hémorragique en postopératoire. Nous finirons par voir les modalités de prise en charge d'un saignement postopératoire en traitant plus particulièrement du rôle du suivi des bilans d'hémostase.

4.1 Généralités [42–44]

La plupart des interventions cardiaques nécessitent un cœur exsangue et dont l'activité a été arrêtée. Les fonctions cardiaques, ainsi que la circulation cardio-pulmonaire, ne sont donc plus assurées et doivent être substituées.

Le circuit de CEC permet de remplir ces fonctions en assurant la circulation sanguine et l'hématose du patient.

Le sang veineux du patient est dérivé, en amont du cœur, par gravité vers un réservoir. Il passe ensuite dans un oxygénateur couplé à un échangeur thermique, permettant son oxygénation, décarboxylation et refroidissement ou réchauffement. Il est propulsé par une pompe, dite artérielle, vers une canule placée dans l'aorte, en aval du cœur (figure 9).

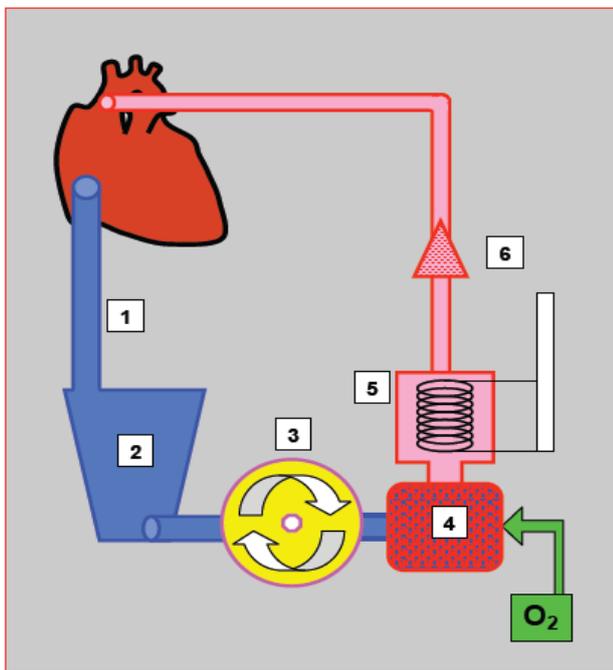


Figure 9 : Représentation schématique du circuit de CEC, d'après [41]

- 1 : canule de drainage veineux
- 2 : réservoir veineux
- 3 : pompe principale
- 4 : oxygénateur
- 5 : échangeur thermique
- 6 : filtre et canule artérielle

Le circuit se compose également d'une ou plusieurs pompes assurant la récupération du sang épanché du champ opératoire ou provenant de la décharge des cavités cardiaques, de matériels de sécurité (filtre artériel, alarmes, prise de pressions) et de matériels de surveillance des paramètres biologiques du patient.

Un circuit indépendant est réservé à la solution de cardioplégie, permettant l'arrêt et la protection myocardique du cœur non oxygéné.

Le sang provenant des aspirations du champ opératoire peut être traité par un laveur-concentrateur de cellules (de type Cell-saver[®] ou Haemoetics[®]). Il est recueilli dans une poche souple et restitué au patient en circuit fermé.

4.1.1 Composition du circuit de CEC

Les différents composants du circuit de CEC (figure 10) ont évolué au cours du temps pour limiter les effets indésirables de la procédure. Nous allons décrire les principaux constituants qui le composent. Certains sont réutilisables (pompes, débitmètres, générateurs thermiques, matériel de surveillance). Le matériel au contact du sang est à usage unique (oxygénateur, tuyaux, canules, réservoirs veineux et de cardiectomie, filtres).

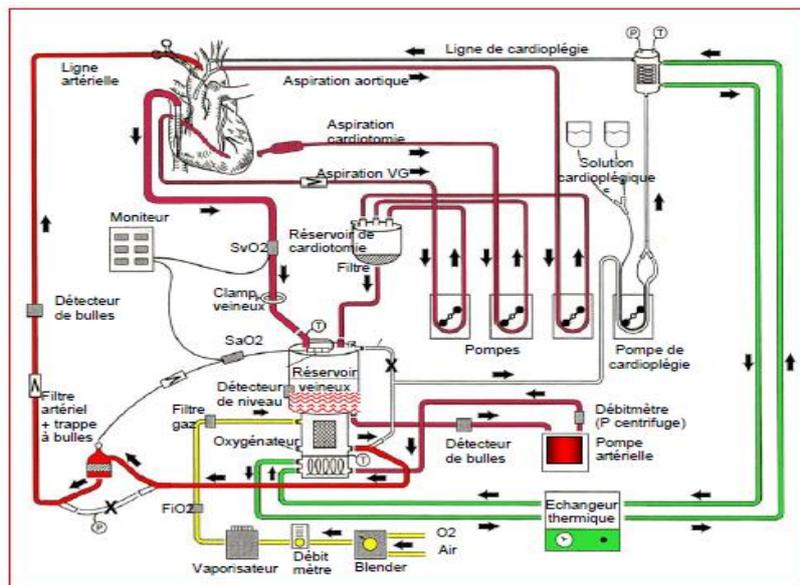


Figure 10 : composition d'un circuit de CEC, d'après [45]

- Les pompes

Les pompes permettent d'assurer la circulation du sang. La pompe artérielle assure le renvoi du sang oxygéné et décarboxylé au patient. Des pompes d'aspiration permettent le recueil du sang épanché du champ opératoire et la décharge des cavités cardiaques. Une autre pompe perfuse la solution de cardioplégie.

On distingue deux types de pompes selon le principe physique régissant leur fonctionnement : les pompes à galets ou centrifuges.

Les pompes à galets, les plus anciennes, exercent leur action par pression d'un système rotor/stator sur la tubulure. Cette action permet d'assurer un débit sanguin. Elles sont encore principalement utilisées, bien que traumatisantes et présentant potentiellement plus de risque de complications (rupture de tuyaux, embolie gazeuse, détachement de particules).

Les pompes centrifuges, à effet vortex, moins traumatisantes et plus sûres mais plus chères, sont principalement utilisées lors des procédures longues.

- Oxygénateur

L'oxygénateur assure les fonctions pulmonaires en permettant l'oxygénation et la décarboxylation du sang veineux.

On distingue les oxygénateurs à bulles et ceux à membranes.

Les oxygénateurs utilisés actuellement sont ceux à membranes (planes ou tubulaires). Le sang du patient est séparé d'un gaz par une membrane synthétique semi-perméable. L'apport de gaz est assuré par un débitmètre délivrant un mélange calibré d'air et d'oxygène. Grâce au gradient de pression partielle en gaz, l'oxygène diffuse vers le sang veineux et inversement pour le dioxyde de carbone. Ces oxygénateurs présentent l'avantage de ne pas faire entrer directement en contact le sang et l'air, comme le faisait les oxygénateurs à bulles. Ces derniers génèrent un traumatisme, à l'origine d'une hémolyse.

Les oxygénateurs sont couplés à un échangeur thermique destiné à réchauffer ou refroidir le sang du circuit de CEC et donc le malade. Il est généralement situé avant le compartiment d'échanges

gazeux. Les échanges thermiques se font par conduction thermique entre le milieu sanguin et un réseau d'eau thermostaté.

- Tuyaux

Les tuyaux de connexion entre les éléments du circuit sont en PVC ou silicone. Ils doivent être le plus hémocompatibles possibles, souples, résistants aux chocs et aux variations de température. Le PVC libère moins de particules mais résiste moins à la traction et l'étirement. Le silicone respecte mieux la plasticité des globules rouges et diminue l'agrégation plaquettaire. Des traitements de surface, comme la préhéparinisation, l'adjonction de polymères ou de molécules anti-inflammatoires, permettent d'améliorer l'hémocompatibilité.

- Canules

Les canules, comme les tuyaux, doivent être hémocompatibles. Elles sont constituées de PVC, silicone ou acier inoxydable.

Les canules artérielles assurent le retour du sang oxygéné au patient. Afin d'injecter le sang de façon non traumatisante sur les parois artérielles, les canules peuvent être coudées ou multiperforées aux extrémités. Le site de canulation est choisi en fonction de l'intervention. Plusieurs choix sont possibles : l'aorte ascendante ou descendante, l'artère fémorale, l'artère sous-clavière...

Les canules veineuses dérivent le sang veineux par gravité au niveau du réservoir veineux et de l'oxygénateur. Les sites de canulations préférentiels sont les veines caves inférieures et supérieures. D'autres sites peuvent être utilisés comme la veine fémorale ou l'artère pulmonaire.

La canule de cardioplégie permet l'administration de la solution de protection myocardique. Elle est placée dans les artères coronaires en cas d'administration antérograde ou dans le sinus coronaire en cas d'administration rétrograde.

- Filtres

La filtration du circuit est indispensable en raison de la présence de débris particuliers. Des filtres de porosités différentes sont placés sur les lignes artérielles et veineuses.

- Réservoirs de cardiectomie

Le sang épanché du champ opératoire ou des cavités cardiaques est récupéré par aspiration dans le réservoir de cardiectomie. Il peut être directement connecté au réservoir veineux, après débullage et filtration pour être réinjecté dans le circuit.

Le sang épanché peut également être traité par un système de lavage-concentration. Cette technique permet de récupérer les globules rouges du patient, qui peuvent alors être administrés dans une stratégie d'épargne sanguine.

Le circuit est également constitué de matériels de surveillance du circuit et du patient (gaz du sang, sonde thermique, contrôle des niveaux, contrôle des pressions).

4.1.2 Déroulement de la circulation extracorporelle

Les caractéristiques du patient et de sa pathologie (score de risque, type d'intervention, comorbidités, biologie préopératoire) vont guider le choix des matériaux et des conditions de la CEC (type de matériels, sites de canulation, protection myocardique ou non, degré d'hémodilution toléré, stratégie transfusionnelle, dose d'héparine).

Le bon déroulement de la procédure dépend de la bonne organisation entre le chirurgien, l'anesthésiste et le perfusionniste.

Les différents éléments du circuit sont montés et vérifiés selon une procédure codifiée (*check-list*).

Le circuit est amorcé (*priming*) par une solution de remplissage de 1 à 1,5 L. Elle est le plus souvent constituée d'un mélange de cristalloïdes et colloïdes. Une héparinisation de la solution est possible.

Après induction de l'anesthésie, le chirurgien effectue l'abord du cœur par sternotomie et incision du péricarde.

Une anticoagulation importante par héparine non fractionnée (HNF) est administrée au patient par voie intraveineuse ou directement dans les cavités cardiaques en intra-auriculaire.

Le chirurgien met alors en place les canules artérielles, de cardioplégie, veineuses et de décharge des cavités cardiaques. Elles sont ensuite reliées au circuit de CEC.

Lorsque les doses d'héparine sont suffisantes (*cf* le monitoring de la coagulation), la CEC peut commencer. L'ouverture des clamps artériels et veineux se fait progressivement. L'augmentation du débit de la pompe artérielle est réalisée graduellement pour éviter la perfusion brutale de sang hémodilué. Le cœur se vide progressivement de sang et la machine cœur-poumon assure la perfusion artérielle. Le débit de pompe théorique est atteint en 2-3 minutes.

La CEC prend alors en charge l'ensemble de la circulation, le cœur et les poumons ne sont plus irrigués. La ventilation mécanique est arrêtée. Le cœur est isolé de l'aorte par la pose d'un clamp et devient disponible pour le geste chirurgical. La solution de cardioplégie permet l'arrêt cardiaque et diminue les besoins en oxygène du myocarde, afin d'assurer sa protection pendant la durée du clamping aortique. Les solutions de cardioplégie sont le plus souvent froides (4°C) et riches en potassium. Des injections répétées toutes les 20-30 minutes doivent être effectuées. Certaines équipes utilisent une cardioplégie sanguine pour augmenter l'apport en oxygène.

Il est à noter que, historiquement, la chirurgie cardiaque s'effectuait sous hypothermie profonde. Aujourd'hui, sauf procédure particulière (comme la chirurgie de la crosse aortique), elle est effectuée en normothermie (35-37°C)

Une fois le geste chirurgical effectué, le cœur du patient est purgé de l'air qu'il contient. Après déclampage aortique, le cœur reprend une activité cardiaque seul ou après cardioversion électrique. La fermeture progressive du clamp veineux permet le remplissage progressif des cavités cardiaques par le retour veineux physiologique. En parallèle, le débit de la pompe artérielle est diminué jusqu'à ce que le cœur assure lui-même la perfusion systémique. En cas d'insuffisance de contractilité mécanique, un support par vasopresseur est réalisé. Le patient est réchauffé en parallèle. La CEC peut être arrêtée.

L'héparine circulante est ensuite antagonisée par l'injection de protamine.

Le foyer opératoire est refermé sur des drains thoraciques.

4.2 Mécanismes à l'origine du saignement en chirurgie cardiaque

On distingue généralement les causes liées au geste chirurgical de celles consécutives aux altérations acquises de l'hémostase survenant lors de la procédure. Ces causes sont en réalité le plus souvent associées et rendent le diagnostic étiologique complexe. En effet, la persistance d'un saignement chirurgical localisé peut induire une perturbation de l'équilibre de l'hémostase ; une coagulopathie peut favoriser le saignement au niveau d'un site où l'hémostase chirurgicale est précaire.

4.2.1 Origines chirurgicales

Les gestes chirurgicaux pendant la procédure sont à l'origine de nombreux traumatismes tissulaires. Une hémostase chirurgicale rigoureuse à la fin de l'intervention par suture, ligature, électrocoagulation ou avec des hémostatiques locaux (colles biologiques), permet de limiter les risques de saignement. Malgré ces précautions, dans certains cas (hémostase chirurgicale imparfaite, lâchage de sutures), un saignement d'origine chirurgicale peut tout de même survenir. Les sources de saignement les plus fréquemment observées sont les sites de canulation, le sternum, les veines ou artères pontées [46].

4.2.2 Origines non chirurgicales

Elles se manifestent typiquement sous forme de saignement microvasculaire diffus. Elles sont la conséquence d'un ensemble complexe de facteurs contribuant à perturber l'hémostase du patient pendant la procédure.

- Hémodilution

La solution d'amorçage, utilisée lors de la mise en route de la CEC, entraîne une hémodilution inévitable, à l'origine de la diminution des constituants sanguins, dont les facteurs pro et anti-coagulants et les plaquettes [47–49].

On considère qu'un taux d'hématocrite supérieur à 25 % en peropératoire et 30% en postopératoire est bien toléré [42].

- Hypothermie

L'hypothermie est depuis longtemps utilisée en chirurgie cardiaque pour réduire les besoins métaboliques des organes du patient. Or, il est décrit que les fonctions plaquettaires et les réactions enzymatiques de la coagulation sont altérées en cas de température nettement abaissée [50].

Le degré d'hypothermie varie en fonction du type de chirurgie et des centres. La plupart des interventions actuelles se déroulent en hypothermie modérée, voire en normothermie (35-37°C) pour limiter ces effets délétères [51].

- Circuit de CEC et surfaces « étrangères »

Les surfaces du circuit de CEC apparaissent comme étrangères pour les constituants du sang du patient. Il en résulte de nombreuses perturbations : adhésion protéique sur la surface, activation de l'hémostase et de l'inflammation [52–54].

Les circuits évoluent pour tenter d'améliorer l'hémocompatibilité (circuit pré-hépariné, ajout de polymères...) [42,55].

Le contact avec l'air (foyer opératoire, oxygénateur) et d'autres facteurs externes prothrombotiques (péricarde, compresses) favorisent également l'activation de l'hémostase et de l'inflammation [56].

- Anticoagulation par héparine et neutralisation par protamine

Le risque thrombotique lors de la procédure impose l'utilisation d'une anticoagulation importante par héparine. Son action doit être neutralisée en fin de CEC par l'injection de protamine.

Une réversibilité de cette neutralisation peut survenir en cas d'élimination précoce de la protamine ou de la libération secondaire d'héparine après fixation endothéliale [57–59].

De plus, il a été décrit des effets directs d'altérations de l'hémostase par l'héparine et par des doses élevées de protamine, en particulier sur les plaquettes [60,61]. Cependant, la contribution de ces phénomènes au saignement n'est pas clairement établie.

- Acidose et hypocalcémie

Le calcium joue un rôle primordial dans le processus hémostatique (agrégation plaquettaire, cofacteur des réactions de coagulation).

L'acidose est associée à une augmentation des temps de coagulation et aggrave les troubles de la coagulation.

L'association d'une coagulopathie, hypothermie et acidose correspond au concept de triade létale en traumatologie.

L'ensemble de ces mécanismes explique l'équilibre précaire de l'hémostase du patient en per et postopératoire. Les différents intervenants dans le processus d'hémostase (hémostase primaire, coagulation, fibrinolyse) sont altérés et sont plus ou moins associés au risque hémorragique.

- Thrombopénie et thrombopathies [62–66]

Les anomalies plaquettaires ont été bien décrites et sont une des composantes principales du saignement en fin d'intervention. Les taux plaquettaires diminuent d'environ 50% au début de la CEC puis se normalisent progressivement dans les jours postopératoires. L'hémodilution n'explique

pas à elle seule les taux observés. Ils s'associent des phénomènes de séquestration (essentiellement hépatique et pulmonaire), d'adhésion et d'activation au contact du circuit et sous l'action de plusieurs médiateurs, à l'origine d'une consommation et d'une destruction plaquettaire.

Les fonctions plaquettaires sont également altérées (modifications morphologiques, état réfractaire à l'activation, dégranulation, perte de protéines membranaires) par différents mécanismes :

- contact aux surfaces artificielles du circuit
 - hypothermie
 - action de l'héparine et de la protamine
 - utilisation de médicaments antiagrégants préopératoires.
- Activation de la coagulation et de la fibrinolyse et coagulopathie de consommation
 - Génération de thrombine

Le processus de coagulation est activé, pendant la CEC, par l'exposition de FT au contact du sang [67–69]. Le FT provient :

- des lésions endothéliales liées à la chirurgie et à la reperfusion myocardique après l'ischémie
- de son expression sur les cellules endothéliales et les monocytes induite par les médiateurs inflammatoires
- de la retransfusion de sang péricardique contenant de nombreux facteurs de la coagulation et monocytes activés.

La formation de thrombine est également issue de l'activation du système contact sur les surfaces non endothéliales du circuit, de l'activation directe du facteur X par les monocytes activés, ainsi que de la circulation de microparticules phospholipidiques procoagulantes issues de la fragmentation plaquettaire.

Malgré l'anticoagulation importante par héparine qui limite la formation de fibrine et donc le risque thrombotique, la génération de thrombine est continue et systémique pendant la procédure [70,71]. L'héparine ne suffit alors pas à neutraliser complètement les actions de ce facteur. La molécule exerce, pendant la CEC, ses multiples influences sur l'inflammation [72] et l'hémostase (agoniste plaquettaire, activation endothéliale, actions sur les inhibiteurs de la coagulation).

- Activation de la fibrinolyse

Elle résulte de la libération de tPA par les cellules endothéliales sous l'action de la thrombine et de la bradykinine synthétisée par l'activation du système contact [73]. Il y a alors formation de plasmine à partir du plasminogène. La molécule agit à plusieurs niveaux [74–76] :

- en détruisant les facteurs de la coagulation (fibrinogène, facteur V, facteur VIII),
- en altérant les fonctions plaquettaires (diminution de l'expression de la glycoprotéine GpIb/V/IX)
- en détruisant les caillots de fibrine avec formation de PDF dont les DDi. Ces PDF interfèrent avec le bon déroulement de la formation de fibrine et peuvent participer au saignement postopératoire [77].

La fibrinolyse semble surtout localisée dans la cavité péricardique et n'est donc pas systémique. La participation de la fibrinolyse au saignement n'est pas clairement établie. Cependant, l'utilisation d'une thérapeutique antifibrinolytique préventive pendant l'intervention est reconnue pour limiter les pertes sanguines et les besoins transfusionnels. Les effets bénéfiques ne proviendraient pas seulement de l'action anti-plasmine. Il y aurait également un effet direct sur les plaquettes en les préservant d'une altération membranaire [76,78].

- Coagulopathie de consommation

La génération de thrombine et de plasmine reste la plupart du temps localisée au circuit et dans la cavité péricardique. En cas de facteurs favorisants (sepsis, choc), l'état d'hyperactivation de l'hémostase, associé aux conséquences de l'hémodilution, peut entraîner une coagulopathie de

consommation et un état de coagulation intravasculaire disséminée contribuant au saignement postopératoire [47,79].

4.3 Prise en charge du saignement postopératoire

Il convient tout d'abord de définir la notion de saignement anormal postopératoire après CEC. Il n'existe pas de définition standard. Whitlock et al. ont répertorié les différents critères retrouvés dans la littérature (tableau I).

Tableau I : Définitions courantes du saignement excessif et massif après chirurgie cardiaque, d'après [2]

Saignement excessif	Saignement massif (reprise chirurgicale à considérer)
pertes sanguines > 1L/24h	pertes sanguines > 500 mL la 1ère heure
pertes sanguines > 100 mL/h	pertes sanguines > 400 mL/h pdt 2h
transfusions > 10 CGR	pertes sanguines > 300 mL/h pdt 3h
transfusions \geq 5 CGR dans les 24h	pertes sanguines > 20 0mL/h pdt 6h

CGR : concentre de globules rouges

Face à un saignement anormal dans les premiers instants postopératoires, il est important de distinguer une étiologie chirurgicale qui nécessitera une reprise chirurgicale, d'une coagulopathie pouvant être corrigée par différents moyens médicaux (transfusions, moyens pharmacologiques) [80,81].

En pratique, en cas de saignement massif, la reprise chirurgicale s'impose en urgence. Dans environ 50% des cas [46,82,83], une origine chirurgicale est trouvée et peut donc être corrigée. Il faut noter que même en l'absence de cause visible, le fait d'avoir réopéré est un facteur d'amélioration du saignement après retour aux soins intensifs [84].

La prise en charge s'avère plus complexe en cas de saignement modéré. Une coagulopathie doit être recherchée sur les bilans d'hémostase et corrigée. En cas de bilans normaux ou de persistance du saignement après correction de l'hémostase, une reprise chirurgicale est à envisager.

Nous allons décrire, dans un premier temps, les tests biologiques disponibles pour le monitoring de l'hémostase. Nous insisterons particulièrement sur les tests, dits conventionnels ou classiques, disponibles dans les laboratoires d'hématologie. Nous évoquerons les tests, dits « au lit du patient » ou de biologie délocalisée, développés dans le but d'obtenir un résultat rapide en s'affranchissant du délai de rendu des tests classiques. Puis, dans un second temps, nous verrons les moyens médicaux de prise en charge du saignement non chirurgical postopératoire et les critères de leur utilisation guidés par les tests biologiques conventionnels.

4.3.1 Tests biologiques dans l'évaluation du saignement non chirurgical

4.3.1.1 Tests conventionnels [85,86]

Les tests d'hémostase nécessitent des conditions préanalytiques strictes, un délai avant analyse lié à l'acheminement et une centrifugation de quinze minutes.

La majorité des analyses automatisées repose sur un principe chronométrique. Le résultat consiste à déterminer le temps de coagulation du plasma dans des conditions spécifiques à chaque test. Plusieurs technologies de détection existent en fonction des fabricants. Celle utilisée dans notre laboratoire repose sur le principe suivant : une bille magnétique est introduite dans le milieu réactionnel. La formation du caillot est définie par l'augmentation de la viscosité du mélange, déterminée par la diminution de l'amplitude de la bille sous l'effet d'un champ magnétique.

Les résultats au laboratoire sont rendus dans des conditions de qualité optimales (contrôle interne et évaluation externe de qualité, maintenance de l'équipement, vérification technique et validation biologique). Pour limiter au maximum le délai de rendu, une concertation entre le service clinique et le laboratoire est indispensable : analyses disponibles à toute heure, tous les jours, demande spécifique pour prendre en charge le prélèvement en urgence...

Nous allons décrire les principaux tests utilisés dans le suivi d'une chirurgie cardiaque.

- Tests d'hémostase globaux

Le temps de céphaline avec activateur (TCA) et le temps de quick (TQ) permettent d'explorer les deux voies anciennement admises de la coagulation. Ces voies ont été depuis révoquées mais sont toujours valables in vitro et permettent d'appliquer une démarche diagnostique : la voie intrinsèque pour le TCA et la voie extrinsèque pour le TQ.

- Temps de céphaline avec activateur

Il représente le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes après addition de phospholipides (céphaline), d'un activateur du système contact et de calcium.

Il s'exprime en secondes (valeur normale autour de 32 secondes) ou en ratio par rapport à un temps témoin (entre 0,8 et 1,20).

Il explore les facteurs du système contact (PK, KHPM, facteurs XII, XI), les facteurs VIII, IX, X, II, V et le fibrinogène. Le test est sensible à la présence d'HNF ou de dose curative d'héparine de bas poids moléculaire.

- Temps de quick

Il représente le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes après addition de facteur tissulaire et de phospholipides (thromboplastine) et de calcium.

Il s'exprime soit en secondes (valeur normale autour de 12s), soit en ratio par rapport à un témoin, soit en pourcentage de la normale (le taux de prothrombine, valeur normale supérieure à 70%). Enfin, l'expression en INR (International Normalized Ratio) permet de s'affranchir des différences de résultats en fonction du type de réactif. L'INR n'est utilisée que pour le suivi d'un traitement par anti-vitamine K (AVK).

Le TQ explore les facteurs VII, X, V, II et le fibrinogène. En raison de la présence d'un inhibiteur dans le réactif, le test est insensible à l'héparine. Cependant, en cas de surdosage en héparine, l'inhibiteur devient inefficace et le test est ininterprétable.

Le TCA et le TQ ne permettent qu'une étude globale de la coagulation. Ils ne rendent pas compte des troubles in vivo (hypocalcémie, hypothermie, thrombopénie/-pathie. De nombreux facteurs peuvent expliquer leurs perturbations, ce qui rend la corrélation au saignement aléatoire. Ils représentent, tout de même, les tests les plus courants et sont donc utiles dans les algorithmes de décision transfusionnelle.

- Temps de thrombine (TT)

Il représente le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes auquel est ajouté de la thrombine exogène.

La valeur normale est comprise entre 15 et 20 secondes.

Il permet d'explorer la fibrinoformation et de dépister une anomalie fonctionnelle du fibrinogène. Il est sensible aux inhibiteurs de la thrombine et donc à la présence d'héparine.

- Dosage du fibrinogène

Le dosage fonctionnel selon la méthode de Von Clauss est dérivé du temps de thrombine. En présence d'un excès de thrombine, le temps de coagulation d'un plasma dilué n'est fonction que de l'activité du fibrinogène.

Le taux varie entre 2 et 4 g/L.

- Dosage des facteurs II, X, et V

Le dosage différentiel de ces facteurs est dérivé de la détermination du temps de Quick. On calcule le temps de coagulation d'un plasma où tous les facteurs sont présents, excepté celui à doser. Ce temps est alors directement proportionnel à l'activité du facteur que l'on veut doser.

Le résultat s'exprime en % de la normale (valeurs normale entre 80 et 120%)

- PDF et D-dimères

Les PDF sont déterminés par des techniques manuelles semi-quantitatives d'agglutination de microparticules de latex sensibilisées par des anticorps anti-PDF ou par des techniques basées sur le principe ELISA (Ezyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les DDi peuvent être déterminés par des méthodes manuelles semi-quantitatives d'agglutination ou par des méthodes automatisées quantitatives.

- Numération et fonction plaquettaire

Le taux de plaquettes est obtenu rapidement sur les automates de cytologie. Les techniques actuelles permettent de rendre des résultats fiables.

L'étude des fonctions plaquettaires (test d'agrégation, cytométrie) est longue et non adaptée à l'urgence.

- Dosage des monomères de fibrine

Les méthodes qualitatives (test à l'éthanol) ou semi-quantitatives (agglutination) sont principalement utilisées comme marqueur de génération de thrombine en cas de coagulation intravasculaire disséminée.

Certaines études ont montré une relation entre l'augmentation du taux de monomères de fibrine et les pertes sanguines ou le besoin transfusionnel [87–90]. Le dosage quantitatif permet de rendre un

résultat fiable et rapide. L'intérêt de cette nouvelle méthode de dosage des FM est évaluée dans ce travail.

4.3.1.2 Tests non conventionnels

Les tests non conventionnels comprennent, en partie, les tests, dits de biologie délocalisée, développés pour s'affranchir des contraintes du laboratoire. Ils permettent de répondre aux attentes du service clinique en terme de rapidité de délai de rendu des résultats dans un contexte d'urgence. Dans le cadre de la chirurgie cardiaque, l'objectif est de pouvoir diagnostiquer et de surveiller sous traitement un trouble de l'hémostase. La surveillance de l'anticoagulation par héparine [91] par biologie délocalisée pendant la CEC est devenue une pratique de routine. D'autres tests se sont développés pour pouvoir adapter rapidement la prise en charge du patient lors de saignement.

Le gain de temps provient de l'absence de délai d'acheminement, de centrifugation (analyse sur sang total) et de rendu des résultats. La plupart de ces tests peuvent être effectués sur prélèvement capillaire, réduisant la quantité de sang nécessaire.

Les tests, en dehors de la surveillance de l'anticoagulation pendant la CEC, sont aujourd'hui encore peu représentés en France. Leur implantation nécessite une concertation forte entre le service clinique et le laboratoire, avec signature d'une convention. En effet, tout acte de biologie effectué dans un établissement est sous la responsabilité du laboratoire et doit remplir les critères de la norme NF EN ISO 22870 [92]. Le biologiste doit évaluer le choix technique des équipements, assurer la mise en place, la formation du personnel, le suivi des contrôles de qualité, la gestion des consommables et des réactifs et la validation des résultats. L'organisation doit répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 22870. Il s'ajoute les problèmes de coût, de la disponibilité du personnel soignant pour cette nouvelle activité, de la fiabilité des résultats vis-à-vis des tests classiques et de la validation de recommandation de seuils décisionnels. Devant ce contexte restrictif, il est à noter que ces appareils peuvent être maintenus dans le laboratoire d'hématologie, tout en apportant un gain de temps par rapport aux tests conventionnels.

Nous allons décrire les principaux tests disponibles.

- Surveillance de l'anticoagulation par héparine [91]

L'HNF est l'anticoagulant de choix lors de la CEC. Une surveillance biologique est indispensable pour vérifier que les doses soient suffisantes pour maintenir l'anticoagulation, détecter une éventuelle résistance à l'héparine, et que la neutralisation par la protamine en fin de CEC ait bien été efficace. Les protocoles d'administration et de surveillance varient en fonction des centres.

Le test de référence est la détermination de l'héparinémie par la mesure de l'activité anti-Xa au laboratoire. En raison du délai d'obtention du résultat et de la nécessité de suivre l'anticoagulation régulièrement, le test a été supplanté par des tests de biologie délocalisée.

La mesure de l'Activated Clotting Time (ACT) est la technique la plus utilisée [93,94]. Il représente le temps de coagulation d'un échantillon de sang total à 37°C recalcifié en présence d'un activateur de la voie intrinsèque (kaolin, célite). Plusieurs appareils automatisés, facilement utilisables au bloc opératoire, existent. Les mesures d'ACT sont généralement effectuées avant la première injection d'HNF (ACT de référence), cinq minutes après l'administration d'HNF puis toutes les trente minutes pendant la CEC. Les doses d'HNF sont adaptées pour maintenir l'ACT autour de 400 secondes. Un dernier ACT est réalisé après l'administration de protamine pour évaluer la nécessité d'une nouvelle injection de cette molécule en cas de neutralisation insuffisante.

La mesure d'ACT peut être perturbée par l'hypothermie, l'hémodilution, la baisse de l'hématocrite ou du taux de plaquettes.

Il existe d'autres méthodes de biologie délocalisée de suivi de l'anticoagulation.

La mesure de l'héparinémie (Hepcon[®] Medtronic[®]) sur sang total évalue l'activité anti-IIa par une méthode de titration à la protamine. Le résultat est exprimé en UI/L. L'inconvénient majeur est l'absence de valeurs cibles définies et bien codifiées pour l'interprétation de ces tests.

D'autres techniques existent mais sont peu développées (High thrombin time[®], Heparin management test[®])

- TCA et TQ délocalisés (Coagucheck[®], INR ratio[®]...)

Ces tests ont été conçus au départ pour le suivi de l'INR des patients sur sang total. Les études réalisées avec ces appareils sont contradictoires quant à leur corrélation avec les tests conventionnels et leur efficacité en situation d'hémorragie postopératoire [95,96].

- Etudes des fonctions plaquettaires

Nous avons vu que l'étude des fonctions plaquettaires représenterait un intérêt dans l'identification des causes de saignement postopératoire.

Des appareils pourraient avoir un intérêt comme le PFA 200[®] (Dade Behring[®]) [97] ou le VerifyNow[®] (Accumetrics[®]) [98,99], mais leur utilisation dans la prise en charge postopératoire du saignement après chirurgie cardiaque n'est pas clairement établie.

- Thromboélastographie

La thromboélastographie (TEG) connaît un regain d'intérêt depuis un certain nombre d'années dans l'exploration des hémorragies. La technique est connue depuis 1948. Après une période d'oubli, les appareils de nouvelles générations (TEG rotatif comme le Rotem[®]) offrent des performances analytiques et des conditions d'utilisations améliorées (plus maniable, miniaturisé, informatisé) [96]. La technique permet une analyse de la coagulation globale sur sang total. Elle analyse la coagulation, non seulement en déterminant l'initiation et l'achèvement de la formation du caillot, mais aussi en analysant en continu la fermeté du caillot pendant sa formation et la lyse qui suit. Certaines études montrent un intérêt du TEG dans la prise en charge du saignement avec une réduction des pertes sanguines et des transfusions [100,101].

Le coût élevé (la plupart des appareils sont en prêt), la nécessité d'appréhender un système différent des techniques habituelles d'hémostase, l'absence de recommandations sur l'interprétation des seuils dans la stratégie transfusionnelle, ainsi qu'une collaboration étroite indispensable entre le service et le laboratoire, freinent encore l'implantation du système.

Il est à noter qu'un autre test ancien et réactualisé connaît un intérêt potentiel dans la chirurgie cardiaque : la thrombinographie [102]. La technique explore, par fluorimétrie, la génération de thrombine, en reproduisant plus fidèlement que les tests conventionnels les conditions *in vivo* (par exemple en diminuant la quantité de facteurs exogènes permettant d'activer la réaction).

Le test permet, en particulier, d'obtenir le temps de génération de thrombine totale pendant un temps donné. Il apprécie donc la cinétique de formation du facteur dans des conditions proches de celles *in vivo*. Les applications dans la chirurgie cardiaque sont à définir [103]. La technique n'est actuellement pas standardisée ni automatisée.

4.3.1.3 Monitoring de l'hémostase au CHU de Limoges

Les tests actuellement utilisés au CHU de Limoges pour suivre l'état de l'hémostase au cours d'une chirurgie cardiaque sont les suivants :

- Bilan préopératoire

Le bilan d'hémostase préopératoire est réalisé au laboratoire sur les automates STA-R[®] (Diagnostica Stago[®]). Il comprend l'analyse du TCA et du TQ.

- Bilan peropératoire

Les mesures d'ACT sont réalisées au bloc opératoire avant l'injection d'héparine au début de la CEC jusqu'à la neutralisation par la Protamine. Pour l'instant, cette analyse n'est pas réalisée sous la responsabilité du laboratoire. Celle-ci devra être effectuée selon les conditions de la norme NF EN ISO 22870 avant le 1^{er} novembre 2016.

Une numération sanguine est adressée au laboratoire pendant l'intervention. Elle permet d'obtenir les taux d'hématocrite, d'hémoglobine et de plaquettes.

- Bilans postopératoires

Deux ou trois bilans d'hémostase postopératoires systématiques sont réalisés au laboratoire dans les heures suivant l'admission aux soins intensifs de réanimation du service de CTCV. La demande est spécifique par le terme « CEC J0 ». Elle comprend : TCA, TQ, TT, taux de fibrinogène, taux des facteurs II, X, V, taux de D-dimères, test à l'éthanol.

Le bilan, le jour suivant, est dénommé « CEC J1 ». Il comprend les mêmes paramètres. Cependant, les facteurs II, X, V ne sont réalisés qu'en cas de TP abaissé ; le dosage des DDi et le test à l'éthanol seulement en cas de facteurs abaissés et/ou d'un taux de fibrinogène bas.

Le nombre de bilans CEC J0 et J1 peut varier en fonction de l'état clinique du patient.

4.3.2 Utilisation des tests biologiques conventionnels dans la prise en charge du saignement postopératoire non chirurgical

4.3.2.1 Thérapeutiques préventives

Plusieurs facteurs de risque de saignement postopératoire ont été identifiés [104–106] :

- l'âge
- une numération préopératoire de globule rouge basse (anémie et/ou faible masse corporelle)
- le type d'intervention (chirurgie complexe)
- une réopération,
- la durée de la CEC
- l'utilisation de médicaments antiagrégants et/ou anticoagulants préopératoires.

Un score a été proposé pour évaluer le risque de saignement préopératoire [107]. Cependant, bien que ces patients soient les plus à risque hémorragique, aucune recommandation n'existe sur l'approche particulière à effectuer dans ce contexte.

Certains tests biologiques préopératoires permettent de dépister des situations à risque hémorragique, pouvant alors être prévenues par une prise en charge adaptée.

Le bilan d'hémostase préopératoire (TCA, TP) permet de dépister certaines anomalies congénitales (déficit en facteurs de la coagulation dont l'hémophilie [108]). Il détecte également le degré d'anticoagulation par AVK. En cas d'INR élevé, un traitement par vitamine K ou l'administration de concentré de complexe prothrombinique [109] pourra être utilisé en fonction de l'urgence de l'opération.

Les médicaments antiagrégants sont plus ou moins associés à un risque hémorragique. En raison de résultats contradictoires dans leurs contributions au saignement postopératoire, les AINS dont l'acide acétylsalicylique sont le plus souvent maintenus [110,111]. Les inhibiteurs de la GpIIb/IIIa sont arrêtés cinq à sept jours avant l'intervention [112,113]. Un contrôle des fonctions plaquettaires avant l'intervention, pour les patients sous antiagrégant, par un test comme le Verify Now[®] a montré un intérêt dans la réduction du saignement [99].

D'autres mesures préventives peuvent être prises, indépendamment du résultat des tests biologiques :

- limiter la durée de CEC
- réduire la surface du circuit
- utiliser les circuits les plus biocompatibles
- utiliser un antifibrinolytique en début de procédure

l'acide tranexamique est le seul antifibrinolytique actuellement utilisé en France. Il a montré son intérêt dans la réduction des pertes sanguines [114,115]. L'aprotinine n'est plus recommandé en raison de la survenue d'effets indésirables (toxicité rénale, allergie) [116].

- bonne hémostase chirurgicale
- adopter des mesures de récupération du sang périopératoire
- normaliser la température, la calcémie et l'équilibre acide/base.

4.3.2.2 Thérapeutiques curatives

La perturbation des tests biologiques postopératoires n'est pas toujours corrélée à la survenue d'un saignement [117]. Une altération du bilan biologique, sans retentissement clinique, n'est donc pas prise en charge.

Le traitement du saignement non chirurgical comprenait empiriquement la transfusion importante de produits sanguins sans critères biologiques définis. Ces méthodes sont associées à la survenue de nombreux effets indésirables en terme de morbidité (infections, réactions immunologiques) et de coût. Afin d'optimiser la prise en charge, des algorithmes décisionnels [43,62] de certains centres et des recommandations ont été publiés [118–121], utilisant des tests conventionnels d'hémostase comme critères de décision. Les taux d'hématocrite, d'hémoglobine et plaquettaire sont les paramètres les plus rapidement disponibles au laboratoire. Ils représentent donc des critères utiles d'urgence dans la décision thérapeutique.

Par ailleurs, des algorithmes prenant en compte les tests au lit du patient se sont développés ces dernières années, afin de pouvoir répondre au contexte d'urgence. Nous ne les développerons pas. Les résultats sont contradictoires. Certaines études retrouvent un intérêt par rapport aux tests conventionnels [101,122,123], d'autres non [124,125].

Nous allons voir les différents moyens disponibles (transfusionnels ou non) et l'apport des tests biologiques dans leur utilisation.

- Taux d'hémoglobine dans la stratégie transfusionnelle des concentrés de globules rouges (CGR) [118,121]

La transfusion de CGR, en parallèle de la correction de la volémie par des colloïdes ou cristalloïdes, a pour but d'assurer la volémie et l'oxygénation du patient. De plus, les globules rouges participent au bon déroulement de l'hémostase. Ils assurent une viscosité permettant la margination des plaquettes au plus près d'une éventuelle brèche vasculaire et favorisent l'agrégation plaquettaire et la coagulation.

La notion de seuil transfusionnel est critiquée, car la transfusion est une décision complexe, dans laquelle intervient notamment, outre le taux d'hémoglobine, la réserve cardiaque, l'estimation de la

vitesse du saignement, la tolérance clinique. Toutefois, la notion selon laquelle il n'existe pratiquement pas de situation nécessitant un taux supérieur à 10 g/dl n'est pas remise en cause. Un seuil de l'ordre de 7 g/dl est généralement admis au cours de l'anesthésie des sujets sans antécédents cardiovasculaires.

Pour les patients ayant de tels antécédents, il existe une discussion entre 7 et 10 g/dl, mais il n'existe pas de bénéfice démontré pour des taux supérieurs à 9 g/dl, seuil qui est donc recommandé, sauf évidence clinique contraire. Il apparaît raisonnable de conserver le seuil de 10 g/dl dans les cas de pathologie cardiaque avérée et menaçante.

En résumé, avec toutes les réserves que la notion de seuil impose, les seuils suivants sont retenus :

- 7 g/dl chez les personnes sans antécédents particuliers ;
- 8-9 g/dl chez les personnes ayant des antécédents cardiovasculaires ;
- 10 g/dl chez les personnes ne tolérant pas cliniquement les taux inférieurs ou atteintes d'insuffisance coronaire aiguë ou d'insuffisance cardiaque avérée et chez les patients victimes de traumatisme crânien à la phase aiguë.

- Numération plaquettaire et transfusion plaquettaire [119,121]

Les plaquettes sont principalement suivies par leur numération, les délais d'étude des fonctions plaquettaires n'étant pas compatibles avec l'urgence.

Les recommandations françaises [119] déterminent le seuil transfusionnel curatif en chirurgie cardiaque à 100 G/L en cas de saignement microvasculaire, voire à 50 G/L en l'absence de trouble de la coagulation associé.

- Plasma frais congelé et tests d'hémostase [120,121,126]

Le plasma frais congelé (PFC) permet d'apporter les éléments nécessaires au processus d'hémostase. En raison de prescriptions pendant longtemps inadaptées (utilisation comme solution de remplissage) et des risques d'effets secondaires élevés (infections), les recommandations

françaises [120] limitent son utilisation aux seules situations associant saignement et troubles biologiques documentés de la coagulation.

Dans le cadre de la chirurgie cardiaque, l'administration de PFC est envisagée après correction des troubles hémorragiques (neutralisation correcte de l'héparine, normothermie, taux d'hématocrite supérieur à 30% et numération plaquettaire supérieure à 50 G/L), persistance du saignement et présence des troubles de l'hémostase suivants :

- TP et/ou facteurs de la coagulation inférieurs à 40%

ou

- TCA M/T supérieur à 1,8

ou

- Fibrinogène inférieur à 1 g/L.

Une évaluation biologique de l'efficacité de la transfusion est indispensable.

Une administration par anticipation en urgence peut être justifiée seulement en cas de perte massive et persistante (supérieure à une masse sanguine). Le plus souvent, il y a prescription conjointe de CGR et de PFC selon un rapport 1/1. L'évaluation biologique reste nécessaire à posteriori.

- Stratégie d'épargne sanguine

Une stratégie d'épargne sanguine est nécessaire, en parallèle, pour limiter les besoins en produits sanguins et les risques associés.

En plus des actions préventives que nous avons vues, des moyens médicaux non transfusionnels peuvent être utilisés pour traiter un saignement postopératoire. Pour certains, la décision peut être guidée par les tests d'hémostase :

- Administration de protamine [127]

En fin de CEC, les doses de protamine sont calculées selon les doses d'héparine administrées pendant l'intervention. Une quantité supplémentaire de protamine peut être administrée à nouveau en cas de persistance du saignement..

Un allongement de l'ACT ou du temps de thrombine peut témoigner d'une neutralisation incomplète et d'un besoin supplémentaire en protamine.

- Administration de fibrinogène

Des taux bas de fibrinogène sont associés au saignement. Plusieurs études ont montré l'intérêt d'une administration postopératoire dans la réduction du saignement et des besoins transfusionnels [128,129].

Il n'existe pas de recommandations strictes. On considère que des taux inférieurs à 0,8-1g/L devraient être corrigés [130].

- Antifibrinolytique et marqueurs de fibrinolyse

L'utilisation d'antifibrinolytique de manière curative peut être envisagée mais n'est pas beaucoup documentée. Certaines études ont tout de même proposé une utilisation des marqueurs de fibrinolyse comme critères d'utilisation de cette thérapeutique [43]. Un risque thrombotique doit être pris en compte au moment de l'administration.

D'autres thérapeutiques ont été étudiées dans l'amélioration du saignement et besoins transfusionnels sans qu'il n'y ait de recommandation particulière. Elles sont utilisées en cas de saignement réfractaire à la prise en charge classique.

- Administration de Facteur VII recombinant (rFVII)

Le rFVII (Novoseven[®]), initialement utilisé chez les patients hémophiles porteurs d'un inhibiteur, a vu son extension d'utilisation. Ainsi, la molécule a montré un intérêt dans la réduction du saignement et des besoins transfusionnels en chirurgie cardiaque [131]. Un protocole est proposé hors-AMM [132] en cas de saignement réfractaire postopératoire.

Il comprend les étapes suivantes :

- transfusion de plaquettes
- vérification des facteurs de la coagulation
- reprise chirurgicale
- NovoSeven[®] à envisager si le patient continue de saigner.

- Concentré de facteurs XIII

Ce facteur intervient dans la stabilisation du caillot de fibrine. Tout comme les autres facteurs de la coagulation, il est abaissé au cours de la CEC [133,134]. Il n'est pas exploré par les tests globaux d'hémostase. Sa détermination n'est donc pas effectuée en routine. Cependant, des études ont montré la relation entre le taux abaissé du facteur et les pertes sanguines. Des études sont en cours pour évaluer l'intérêt d'une substitution par ce facteur dans le traitement du saignement postopératoire en cas d'échec des thérapeutiques classiques [135].

Il est intéressant de noter qu'une relation est établie entre le déficit en facteur XIII, l'augmentation des monomères de fibrine et le saignement postopératoire après chirurgie cardiaque. L'hypothèse est qu'en présence d'un taux insuffisant de facteur XIII, la stabilisation des monomères de fibrine ne peut avoir lieu. Ces derniers s'accumulent sans que le caillot ne se forme, ce qui est à l'origine du saignement [88].

- Desmopressine

La desmopressine permet le relargage par les cellules endothéliales de VWF, de facteur VIII et tPA. Son utilisation est possible en cas de saignement réfractaire [136] mais reste exceptionnelle.

DEUXIEME PARTIE : ETUDES EXPERIMENTALES

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Etude de vérification de la méthode

Le travail a fait l'objet d'une communication sous forme de poster au congrès du Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT) de Clermont-Ferrand les 6 et 7 octobre 2011 (annexe 3).

1.1.1 Matériels

Les analyses ont été réalisées à partir du reliquat des tubes de patients ayant un bilan d'hémostase réalisé dans notre laboratoire ou à partir des CIQ du coffret STA[®] Liatest[®] FM control (Diagnostica Stago[®]). Les prélèvements des patients ont été effectués sur des tubes contenant du citrate de sodium (BD Vacutainer[®] avec citrate de sodium 0,129M). Les dosages ont été réalisés à partir d'échantillons frais ou après congélation à -20°C. Ils n'ont pas été conservés après analyse.

Le dosage des FM a été effectué à l'aide du coffret STA[®] Liatest[®] FM (Diagnostica Stago[®]).

L'étude a été réalisée sur les trois automates STA-R[®] Evolution 3503, 2671 et 2719 du laboratoire. L'automate 3503 est l'automate principal sur lequel sera effectué le dosage en routine ; les automates 2671 et 2719 seront utilisés en cas de panne. Les calibrations ont été réalisées à l'aide du kit STA[®] Liatest[®] FM Calibrator (Diagnostica Stago[®]).

1.1.2 Méthodes

Le Cofrac a publié des documents à destination des laboratoires de biologie médicale. Ils sont une aide pour appréhender l'ensemble du processus d'accréditation en apportant des informations et recommandations reconnues par cet organisme comme appropriées pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189.

Pour réaliser la vérification de méthode, nous nous sommes basés en particulier sur les guides technique d'accréditation LAB GTA 04 (valable jusqu'à avril 2011) et SH GTA 04 (valable à partir d'avril 2011).

Ils définissent les recommandations sur l'organisation générale, les informations à connaître, les critères de performance à analyser et leurs modes de calculs pour réaliser une vérification/validation des méthodes en biologie médicale. Ils précisent, en particulier, les différentes étapes avant de réaliser les analyses de la vérification.

La première étape consiste à effectuer une revue bibliographique concernant le paramètre à vérifier. Nous nous sommes appuyés sur des documents relatifs aux principes de la méthode, à des études dans certaines pathologies et à des évaluations des performances techniques.

La deuxième étape consiste à déterminer les critères de performance à évaluer. Le guide les définit en fonction du type méthode (quantitatif ou qualitatif) et en fonction du type de « flexibilité » de la méthode. Une méthode est de portée flexible standard A dite adoptée lorsqu'elle correspond à un dispositif médical de diagnostic in vitro (DM-DIV) marqué « CE ». Ce marquage signifie que le dispositif commercialisé a prouvé sa conformité aux exigences européennes et françaises avant commercialisation. Une méthode est de portée flexible étendue B lorsque le LBM développe une méthode interne ou adapte une méthode fournisseur en ne respectant pas formellement les recommandations du fabricant et en ajustant certains paramètres (volume de réaction, stabilité des réactifs...). On parle de vérification sur site des performances pour une méthode adoptée et de validation des performances pour une méthode adaptée ou développée.

La méthode de dosage STA[®] Liatest[®] FM est une méthode quantitative issue d'un DM-DIV marqué « CE ». La vérification consiste donc à documenter, par bibliographie, les paramètres définis par le SH GTA 04 (figure 11). Nous devons également, pour certains d'entre eux, vérifier par analyses que les performances annoncées sont retrouvées dans les conditions de notre laboratoire.

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
Spécificité analytique	Oui	Non	Oui
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Oui	Oui	Oui
Justesse (approche de la)	Oui	Oui, dès que possible	Oui
Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)	Oui	A vérifier si nécessaire ⁴	Oui
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Oui	Oui	Oui
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Oui	Oui, pour les paramètres sensibles	Oui
Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)	Oui	Non	Oui
Robustesse	Non	Non	si besoin
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)	Oui	à vérifier si nécessaire ⁵	Oui
Intervalle de référence « ex-valeurs normales »	Oui	à vérifier dès que possible, si justifié	Oui à établir
Comparaison avec une méthode de référence	Oui (si existe)	Non	Oui (si possible)
Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD) ⁶	Oui (si existe)	Oui (si possible)	Oui
Analyse des discordances ⁷	Oui	Oui	Oui
Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude⁸ de la méthode ou du système analytique.			

Figure 11 : Critères de performance lors d'une vérification/validation de méthode quantitative selon le guide SH GTA 04

Comme le préconise le guide, nous avons étudié uniquement par bibliographie les paramètres suivants : la spécificité analytique, l'intervalle de mesure, les interférences et la stabilité des réactifs.

Les paramètres à vérifier à la fois par bibliographie et par analyse sur site ont été : la fidélité, l'approche de la justesse, l'évaluation de l'incertitude de mesure, la contamination entre échantillons, l'intervalle de référence, une comparaison avec l'ancienne méthode de détection des FM et une comparaison entre nos trois automates. Les principes méthodologiques permettant de vérifier les critères de performance sont basés sur les recommandations du guide et nous allons les décrire.

- Etude de fidélité (Répétabilité et Fidélité intermédiaire)

La répétabilité a été réalisée sur deux niveaux de concentrations différents : un niveau bas et un niveau haut obtenus par mélange de plusieurs plasmas de patients. Chaque niveau a été analysé vingt fois de suite sur l'automate STA-R[®] 3503 et quinze fois de suite sur les deux autres automates STA-R[®] 2671 et 2719. L'effectif a été réduit sur les deux automates de secours en raison du coût élevé des réactifs.

La fidélité intermédiaire ou reproductibilité a été réalisée en analysant les résultats des CIQ quotidiens. Il existe deux niveaux (un bas et un haut), dosés deux fois par jour pendant quinze jours pour obtenir trente déterminations par automate.

L'exploitation des résultats des deux études de fidélité a consisté à calculer, pour chaque niveau, sur chaque automate, le coefficient de variation (CV) selon la formule :

$$CV (\%) = \frac{s}{m} \times 100$$

« *m* » la moyenne des valeurs obtenues en µg/mL

« *s* » l'écart-type en µg/mL

Les CV calculés ont été comparés aux CV limites admissibles préalablement établis.

- Contamination entre échantillons

Le SH GTA 04, le plus récent, est le seul document faisant foi. Cependant, nous avons conservé une méthode de calcul provenant du LAB GTA 04 concernant l'évaluation de la contamination inter-échantillons pour les automates de secours 2671 et 2719 ; les tests ayant été réalisés avant la parution du SH GTA 04 et nous n'avons pas jugé nécessaire de suivre les nouvelles recommandations de calcul.

Selon le SH GTA 04, le test de contamination consiste à analyser trois fois consécutivement un échantillon à valeur élevée (H1, H2, H3, de moyenne mH) puis trois fois de suite un échantillon à

valeur basse (B1, B2, B3). Cette séquence est répétée cinq fois permettant d'obtenir la moyenne des B1 (mB1) et celle des B3 (mB3).

L'exploitation des résultats consiste à vérifier que les moyennes B1 et B3 ne diffèrent pas significativement à l'aide d'un test *t* de Student avec calcul de *p*. Une différence significative est observée en cas de *p* inférieure à 0,05. La contamination est ensuite calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Contamination (\% selon SH GTA 04)} = \frac{(mB1 - mB3)}{(mH - mB3)} \times 100$$

Le guide LAB GTA 04 ne recommandait la réalisation que d'une seule séquence H1, H2, H3 (de moyenne mH) B1, B2, B3. Le calcul était effectué selon la formule suivante :

$$\text{Contamination (\% selon LAB GTA 04)} = \frac{B1 - B3}{mH} \times 100$$

Les échantillons sont obtenus par mélange de plasmas de patients.

Les résultats des tests de contamination sont comparés aux limites fixées préalablement.

- Incertitudes/Facteurs de variabilité

Concernant ce critère de performance, le guide SH GTA 04 renvoie au guide SH GTA 14 : « guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale ».

Nous avons, dans un premier temps, analysé le processus de mesure pré-analytique et analytique. Pour cela, nous avons réalisé pour chaque phase, un diagramme des 5M, où nous avons identifié et regroupé en cinq grandes catégories (Moyen, Milieu, Méthode, Main d'œuvre, Matière) les principaux facteurs de variabilité pouvant influencer le résultat. Chaque facteur a été pondéré selon

une estimation de son influence relative. Les moyens mis en œuvre pour les maîtriser ont été décrits.

Le guide propose ensuite quatre méthodes différentes pour évaluer quantitativement l'incertitude de mesure. La première est la méthode « GUM », méthode de référence reconnue internationalement. Cependant, cette démarche est complexe, nécessitant de connaître le modèle physico-chimique de la technique et d'avoir modélisé statistiquement l'ensemble des facteurs de variabilité. Or, l'ensemble des composantes en biologie médicale est difficile à obtenir et rend cette méthode peu applicable dans notre discipline. C'est pour cela que trois autres méthodes sont proposées, plus simples d'accès. La première, nécessite l'existence d'un matériau de référence. La deuxième, requiert l'exploitation de comparaison inter-laboratoires soit par recueil et comparaison des données des CIQ d'un même lot, soit à l'aide d'un échantillon de contrôle de valeur inconnue dans le cadre d'une évaluation externe de la qualité (EEQ). En l'absence de l'existence actuelle de tous ces paramètres, l'incertitude de mesure ne peut être évaluée.

- Approche de la justesse

L'évaluation de la justesse nécessite, de la même façon que pour l'incertitude de mesure, l'existence de programmes de comparaison inter-laboratoires soit par externalisation des CIQ, soit par EEQ.

- Intervalle de référence

Nous avons voulu vérifié les données du fournisseur. Pour cela, nous avons dosé trente-deux plasmas humains présumés normaux. Les critères de sélection ont été : prélèvements provenant du service des urgences, hémostase normale (TCA, TP et taux de fibrinogène normaux), absence de pathologie pouvant interférer avec l'hémostase.

Les dosages ont été effectués sur l'automate 3503.

Les valeurs inférieures à 5 µg/mL ont été considérées égales à 5 µg/mL.

Après calcul de la moyenne « m » et de l'écart-type « s », nous avons éliminé les valeurs aberrantes supérieures à $[m+2s]$ ou inférieures à $[m-2s]$. Nous avons ensuite calculé la moyenne tronquée « m_t » et l'écart-type tronqué « s_t ». Les valeurs de référence sont comprises dans l'intervalle :

$$[m_t - 2s_t ; m_t + 2s_t]$$

- Comparaison de la méthode entre les différents automates du laboratoire

Nous avons comparé les résultats du dosage du paramètre de trente-deux échantillons différents entre l'automate principal STA-R[®] 3503 (X_n) et les deux autres automates STA-R[®] 2671 et 2719 (Y_n et Y'_n). « n » représente le rang de mesure de chaque valeur. Les prélèvements de patients ont été sélectionnés pour couvrir l'ensemble du domaine de mesure de la méthode (de 5 à 150 $\mu\text{g/mL}$). L'analyse des échantillons frais ou après congélation a été effectuée sur les trois automates dans le délai le plus court possible.

Nous avons représenté graphiquement X_n en fonction respectivement de Y_n et Y'_n et calculé les équations des droites de régression, respectivement $Y=aX+b$ et $Y'=a'X+b'$ avec a ; a' les pentes et b ; b' les ordonnées à l'origine.

Nous avons calculé les différences $X_n - Y_n$ et $X_n - Y'_n$ et les rapports X_n/Y_n et X_n/Y'_n puis représenté graphiquement $X_n - Y_n$ puis $X_n - Y'_n$ en fonction de X ainsi que X_n/Y_n puis X_n/Y'_n en fonction de X . Nous avons reporté sur le diagramme des différences, les limites de suivi selon la formule :

$$\text{Limites de suivi} = \pm \sqrt{(3\sigma_{FI \text{ automate 1}})^2 + (3\sigma_{FI \text{ automate 2}})^2}$$

σ_{FI} : l'écart-type de la fidélité intermédiaire obtenue à partir des CIQ

Les valeurs de a et a' ainsi que b et b' sont comparées aux limites fixées. Nous vérifions l'absence de discordance sur les diagrammes de différences (en particulier l'absence de valeurs en dehors de la limite de suivi) et les diagrammes des rapports.

- Intervalle de Mesure

L'intervalle de mesure est déterminé d'une part par la limite de quantification et d'autre part par la limite supérieure de linéarité. Ces données sont vérifiées uniquement par bibliographie.

- Stabilité des réactifs

La stabilité des réactifs est vérifiée uniquement par bibliographie.

- Interférence-Spécificité analytique

Les interférences sont vérifiées uniquement par bibliographie.

Avant d'analyser l'ensemble des critères de performance que nous venons de définir, nous avons déterminé les limites d'acceptabilité de chaque paramètre vérifié sur site (tableau II). Celles-ci ont été définies par analyse bibliographique en fonction des performances établies par le fournisseur et par d'autres laboratoire ainsi que de l'utilisation et de l'interprétation qui sera faite du paramètre dans le cadre d'un diagnostic de CIVD. Nous retenons en particulier que le paramètre doit être répété dans le temps et évalué en fonction de la clinique et des autres paramètres biologiques pertinents.

Tableau II : Limites d'acceptabilité des critères de performance vérifiés sur site

	Limites d'acceptabilité	
	Niveau bas	Niveau haut
Fidélité (CV%)	8	5
Contamination (%)	+/- 3	
Corrélation	pente	Ordonnée à l'origine
	0,9-1,1	proche de 0

Les résultats ont été inscrits informatiquement dans le tableur excel[®] de validation/vérification de méthode commun à l'ensemble du laboratoire de pôle de biologie-hygiène du CHU de Limoges (annexe 5). Nous avons participé à sa finalisation au cours de ce travail. Ce fichier reprend les informations et les méthodes de calculs proposées par le SH GTA 04 ainsi que le modèle possible de présentation des résultats de la vérification/validation de méthode à fournir à l'organisme accréditeur selon le formulaire SH Form 43 : « Fiche type quantitatif - Vérification (portée A) / Validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale ».

1.2 Etude prospective observationnelle

1.2.1 Population étudiée

Les patients adultes nécessitant une chirurgie cardiaque avec CEC ont été inclus. Les interventions en urgence, greffe cardiaque, reprise chirurgicale précoce, assistance implantable et les patients sous tutelle ou curatelle n'étaient pas éligibles.

1.2.2 Déroulement de l'intervention

L'anesthésie était effectuée selon un protocole d'Anesthésie Intra-Veineuse à Objectif de Concentration (AIVOC) à base de propofol et remifentanyl [137,138]. Certains patients ont reçu, en plus, de la Ketamine ou un préconditionnement halogéné.

Le choix des composants du circuit de CEC était à la discrétion du perfusionniste.

En fin d'intervention, la fermeture sternale était effectuée après placement de plusieurs drains thoraciques : rétrosternaux, pleuraux, péricardiques et dans certains cas sous-cutanés.

1.2.3 Recueil des données cliniques

Les données recueillies ont compris :

- les caractéristiques préopératoires :
 - l'âge
 - le sexe
 - le poids
 - le score de risque de mortalité postopératoire Euroscore II[®] [139]

- les données peropératoires :
 - le type de chirurgie : nous avons distingué les interventions coronaires simples, les interventions valvulaires simples et les interventions complexes (plus d'une procédure)
 - la durée de la CEC
 - le débit maximum de la pompe artérielle de CEC
 - la dose totale d'héparine
 - la nature et la quantité des transfusions
 - le volume de récupération de sang peropératoire et réinjecté au patient par la technique Cell Saver[®]

- les données postopératoires :
 - le volume et le débit du saignement postopératoire des drains thoraciques : à l'arrivée aux soins intensifs, à une heure, à trois heures, à six heures, à douze heures, à vingt-quatre heures et à quarante-huit heures

- la nature et la quantité des transfusions pendant les premières quarante-huit heures
- la date d'ablation des drains
- la durée de séjour aux soins intensifs
- les reprises chirurgicales éventuelles pour saignement et leurs causes identifiées
- le décès éventuel.

1.2.4 Recueil des données biologiques

Les analyses recueillies sont présentées dans le tableau III.

Tableau III : Récapitulatif du recueil biologique (étude observationnelle)

	Bilan Préopératoire	Bilan pendant l'intervention	Bilans Postopératoires J0	Bilans Postopératoires J1
TCA	✓	✓	✓	✓
TP	✓	✓	✓	✓
Fibrinogène		✓	✓	✓
TT			✓	✓
Facteur II			✓	Si besoin
Facteur X			✓	Si besoin
Facteur V			✓	Si besoin
D-dimères			✓	Si besoin
Test à l'éthanol			✓	Si besoin
Monomères de fibrine	✓	✓	✓	✓
Hémoglobine	✓		✓	
Hématocrite	✓		✓	
Plaquette	✓		✓	

Le dosage des FM a été ajouté aux prélèvements pré et postopératoires réalisés systématiquement au laboratoire d'hématologie lors d'une CEC. Les analyses d'hémostase ont été effectuées sur des tubes contenant du citrate de sodium (BD Vacutainer® avec citrate de sodium 0,129M). Les prélèvements pour la numération sanguine (plaquette, hématocrite, hémoglobine) ont été réalisés

sur des tubes contenant de l'acide éthylène diamine tétraacétique dipotassique (BD Vacutainer® avec EDTA K2).

Le bilan d'hémostase pendant l'intervention n'est généralement pas effectué. Une partie du prélèvement pour ACT et gaz du sang, habituellement éliminée, a été placée dans un tube d'hémostase pédiatrique (BD Vacutainer® avec citrate de sodium 0,105M de 1,8 mL). Il n'y a donc pas eu de prélèvement supplémentaire pour le patient.

- Temps des prélèvements

Le prélèvement préopératoire a été réalisé la veille de l'intervention, excepté dans le cas d'une intervention programmée le lundi matin. Le prélèvement était alors réalisé le vendredi précédent.

Le prélèvement pendant l'intervention a été effectué après la sortie de CEC et l'injection de Protamine.

Les prélèvements postopératoires ont été réalisés sur un cathéter artériel, le plus souvent en position radiale ou à défaut en position fémorale. Les prélèvements postopératoires identifiables au laboratoire par l'appellation « CEC J0 » ont été réalisés dans l'unité de soins intensifs de CTCV le jour de l'intervention après la remontée du bloc opératoire. Un premier prélèvement a été effectué à l'arrivée aux soins intensifs. Les prélèvements suivants, généralement au nombre de deux, ont été effectués à différents temps en fonction de plusieurs facteurs (heure de remontée aux soins intensifs, situations cliniques du patient...). En raison de l'hétérogénéité de l'heure de prélèvement entre les patients, ces bilans ont été définis par le délai en minutes les séparant du premier prélèvement postopératoire.

Les prélèvements postopératoires identifiables par l'appellation « CEC J1 » ont été réalisés le lendemain de l'intervention. Contrairement aux bilans « CEC J0 » où tous les tests sont systématiquement réalisés, certains paramètres sont effectués en fonction du résultat des TCA, TQ et du taux de fibrinogène. Il n'y a eu généralement qu'un seul prélèvement le lendemain matin de l'intervention. Les bilans ont également été définis par le délai en minutes les séparant du premier prélèvement postopératoire.

- Modalités de réalisation des analyses

La numérations sanguine a été effectuée sur les automates de cytologie du laboratoire : le Cell Dyn Sapphire[®] (Abbott[®]) ou l'Advia 2120i[®] (Siemens[®]).

Les prélèvements d'hémostase ont été centrifugés quinze minutes à 2250 g à 20°C pour obtenir un plasma déplaqueté.

Les analyses ont été effectuées en même temps que les tests de routine au laboratoire.

Elles ont été réalisées, excepté le test à l'éthanol, sur l'un des trois automates STA-R[®] Evolution (Diagnostica Stago[®]) du laboratoire d'hématologie. Le TCA a été réalisé à l'aide du réactif STA-PTT[®] automate 5 (valeurs normales autour de 32 secondes), le TQ à l'aide du réactif STA-Néoplastine[®] CI plus 10 (valeurs normales autour de 12 secondes), le fibrinogène à l'aide du réactif STA-Fibrinogen[®] 5 (valeurs normales comprises entre 2 et 4 g/L), le temps de thrombine à l'aide du réactifs STA-Thrombin 10 (valeurs normales comprises entre 15 et 20 secondes), les taux de facteurs II, X et V à l'aide des réactifs STA-Déficient[®] II, X et V (valeurs normales comprises entre 70 et 120%), le dosage quantitatif des D-dimères à l'aide du réactif STA Liatest[®] DDi (valeurs normales inférieures à 0,5 µg/mL) et le dosage des monomères de fibrine par la technique STA-Liatest[®] FM (valeurs normales inférieures à 6 µg/mL).

Le test à l'éthanol a été effectué selon une technique manuelle à l'aide d'eau distillée et d'éthanol.

1.2.5 Analyses des données

Les données ont été recueillies informatiquement sur un tableur Excel[®].

Les résultats des variables continues sont exprimés en moyenne et écart-type, excepté les données concernant le saignement et les taux de FM exprimés également en médiane et premier et troisième quartile. Les variables discrètes sont exprimées en nombre de cas et pourcentage.

Les bilans postopératoires ont été regroupés en quatre catégories en fonction du délai les séparant du premier prélèvement postopératoire noté « [0 min] » :

- « [+ 1-359 min] »

- « [+ 360-719 min] »
- « [+ 720-1079 min] »
- « [+ 1080-2440 min] »

La variation des taux de FM a été représentée graphiquement.

L'étude de la relation entre les taux de FM et les complications hémorragiques s'est déroulée d'une part, par l'analyse de la corrélation des valeurs avec le saignement postopératoire et d'autre part, en comparant les taux entre deux catégories de patients : ceux avec saignement postopératoire excessif et ceux avec saignement normal. Le seuil du saignement pathologique a été établi à 100 mL/h pendant la première heure.

Le logiciel XL STAT[®] (Addinsoft[®]) a été utilisé pour la réalisation des tests statistiques. Le test de Mann-Whitney pour les variables continues et le test exact F de Fisher pour les variables discrètes ont été appliqués pour les comparaisons des résultats. Le test Spearman a permis l'étude de la corrélation. Les tests statistiques étaient considérés significatifs pour une valeur de p inférieure à 0,05.

1.2.6 Aspects réglementaires et éthiques

Le recrutement a été réalisé dans le service de CTCV au moment du prélèvement préopératoire. Un document d'information était remis au patient. Celui-ci pouvait alors refuser de participer à l'étude (annexe 4). La confidentialité des données étaient assurée par une codification des sujets comprenant les trois premières lettres du nom et la première lettre du prénom. Le protocole a reçu l'approbation du comité d'éthique du CHU de Limoges.

2. RESULTATS

2.1 Résultats de l'étude de vérification de la méthode

L'ensemble des résultats de la vérification de méthode est consigné dans l'annexe 5.

2.1.1 Etude de fidélité

Pour l'étude de répétabilité, les CV du niveau bas varient entre 7,21 et 7,31% et 2,52 et 4,45% pour le niveau haut. Ils sont présentés dans le tableau IV. Les dispersions des valeurs sont représentées sur les figures 12 à 14.

Tableau IV : Etude de répétabilité des automates STA-R 350, 2719 et 2671

		Mesures	Moy FM ($\mu\text{g/mL}$)	ET ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV(%) tournoys <i>et al.</i>	CV (%) limite	Conclusion
Niveau bas	3503	20	8,52	0,61	7,21	8 (17,3*)		8	conforme
	2719	15	7,66	0,55	7,22				conforme
	2671	15	8,62	0,63	7,31				conforme
Niveau haut	3503	20	105,29	4,52	4,04	3,1 (100,1*)	3,6 (68,8*)	5	conforme
	2719	15	103,40	2,61	2,52				conforme
	2671	15	97,26	4,32	4,45				conforme

* : valeurs moyennes en $\mu\text{g/mL}$ des taux de FM du plasma testé

Moy : Moyenne ; ET : Ecart-type

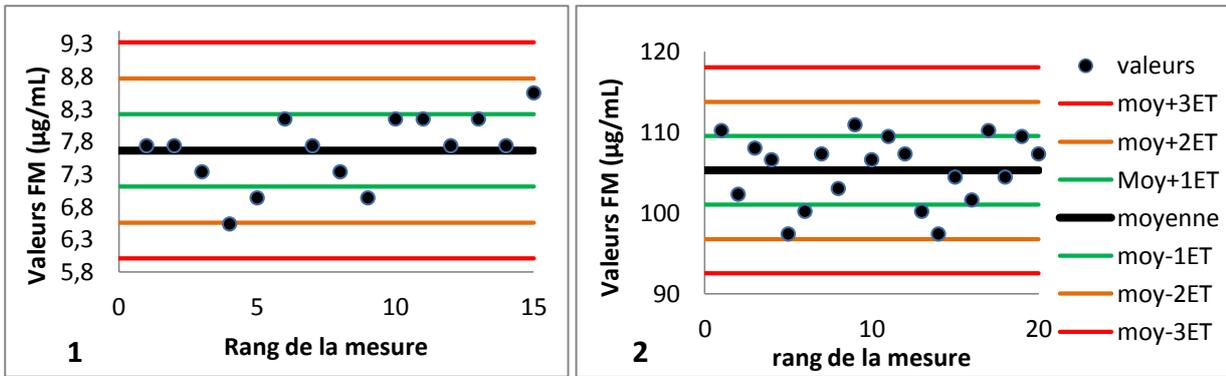


Figure 12 : Répétabilité de l'automate 3503 des niveaux bas (1) et haut (2)

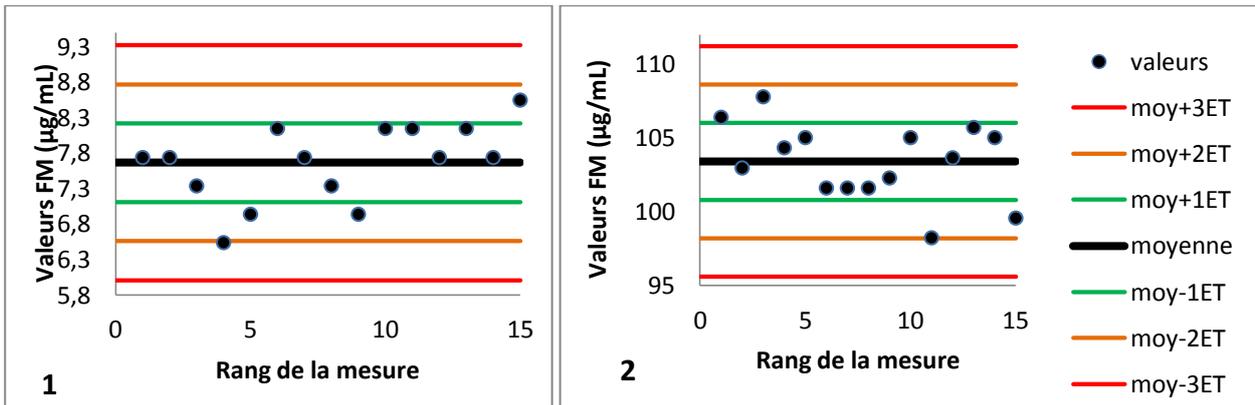


Figure 13 : Répétabilité de l'automate 2719 des niveaux bas (1) et haut (2)

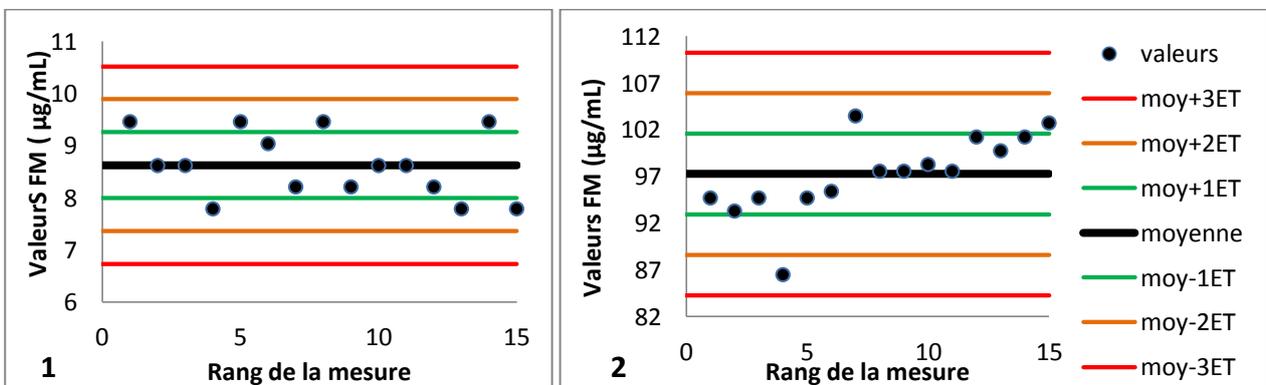


Figure 14 : Répétabilité de l'automate 2671 des niveau bas (1) et haut (2)

Pour l'étude de fidélité intermédiaire, les CV du niveau bas varient entre 4,11 et 6,54% et pour le niveau haut entre 1,94 et 3,15%. Les résultats sont résumés dans le tableau V. Les dispersions des valeurs sont représentées sur les figures 15 à 17.

Tableau V : Etude de fidélité intermédiaire des automates 3503, 2719 et 2671

		Mesures	Moyenne ($\mu\text{g/mL}$)	ET ($\mu\text{g/mL}$)	CV(%)	CV(%) fournisseur	CV(%) tournoys et al.	CV(%) Limite	Conclusion
Niveau bas	3503	30	15,63	0,90	5,78	8 (16,1*)	9,6 (15,7*)	8	conforme
	2719	30	16,35	1,07	6,54				conforme
	2671	30	17,07	0,70	4,11				conforme
Niveau haut	3503	30	101,88	3,21	3,15	2,6 (88,9*)	4 (85,2*)	5	conforme
	2719	30	101,40	1,96	1,94				conforme
	2671	30	94,32	2,66	2,82				conforme

* : valeurs moyennes en $\mu\text{g/mL}$ des taux de FM du plasma testé

Moy : Moyenne ; ET : Ecart-type

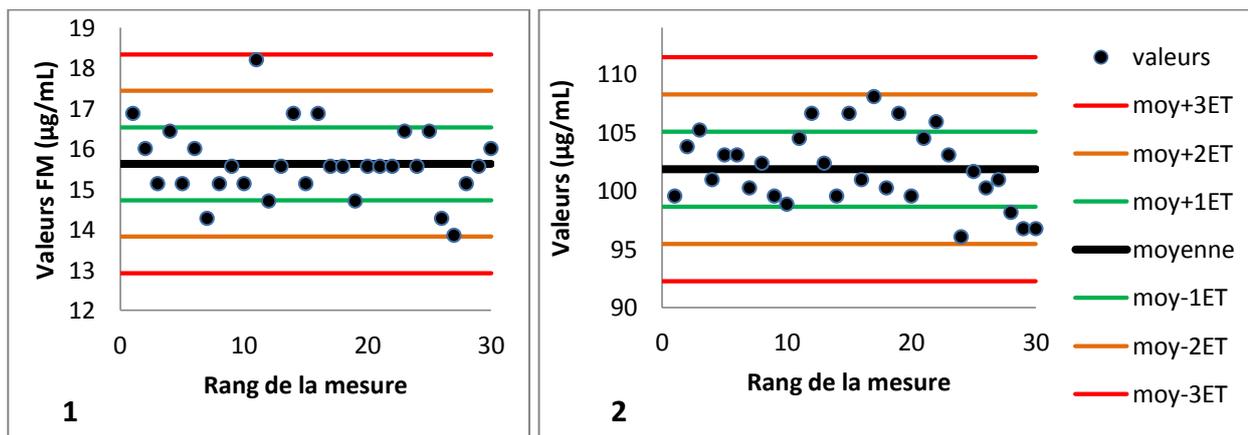


Figure 15 : Fidélité intermédiaire de l'automate 3503 des niveaux bas (1) et haut (2)

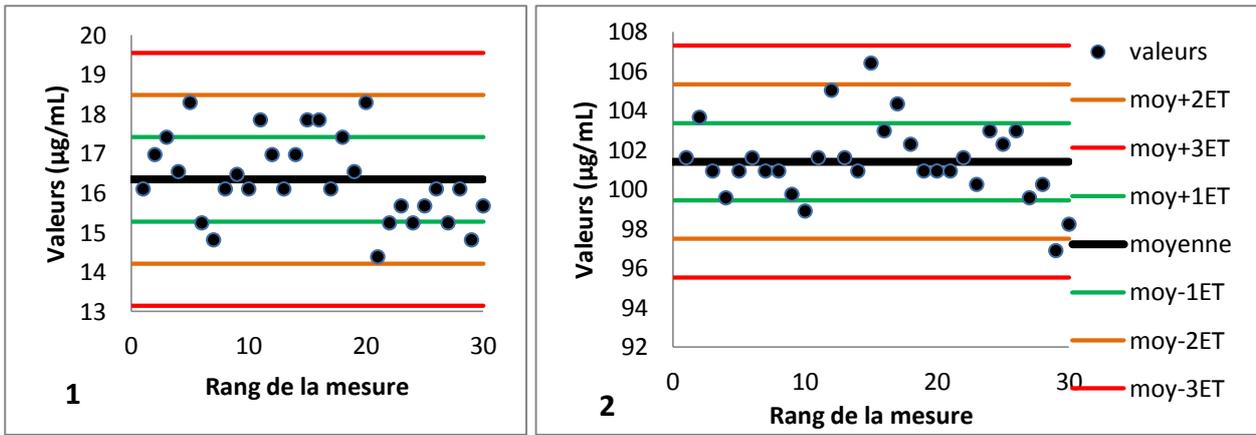


Figure 16 : Fidélité intermédiaire de l'automate 2719 des niveaux bas (1) et haut (2)

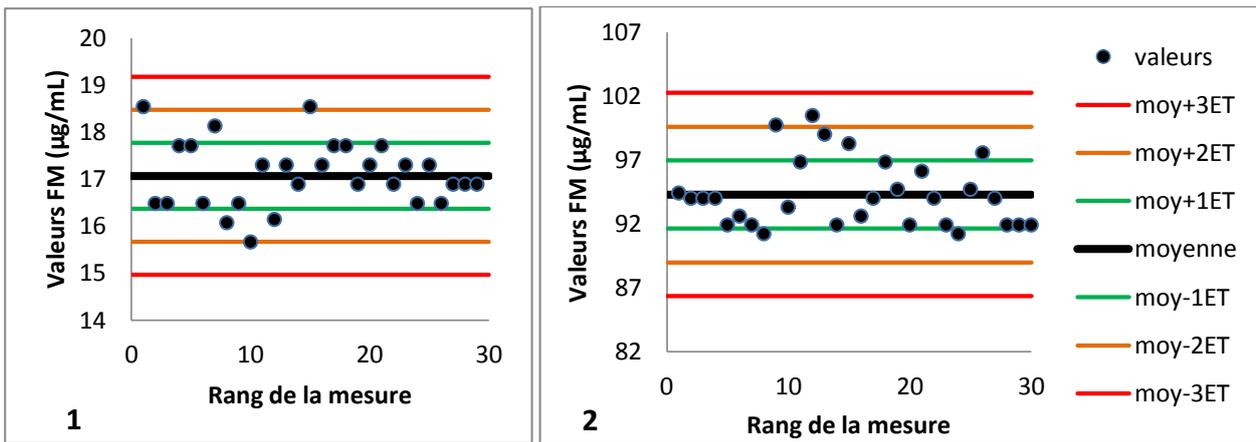


Figure 17 : Fidélité intermédiaire de l'automate 2671 des niveaux bas (1) et haut (2)

2.1.2 Intervalle de mesure

Le seuil de détection annoncé par le fournisseur est 5 µg/mL. Il correspond à la plus petite valeur rendue avec un niveau de confiance acceptable et d'incertitude connue.

La limite de linéarité annoncée par le fournisseur, et retrouvée par Tournoy *et al.* [140], est 150 µg/mL.

Le domaine de mesure s'étend donc de 5 à 150 µg/mL.

2.1.3 Contamination inter-échantillons

Les tests de contaminations varient de -0,39 à 1,67%. Les résultats sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI : Test de contamination des automates 3503, 2719 et 2671

	Test de contamination (%) LAB GTA 04	Test de contamination (%) SH GTA 04	Seuil limite (%)	Conclusion
STA-R 3503	0,38	1,68	3 (+/-)	conforme
STA-R 2719	-0,39		3 (+/-)	conforme
STA-R 2671	0,81		3 (+/-)	conforme

2.1.4 Stabilité des réactifs

Le fournisseur annonce deux types de conservation des réactifs :

- deux jours sur l'automate dans leur flacon d'origine avec STA[®] – mini Reducer et capsule operculée
- quinze jours à 2-8°C dans leur flacon d'origine bouché.

2.1.5 Interférences

Le fournisseur annonce plusieurs paramètres pouvant interférer avec le résultat :

- « le taux de monomères de fibrine des plasmas particulièrement turbides peut-être sous-estimé.

- l'interférence du facteur rhumatoïde dans le dosage n'a pas été mise en évidence, cependant elle n'est pas totalement exclue. Aussi, en cas de taux de monomères de fibrine inexplicé, il peut être utile de pratiquer la recherche du facteur rhumatoïde.
- la présence d'anticorps anti-souris chez certains sujets peut entraîner une surestimation du taux de monomères de fibrine.
- *in vitro*, une surcharge en fibrinogène peut induire une sous-estimation du taux de monomères de fibrine.
- il a été montré que l'hémoglobine, la bilirubine, les héparines non fractionnées, les héparines de bas poids moléculaire n'interféraient pas dans le dosage jusqu'à des concentrations respectives de 5g/L, 200mg/L, 1UI/mL et 2 UI anti-Xa/mL. »

2.1.6 Intervalle de référence

Les résultats sont compris entre 4,26 et 6,22 µg/mL et sont présentés dans le tableau VII. Le fournisseur annonce un seuil de 6 µg/mL.

Tableau VII : Intervalle de référence du test STA[®] Liatest[®] FM

Nombre de patients	Moyenne	Ecart-Type	Moyenne tronquée (Mt)	Ecart-Type tronqué (St)	[Mt-2St]	[Mt+2St]
32	6,40	3,72	5,24	0,49	4,26	6,22

2.1.7 Comparaison des trois automates

Les résultats sont présentés dans les tableaux VIII et XIII et les graphiques 18 à 21.

Tableau VIII : Comparaison de la méthode entre les automates 3503 et 2671

Méthode 1	STA [®] Liatest [®] FM sur automate 3503
Méthode 2	STA [®] Liatest [®] FM sur automate 2671
Nombre de mesures	32
Intervalle de comparaison	5-150 µg/mL
Equation de la droite de régression	$Y=0,96X+1,01$
Diagramme des différences et rapports	Absence de discordance
Conclusion	Conforme

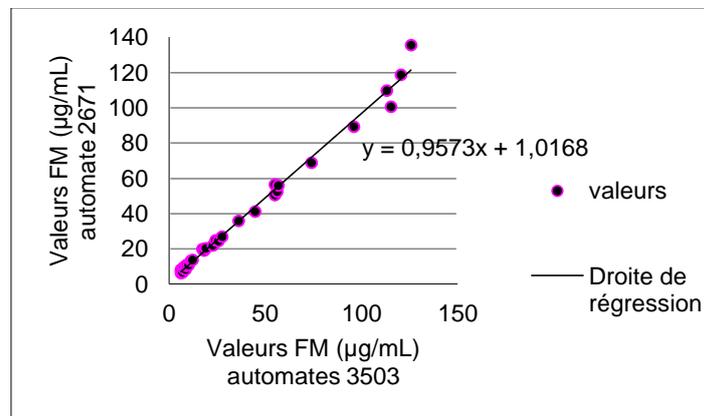


Figure 18 : Comparaison des automates 3503 et 2671

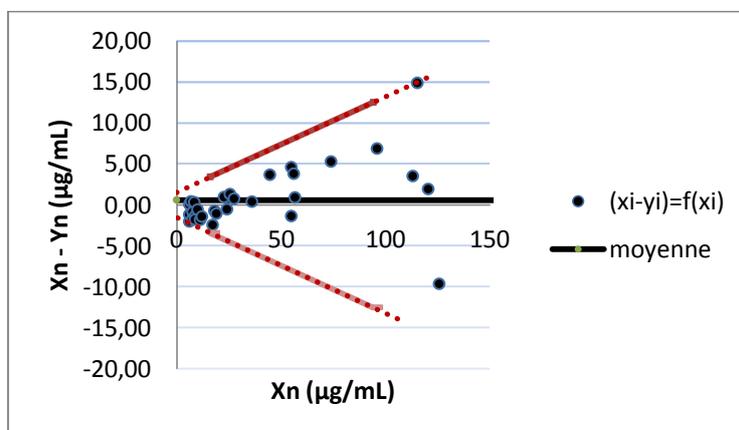


Figure 19 : Diagramme des différences entre les automates 3503 et 2671

Tableau IX : Comparaison entre les automates 3503 et 2719

Méthode 1	STA [®] Liatest [®] FM sur automate 3503
Méthode 2	STA [®] Liatest [®] FM sur automate 2719
Nombre de mesures	32
Intervalle de comparaison	5-150 µg/mL
Equation de la droite de régression	$Y'=0,99X+0,55$
Diagramme des différences et rapports	Absence de discordance
Conclusion	Conforme

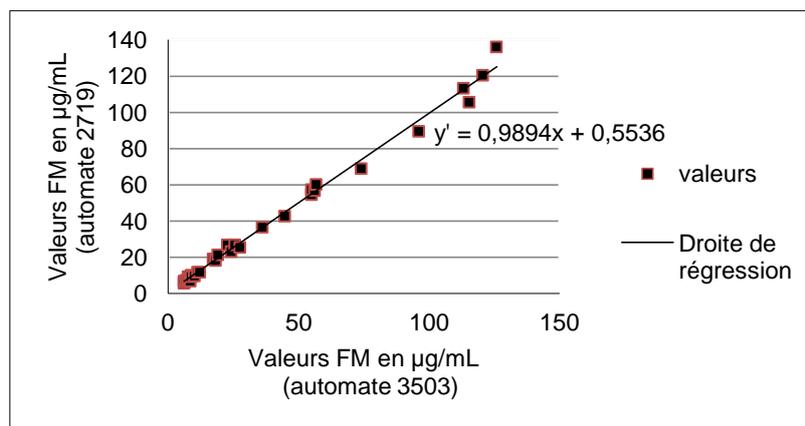


Figure 20 : Comparaison entre les automates 3503 et 2719

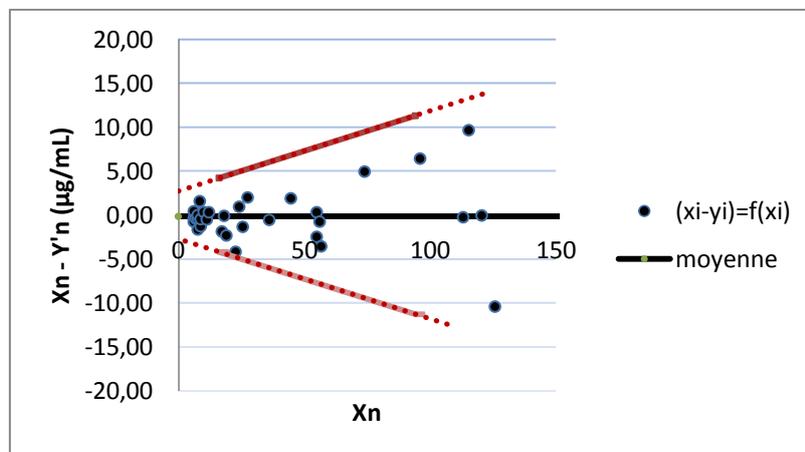


Figure 21 : Diagramme des différences entre les automates 3503 et 2719

2.2 Résultats de l'étude prospective observationnelle

2.2.1 Analyse des données cliniques générales

Quatre-vingt-neuf patients ont été inclus entre décembre 2011 et février 2012. Deux patients ont été exclus suite à leur décès au bloc opératoire. L'ensemble des données cliniques pré, per et postopératoires des patients est regroupé en annexes 6 et 7.

La majorité des patients était des hommes (70%). L'âge moyen des participants était de 70 ans.

Plus du quart des patients (28%) ont reçu une transfusion hors CGR au bloc opératoire.

Le volume médian du saignement pendant la première heure postopératoire était de 60 mL (40-120 mL) et de 660 mL (460-930 mL) pendant les vingt-quatre premières heures. Près de 22% des patients ont reçu des transfusions postopératoires hors CGR. Les drains étaient retirés, en moyenne, après 3,61 jours d'hospitalisation. Trois patients (3,45%) ont dû être réopérés pour saignement. La durée de séjour aux soins intensifs était en moyenne de 5,26 jours. Trois patients (3,45%) sont décédés aux soins intensifs.

2.2.2 Analyse des données biologiques générales

- Cinétique des paramètres biologiques

Les TCA, TQ, taux de DDi et de FM ont augmenté tandis que les taux de plaquettes, d'hémoglobine et d'hématocrite ont diminué pendant l'intervention et dans les premiers instants postopératoires. Les TQ, taux de facteurs, de DDi et de FM tendent ensuite à se normaliser (tableau X).

Tableau X : Evolution moyenne des paramètres biologiques le jour de l'intervention

	Préop	Bloc	0 min	+1-359 min	+360-719 min	+720-1079 min
TCA (s)	33,96	54,87	37,43	43,43	38,10	41,28
TQ (s)	13,75	20,79	17,33	16,26	15,53	15,51
Facteurs II (%)			57	62	65	60
Facteurs X (%)			54	60	62	57
Facteur V (%)			58	64	71	66
Temps de thrombine (s)			19,03			
Fibrinogène (g/L)		1,92	2,14	2,56	2,97	3,41
DDi (µg/mL)			0,63	0,92	0,89	0,67
FM (µg/mL)	5,24	11,22	22,71	21,57	12,08	7,66
Plaquettes (G/L)	249		139	162		
Hémoglobine(g/dL)	14,35		11,53	11,92		
Hématocrite (%)	42,88		33,74	34,86		

Préop : bilan préopératoire ; Bloc : bilan pendant l'intervention

- Analyse des taux de FM

Le pourcentage des valeurs de FM pathologiques pour chaque temps de prélèvement est présenté dans le tableau XI. Parmi les quatre-vingt-quatre patients de l'étude, soixante-treize ont eu au moins un dosage de FM positif sur l'ensemble de leurs bilans. La durée de la CEC était significativement plus longue pour ces patients (114 min contre 78 min, $p=0,008$). En revanche, ils ne présentaient pas de saignement plus important ($p=0,801$) ni davantage de transfusions postopératoires hors CGR ($p=0,727$), ni de délai dans la date d'ablation des drains ($p=0,257$) ou de séjour prolongé aux soins intensifs ($p=0,259$).

Tableau XI : Pourcentage de valeurs de FM positives par bilans

	Préop	Bloc	0 min	1-359 min	360-719 min	720-1079 min	1080-2440 min
FM > 6µg/mL	4,69%	60,98%	82,05%	55,77%	42,62%	37,50%	12,50%

Préop : préopératoire ; Bloc : bilan pendant l'intervention

Les variations des taux de FM sont représentées d'une part, indépendamment pour chaque patient sur la figure 22 et d'autre part, sous forme de statistique descriptive prenant en compte tous les patients sur la figure 23.

Les deux graphiques montrent une hétérogénéité des taux de FM entre les patients, en particulier pendant l'intervention et dans les premiers instants postopératoires. Les taux postopératoires suivants et ceux préopératoires sont généralement faiblement positifs ou négatifs.

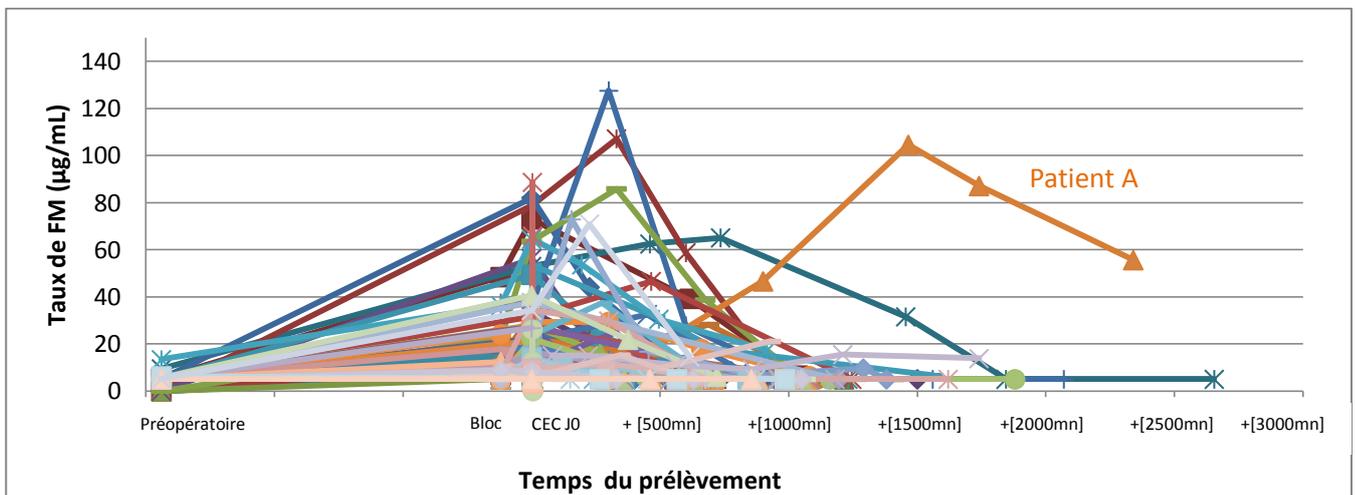


Figure 22 : Variations du taux de FM par patients

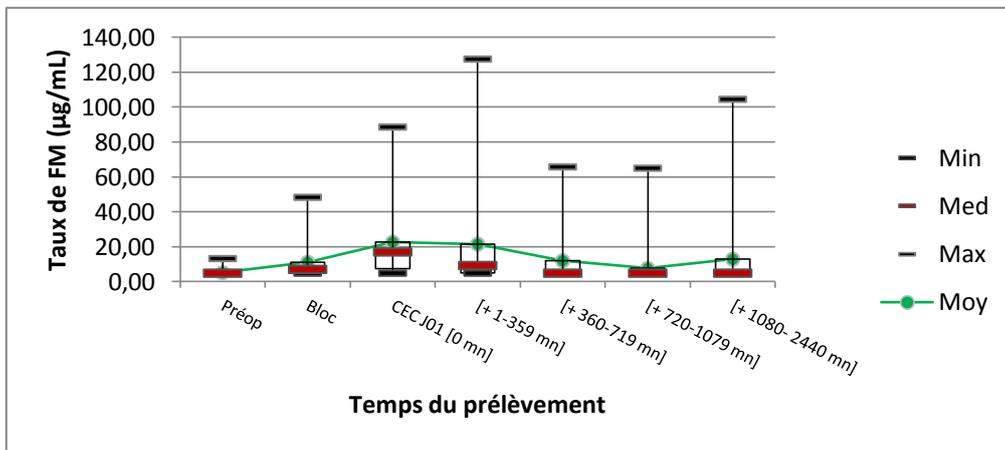


Figure 23 : Variation globale du taux de FM

Un patient, illustré par le tracé orange sur la figure 22 et noté patient A, se démarque par une augmentation importante et décalée dans le temps des taux de FM. L'évolution de ses autres paramètres biologiques est regroupée dans le tableau XII. Les scores de diagnostic de CIVD n'ont pas pu être calculés car les bilans ne comprenaient pas de numération plaquettaire. Les taux de FM ont augmenté parallèlement à une baisse du TP et des taux de facteurs de la coagulation, en particulier du facteur V. L'augmentation du taux de D-dimères a été beaucoup moins nette et s'est déroulée plus tardivement. Le patient présentait un volume de saignement modéré de 69 mL à une heure et de 674 mL à vingt-quatre heures. Il a reçu dix unités de PFC en postopératoire. Il est décédé aux soins intensifs le lendemain de l'intervention.

Tableau XII : Evolution des paramètres biologiques du patient A

	Préop	Bloc	0 min	+195 min	+480 min	+900 min	+1465 min	+1740 min
Plaquettes (G/L)	272		247	257				
TP (%)	108	44	75	80	69	58	29	36
Facteurs II (%)			69	78	65	63	40	52
Facteurs X (%)			80	88	71	69	37	49
Facteur V (%)			74	85	68	47	15	23
DDi (µg/mL)			0.84	0.79	1.68	1.22	1.97	3.38
FM (µg/mL)	5	5	19.3	9.6	18.8	46.6	105	87.1
Fibrinogène (g/L)		2.58	2.73	3.37	3.23	3.61	3.16	2.77

Préop : bilan préopératoire ; Bloc : bilan pendant l'intervention

La figure 24 présente la variation des taux de FM chez les patients ayant nécessité une reprise chirurgicale pour saignement. La médiane du volume du saignement lors de la première heure postopératoire était de 233 mL (157-800 mL).

Une origine chirurgicale a été identifiée pour deux des trois patients réopérés. Le premier patient a présenté une augmentation importante du taux de FM à l'arrivée aux soins intensifs. Le saignement à la première heure postopératoire était de 200 mL.

Le second patient présentait un saignement massif de 1 560 mL. Les taux de FM sont apparus légèrement augmentés mais stables (moyenne : 13,53 µg/mL).

La reprise chirurgicale du troisième patient a mis en évidence un caillot à l'origine du saignement. Les taux de FM étaient augmentés en postopératoire (72,94 µg/mL à [+155 min]) puis ont diminué rapidement et sont devenus négatifs.

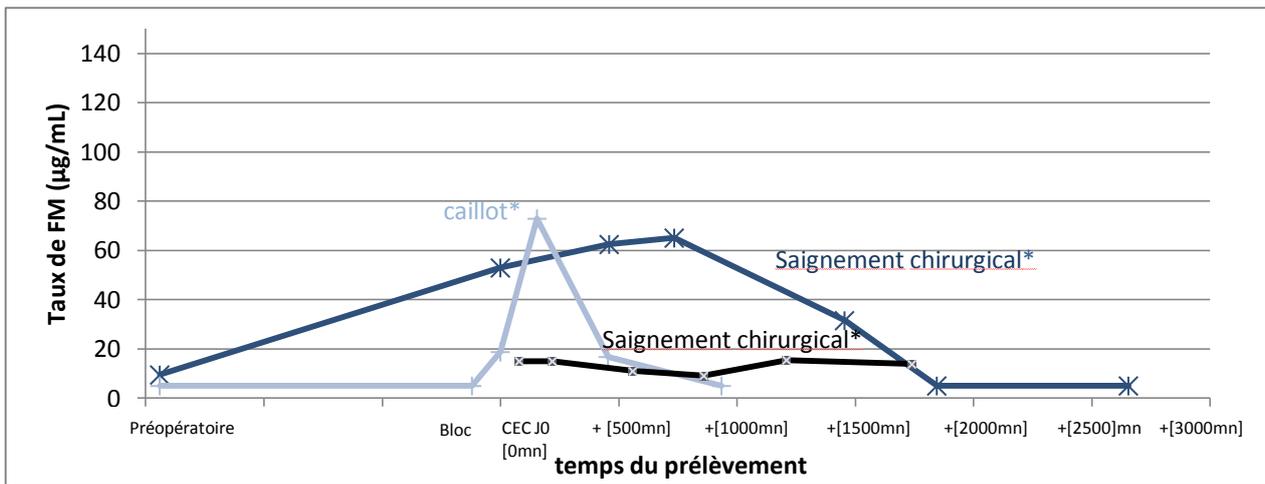


Figure 24 : Variations du taux de FM chez les patients réopérés.

* cause identifiée du saignement

2.2.3 Analyse des résultats en fonction du saignement

- Etude de corrélation

Aucune relation significative n'a été démontrée entre les taux de FM et le saignement des drains thoraciques (tableau XIII).

Tableau XIII : Corrélation des taux de FM avec les pertes sanguines

	Pertes sanguines à 1 heure	Pertes sanguines à 24 heures	n
FM Bilan préopératoire	p=0,113	p=0,128	61
FM Bilan peropératoires	p=0,818	p=0,859	76
FM [0 mn]	p=0,352	p=0,497	41
FM [+ 1-359 mn]	p=0,074	p=0,307	52
FM [+ 360-719 mn]	p=0,587	p=0,607	62

p : test de Spearman ; *n* : effectif du test

- Comparaison des données en fonction du saignement

L'ensemble des résultats de comparaison des données cliniques et biologiques entre les patients avec saignement excessif et ceux avec saignement normal figure en annexes 8 et 9.

Les patients présentant un saignement excessif sont significativement plus âgés (72 contre 66 ans, $p=0,011$). Ils ont reçu plus de transfusions postopératoires hors CGR (45% contre 11%, $p=0,0001$). Il faut noter que les trois décès de l'étude sont survenus dans le groupe des patients avec saignement normal.

Aucune différence significative entre les deux groupes de patients n'a été mise en évidence concernant les paramètres des bilans préopératoires et pendant l'intervention.

Une différence significative entre les deux catégories a été trouvée pour plusieurs paramètres biologiques du premier prélèvement postopératoire. Ainsi, les TCA et TQ étaient plus élevés dans le groupe avec saignement excessif (respectivement $p=0,0001$ et $0,002$). Ces patients présentaient également des taux de fibrinogène ($p=0,037$), de facteur II ($p=0,023$), de facteur X ($p=0,010$), d'hémoglobine ($p=0,006$), d'hématocrite ($p=0,003$) et de plaquettes ($p=0,0001$) significativement plus bas.

Les taux de DDi étaient équivalents entre les deux catégories de patients. Les valeurs étaient très faiblement augmentées (moyennes de 0,62 et 0,65 $\mu\text{g/mL}$, $p=0,236$).

Le test à l'éthanol était retrouvé positif pour un seul patient. Ce dernier n'a présenté ni saignement excessif (pertes sanguines à une heure de 50 mL), ni de besoins transfusionnels ni de survenue de complications. Le taux de FM de ce patient sur ce bilan était de 7,03 $\mu\text{g/mL}$.

Le tableau XIV présente les résultats des comparaisons des taux de FM. Les valeurs du paramètre sont en moyenne plus élevées pour les patients présentant un saignement excessif. Cependant, aucune différence significative entre les taux de FM n'a été trouvée.

Tableau XIV : Comparaison des taux de FM entre les patients avec saignement normal et saignement excessif

	Saignement normal		Saignement excessif		<i>p</i>
	Moy (ET)	n	Moy (ET)	n	
FM Bilan préopératoire	5,04 (0,19)	42	5,62 (1,97)	22	0,151
FM Bilan peropératoire	10,57 (7,95)	28	13,09 (13,61)	13	0,711
FM [0 min]	19,49 (16,65)	52	29,57 (24,24)	26	0,258
FM [+ 1-359 mn]	15,94 (24,64)	35	28,40 (30,70)	17	0,074
FM [+ 360-719 mn]	10,98 (10,13)	41	17,13 (18,48)	20	0,200

p : test de Mann-Whitney ; *n* : effectif de l'étude ; Moy : Moyenne ; ET : Ecart-type

Les analyses de corrélation et de comparaison des taux de FM ont été effectuées une nouvelle fois après exclusion des patients ayant reçu des transfusions hors CGR pendant l'intervention. Les résultats sont présentés dans les tableaux XV et XVI. Aucune corrélation avec les pertes sanguines et aucune différence significative entre le groupe de patient avec saignement normal et celui avec saignement excessif ne sont retrouvées.

Tableau XV : Corrélation entre les taux de FM et les pertes sanguines (patients sans transfusions peropératoires)

p : test de Spearman ; *n* : effectif de l'étude

	Pertes sanguines à 1 heure	Pertes sanguines à 24 heures	<i>n</i>
	<i>p</i>	<i>p</i>	
FM Bilan préopératoire	<i>p</i> =0,090	<i>p</i> =0,152	49
FM Bilan peropératoire	<i>p</i> =0,438	<i>p</i> =0,807	29
FM [0 min]	<i>p</i> =0,780	<i>p</i> =0,771	60
FM [+ 1-359 mn]	<i>p</i> =0,126	<i>p</i> =0,409	40
FM [+ 360-719 mn]	<i>p</i> =0,785	<i>p</i> =0,823	47

Tableau XVI : Comparaison des taux de FM entre les patients avec saignement normal et saignement excessif (patients sans transfusions peropératoires)

	Saignement normal		Saignement excessif		P
	Moy (ET)	n	Moy (ET)	n	
FM Bilan préopératoire	5,04 (0,21)	33	5,85 (2,37)	15	0,353
FM Bilan peropératoire	11,63 (9,08)	20	11,05 (10,15)	9	1
FM [0 min]	17,32 (13,79)	40	28,35 (27,86)	11	0,297
FM [+ 1-359 mn]	16,39 (27,06)	28	29,66 (31,65)	13	0,067
FM [+ 360-719 mn]	9,90 (10,65)	33	17,66 (20,19)	14	0,228

n : effectif de l'étude ; Moy : Moyenne ; ET : Ecart-type

3. DISCUSSIONS

3.1 Discussion de l'étude de vérification de la méthode

3.1.1 Etude de fidélité

Le résultat d'un dosage en biologie médicale est constamment soumis à des fluctuations aléatoires spontanées dont les causes sont multiples et non dénombrables. On parle d'erreur aléatoire. L'étude de fidélité permet de quantifier ces erreurs en étudiant la dispersion des valeurs après répétition de plusieurs mesures d'un même échantillon dans deux conditions particulières :

- les conditions de répétabilité : analyse dans des conditions identiques (avec le même lot de réactifs, sur le même automate, avec le même étalonnage, dans un délai le plus court possible)
- les conditions de fidélité intermédiaire : analyse dans des conditions différentes (variation d'au moins un des paramètres suivants : opérateur, temps, lot de réactif, automates...).

La première analyse des résultats consiste à étudier les dispersions des valeurs représentées sur les graphiques 12 à 17 en suivant les règles de Westgard *et al* [141]. Ces règles (figure 25), utilisées pour analyser et valider des séries de contrôle, permettent de détecter des mesures inexactes. Les valeurs hors-limites, en fonction de leur répétition ou addition, entraînent un rejet de la série.

On note une série de dix valeurs du même côté de la moyenne pour l'étude du niveau bas de fidélité intermédiaire de l'automate 2719. Un suivi journalier des CIQ lors de la mise en route de la technique permettra de vérifier que l'anomalie ne se reproduit pas. Nous ne notons pas d'anomalies de dispersion des autres tests. Les séries sont acceptées.

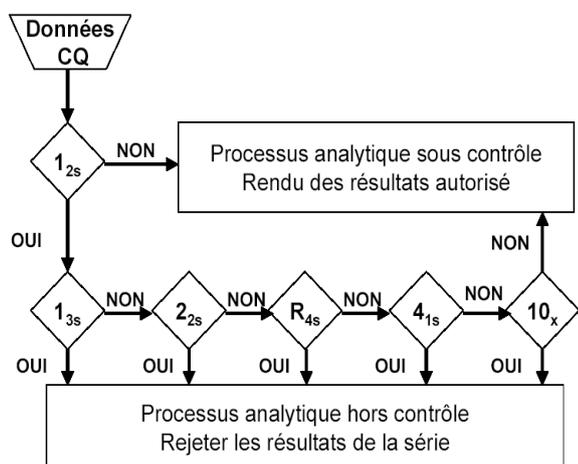


Figure 25 : Exemple de règles de Westgard [141]

- 1_{2s} : 1 valeur éloignée de plus de 2 écart-types de la moyenne,
- 1_{3s} : 1 valeur éloignée de plus de 3 écart-types de la moyenne,
- 2_{2s} : 2 valeurs consécutives éloignées de plus de 2 écart-types du même côté de la moyenne,
- R_{4s} : 2 valeurs consécutives éloignées l'une de l'autre de plus de 4 écart-types,
- 4_{1s} : 4 valeurs consécutives éloignées de plus de un écart types du même côté de la moyenne,
- 10_x : 10 valeurs consécutives situées du même côté de la moyenne.

Nous analysons ensuite les résultats des CV. Nous remarquons que ceux des niveaux bas, retrouvés à la fois dans la bibliographie et dans notre étude, sont plus élevés que ceux des niveaux hauts (6,4% en moyenne contre 3,1% en moyenne). Ceci s'explique par la méthode de calcul du CV ; plus la valeur moyenne est basse, plus les CV sont élevés. Nous notons cependant que les écart-types, représentant la dispersion des valeurs par rapport à la moyenne, sont plus faibles pour les niveaux bas (0,75 $\mu\text{g/mL}$ contre 3,17 $\mu\text{g/mL}$). Nous remarquons également que la valeur moyenne de notre niveau bas de répétabilité est inférieure à celle de la bibliographie (8,27 $\mu\text{g/mL}$ contre 17,3 $\mu\text{g/mL}$) alors que les CV sont sensiblement identiques, ce qui est en faveur de la bonne fidélité de nos résultats.

Les CV calculés pour l'ensemble des tests sont conformes aux limites que nous avons fixées préalablement.

La méthode est fidèle dans les conditions du laboratoire.

3.1.2 Contamination inter-échantillons

Bien que l'étude de contamination soit facultative en portée A, nous avons tout de même souhaité évaluer ce critère. En l'absence de données bibliographiques, les limites que nous avons fixées sont arbitraires. Elles sont utilisées pour l'ensemble des paramètres d'hémostase réalisés sur les automates STA-R[®] Evolution.

Les valeurs des tests de notre étude sont inférieures aux limites fixées. Nous concluons à l'absence de contamination inter-échantillons.

3.1.3 Stabilité des réactifs

Nous suivons les recommandations de stabilité du fabricant sur quarante-huit heures. En effet, compte tenu du nombre de tests estimé à réaliser par jour, les réactifs n'excéderont pas ce délai.

3.1.4 Intervalle de référence

Nous retrouvons les données annoncées par le fournisseur avec des valeurs proches de 6 µg/mL chez les patients sains.

Cependant, il est nécessaire de continuer les analyses pour atteindre au moins cent valeurs afin de gagner en puissance statistique.

De plus, l'étude du seuil du paramètre dans certaines situations pathologiques est à approfondir. En effet, dans le cadre d'un diagnostic de CIVD, l'utilisation du score de l'ISTH nécessite de définir des seuils d'augmentation modérée et élevée du taux de FM. Certaines études ne retrouvent pas les mêmes valeurs. Ainsi, Tournoys *et al.* [140] ont défini les seuils de 6 et 50 µg/mL alors que Lavigne *et al.* [1] ont conclu aux seuils de 5 et 10 µg/mL dans un contexte de sepsis.

3.1.5 Spécificités

Les données annoncées par le fournisseur seront prise en compte lors de la validation des résultats. Nous nous attacherons, en particulier, à vérifier la présence ou non d'un surdosage en héparine (par la mesure du TCA ou de l'activité anti-Xa), d'une hémolyse ou d'un plasma lactescent.

3.1.6 Comparaison des trois automates

En l'absence de données bibliographiques, les limites acceptables pour la droite de régression ont été établies à partir des données concernant la méthode STA[®] Liatest[®] DDI, basée sur le même

principe technique, disponibles dans le document d'aide à l'accréditation publié par la société STAGO[®] en collaboration avec le Cofrac.

Les équations des droites de régression sont conformes et il n'a pas été observé de discordance entre les trois automates. Les trois appareils sont corrélés. Ainsi, en cas de panne de l'automate 3503, les analyses peuvent être effectuées sur les deux autres automates du laboratoire sans modification dans l'interprétation des résultats.

L'ancienne technique de détection des FM, le test à l'éthanol, est qualitative et manque fortement de sensibilité. Une comparaison avec les taux de FM quantitatifs ne nous semble pas justifiée.

3.2 Discussion de l'étude prospective observationnelle

3.2.1 Cinétique des taux de FM

L'augmentation des taux de FM chez la majorité des patients peut être expliquée par l'intervention en elle-même. Les taux maximums sont d'ailleurs observés lors du premier prélèvement postopératoire. Nous avons montré que la durée de la CEC était plus courte chez les patients ayant des taux de FM toujours négatifs. De plus, il est admis que l'utilisation du circuit de CEC ainsi que l'acte chirurgical active le processus d'hémostase [67–69].

La positivité du dosage des FM ne semble pas être forcément associée à des conséquences cliniques puisque la plupart des patients de l'étude n'ont pas présenté de complications postopératoires. Le seuil actuellement retenu de positivité pourrait donc ne pas être adapté au cours d'une chirurgie cardiaque avec CEC.

3.2.2 Monomères de fibrine et saignement postopératoire

Nous avons voulu définir le champ d'utilisation possible du test dans la prévision ou le diagnostic des complications hémorragiques après CEC.

Tout d'abord, les valeurs des FM sont, en moyenne, plus élevées pour les patients avec un saignement excessif mais aucune différence significative n'a été démontrée avec les taux des patients présentant un saignement normal.

De plus, les taux de FM aux différents temps de prélèvements ne sont pas corrélés avec les pertes sanguines postopératoires.

Le faible nombre de patients réopérés ne permet pas de mettre en évidence un intérêt du paramètre pour distinguer, parmi les causes de saignement, une origine chirurgicale d'une coagulopathie. Les taux de FM des deux patients présentant un saignement d'origine chirurgicale sont supérieurs à la normale. Cependant, l'un d'eux a des valeurs fortement augmentées tandis que l'autre a des taux faiblement augmentés et stables. Une étude sur davantage de patients serait nécessaire.

Nous avons considéré que les transfusions hors CGR pendant l'intervention pouvaient influencer sur le résultat des dosages biologiques postopératoires. Nous avons alors analysé une seconde fois nos résultats en ne prenant en compte que les sujets n'ayant pas reçu de transfusions. Nous ne retrouvons toujours pas de relation entre le taux de FM et les complications hémorragiques.

Nos travaux ne retrouvent donc pas d'intérêt à intégrer le dosage systématique des FM dans la prévision et/ou le diagnostic des complications hémorragiques après CEC.

Le choix d'évaluer les performances du dosage des FM dans ce contexte s'est justifié par deux points. En premier lieu, nous avons vu que la CEC s'accompagne d'une activation de la coagulation et de la fibrinolyse. Ces conditions peuvent entraîner, en cas de facteurs favorisants, un état de CIVD potentialisant le risque hémorragique. Le paramètre représente un outil biologique supplémentaire de diagnostic des troubles de l'hémostase. Les travaux de Karkouti *et al.* [89] ont trouvé une corrélation entre les taux de FM postopératoire et les pertes sanguines après CEC, suggérant une utilité à intégrer l'analyse dans le suivi de l'hémostase.

Egalement, une relation entre les FM, le facteur XIII et le saignement postopératoire est établie dans la littérature. Ces conclusions se basent sur des études démontrant l'intérêt d'une supplémentation en facteur XIII en cas de saignement postopératoire [133,135] et sur une relation entre l'augmentation des taux de FM préopératoire et le saignement postopératoire (étude de Korte *et al.* [88]). L'hypothèse est que le déficit congénital et/ou acquis en facteur XIII perturbe la stabilisation du caillot de fibrine et entraîne alors une accumulation de monomères de fibrine non stabilisés. Le dosage du taux de FM pourrait alors aider à prédire un risque hémorragique.

La divergence de nos résultats avec les études citées peut s'expliquer par plusieurs limites liées à notre méthodologie. La limite principale de notre travail repose sur les données concernant le saignement postopératoire. Tout d'abord, le recueil ne concerne que le volume du saignement des drains thoraciques sans tenir compte des compensations transfusionnelles ni de la présence d'autres signes cliniques hémorragiques. De plus, nous avons vu qu'il existe une disparité de définition du seuil de saignement pathologique. Le choix pour l'étude s'est fait après concertation avec le service d'anesthésie-réanimation. Le biais concernant la définition et le calcul du saignement est commun à l'ensemble des études traitant du risque hémorragique au cours d'une CEC.

Il faut ajouter aux limites de l'interprétation, les particularités de prise en charge de chaque centre (épidémiologie des patients, matériel de CEC, prise en charge transfusionnelle). Les conclusions sont donc dépendantes des conditions locales spécifiques.

L'effectif modéré, le choix des patients, les données incomplètes pour certains bilans (en particulier le prélèvement pendant l'intervention), la variation des temps de prélèvements postopératoires sont également à considérer dans la pondération de nos conclusions.

3.2.3 Evaluation des autres paramètres biologiques

L'étude a permis d'évaluer également les autres paramètres biologiques systématiquement réalisés.

Nos résultats ne montrent pas d'intérêt des paramètres du bilan préopératoire dans la prédiction d'un saignement postopératoire excessif, ce qui confirme certaines études [117]. Ce bilan reste intéressant, comme avant toute chirurgie, pour détecter un trouble congénital ou acquis de l'hémostase qui peut alors être corrigé avant l'intervention.

Le bilan pendant l'intervention n'est habituellement pas effectué et a été ajouté uniquement pour évaluer l'apport des FM. Les résultats ne montrent pas d'utilité à réaliser systématiquement les autres paramètres testés.

Nous avons constaté que le TCA, le TP, le dosage des facteurs de la coagulation, le taux de plaquettes, le taux d'hémoglobine et le taux d'hématocrite du premier bilan postopératoire sont significativement différents entre les patients avec saignement excessif et ceux avec saignement normal. D'autres travaux avaient observé les mêmes résultats [142,143]. Cela confirme l'utilité de maintenir ces analyses systématiquement dans les bilans « CEC J0 », d'autant qu'elles représentent les critères biologiques de décision transfusionnelle définis par l'AFSSAPS [118–120] (aujourd'hui

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) et retrouvés dans les publications internationales [121].

En revanche, nous n'observons pas d'intérêt à maintenir le test à l'éthanol et le dosage des DDi dans les bilans postopératoires du jour de l'intervention. En effet, les taux de DDi sont faibles et équivalents entre les deux groupes de patients. Ces résultats confirment la publication de Comunale *et al.* [144] De plus, peu de recommandations existent sur l'intérêt des DDi dans le suivi postopératoire après chirurgie cardiaque. L'utilisation peropératoire préventive d'antifibrinolytique permet d'expliquer en grande partie les faibles taux rencontrés.

Le test à l'éthanol a été retrouvé négatif à l'exception d'un bilan. Le résultat a été considéré comme faux positif.

Le dosage des DDi et le test à l'éthanol sont indiqués dans le diagnostic de CIVD. Leur positivité n'est pas spécifique et les résultats s'interprètent donc en fonction d'autres paramètres biologiques (taux de plaquettes, TP, dosage des facteurs de la coagulation). Or, les analyses du bilan « CEC J0 » apparaissent perturbées pour tous les patients dans les premiers instants postopératoires sans conséquences cliniques et rendent donc l'interprétation d'une recherche de CIVD délicate.

Le manque de pertinence des deux tests mis en évidence par notre étude, associé à l'impossibilité d'interpréter convenablement un bilan de CIVD sur les prélèvements « CEC J0 », nous incitent à proposer d'exclure le dosage systématique des DDi et le test à l'éthanol des bilans postopératoires le jour de l'intervention.

En revanche, les dosages des DDi et des FM présentent un intérêt dans la recherche de CIVD sur les prélèvements postopératoires les jours suivants l'intervention. Cette situation est bien illustrée par le cas du patient A. Le dosage des FM apporte une précocité de diagnostic, pouvant améliorer la prise en charge du patient par une thérapeutique adaptée.

CONCLUSION

Les performances de la méthode de dosage des monomères de fibrine par la technique STA[®] Liatest[®] FM sont vérifiées et conformes aux exigences de la norme NF EN ISO 15189[®]. La technique peut donc être utilisée en routine dans notre laboratoire.

Le recueil de données des contrôles internes de qualité d'autres laboratoires utilisant le kit ou la création d'un programme d'évaluation externe de la qualité pourra permettre de finaliser la vérification de méthode par l'étude de la justesse et de l'incertitude de mesure. Ces critères de performance apporteront des informations pertinentes pour l'utilisation du paramètre. La justesse permet d'estimer les erreurs systématiques pouvant avoir lieu lors du processus analytique et entraînant un écart avec le résultat « vrai ». Il est également important pour le biologiste et le clinicien de connaître l'incertitude du résultat pour pouvoir interpréter correctement la valeur rendue, par rapport à un résultat antérieur ou à un seuil de décision.

En complément de la vérification initiale qui vient d'être faite, une vérification continue des performances est indispensable. Elle consiste principalement par un test de fidélité intermédiaire en suivant les résultats des contrôles internes de qualité journaliers. De plus, des tests ponctuels, comme un test de répétabilité, pourront être réalisés après une maintenance ou lors de résultats suspects.

L'étude prospective observationnelle que nous avons menée ne permet pas de conclure à l'intérêt d'intégrer le dosage des monomères de fibrine dans le suivi des complications hémorragiques au cours d'une chirurgie cardiaque.

La plupart des patients présentent un taux de monomères de fibrine positif dans l'un de leurs bilans. Ces résultats ne sont pas associés à la survenue de davantage de complications postopératoires.

Les taux de monomères de fibrine, dans notre étude, n'apparaissent pas prédictifs d'un risque hémorragique, ni ne semblent apporter d'informations complémentaires pour la prise en charge postopératoire des troubles de l'hémostase des patients.

Il serait souhaitable de réaliser de nouvelles études sur un effectif plus conséquent, en particulier pour augmenter la présence de patient nécessitant une reprise chirurgicale pour saignement. Il serait intéressant de déterminer si le test permet de définir des critères dans le choix de la décision de transfuser ou de réopérer.

Les dosages des D-Dimères ainsi que le test à l'éthanol ne seront plus utilisés systématiquement dans les bilans du jour de l'intervention après circulation extracorporelle. L'ensemble des autres analyses des différents bilans est conservé.

Les dosages des D-dimères et des monomère de fibrine restent utiles en cas de suspicion de coagulation intravasculaire disséminée dans les bilans à partir du jour suivant l'intervention.

ANNEXES

Annexe 1 : Score de CIVD du Ministère de la Santé japonais (1) et de la conférence de consensus de la Société de Réanimation de Langue Française (2)

1. Score de CIVD du Ministère de la Santé japonais				
SCORE (points)	0	1	2	3
Cause de CIVD	Absente	Présente		
Signes cliniques				
Hémorragies	Absents	Présents		
Défaillance d'organe	Absente	Présente		
TP (rapport M/T)	< 1,25	1,25-1,66	> 1,67	
Fibrinogène (g/L)	> 1,50	1,00-1,50	< 1,00	
PDF (µg/mL)	< 10	10-20	20-40	
Plaquettes (G/L)	> 120	80-120	50-80	< 50
Score				
Score total ≥ 7 : CIVD				
Score total ≥ 4 : CIVD si leucémie ou chimiothérapie				
2. Critères diagnostiques biologiques proposés par la conférence de consensus française SRLF				
Le diagnostic de CIVD biologique doit être retenu si les D-dimères sont augmentés (> 500 µg/L) et s'il existe un critère majeur ou deux critères mineurs de consommation.				
Critères de consommation chez l'adulte				
Paramètre (unité)	Majeur		Mineur	
Numération plaquettaire (G/L)	≤ 50		50 < - = 100	
Taux de prothrombine (%)	< 50		50 ≤ - < 65	
Concentration en fibrinogène (g/L)			≤ 1	

Annexe 2 : Scores de CIVD de l'ISTH

1. CIVD décompensée					
Étape 1 : Évaluation du risque : Existe-t-il une maladie connue pour être associée à une CIVD décompensée ? Si oui : passer à l'étape 2 ; sinon : ne pas utiliser l'algorithme					
Étape 2 : Réalisation des tests de coagulation (décompte des plaquettes, TP, fibrinogène, monomères de fibrine soluble (CSMF) ou PDF ou D-dimères)					
Étape 3 : Résultats des tests de coagulation et score					
Test et Score	0	1	2		
Plaquettes	> 100 G/L	< 100 G/L	< 50 G/L		
Augmentation CSMF - PDF - D-dimères	Absente	Modérée	Forte		
Temps de Quick (par rapport au témoin)	< 3	> 3 et < 6	> 6		
Taux du fibrinogène	> 1 g/L	< 1 g/L			
Étape 4 : Calcul du score					
<ul style="list-style-type: none"> • Score ≥ 5 : compatible avec une CIVD décompensée. • Score < 5 : compatible avec une CIVD latente (débutante), répéter les examens. 					
2. Diagnostic de CIVD débutante : score évolutif					
Étape 1 : Évaluation initiale : existe-t-il une maladie connue pour être associée à une CIVD ? OUI = 2 NON = 0					
Test - Score	0	1	- 1	0	+ 1
Plaquettes (G/L) :					
• Taux initial	> 100	< 100			
• Evolution			Augmente	Stable	Diminue
TP (%) en correspondance du TQ	> 64	< 64	Augmente	Stable	Diminue
D-dimères ou PDF ou fibrine soluble	Normal	Augmenté	Diminue	Stable	Augmente
Critères spécifiques					
Antithrombine	Normale	Basse			
Protéine C	Normale	Basse			
Complexes TAT	Normaux	Augmentés			
Score total					
Étape 2 : Calculer le score total chaque jour (le diagnostic de CIVD est retenu lorsque le score atteint 5)					

Annexe 3 : Vérification de méthode du test STA[®] Liatest[®] FM (poster présenté au congrès du GEHT d'octobre 2011)

GEHT OCTOBRE 2011



LE DOSAGE DES MONOMERES DE FIBRINE PAR LA TECHNIQUE STA-LIATEST[®] FM



VERIFICATION DE METHODE SELON LA NORME NF EN ISO 15189

M. Belabed¹, D. Bienvenu¹, ML. Destain¹, S. Dupuy², J. Feuillard¹, M. Donnard¹
Laboratoire d'hématologie¹, Bureau qualité² - Pôle de Biologie-hygiène - CHU Dupuytren, Limoges.

Introduction

Les monomères de fibrine (FM) sont issus du clivage du fibrinogène par la thrombine. Ils circulent libres ou associés au fibrinogène et/ou aux produits de dégradation du fibrinogène/fibrine sous forme de complexes solubles. Le kit STA-Liatest[®] FM permettant le dosage des FM, a été validé dans le diagnostic de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)^{1,2}. Avant de l'utiliser en pratique courante, nous avons vérifié ce nouveau réactif selon la norme NF EN ISO 15189.

Matériel et Méthodes

Le STA-Liatest[®] FM (Stago) permet le dosage quantitatif des FM par méthode immuno-turbidimétrique sur les automates de la gamme STA[®] (données fournisseur : valeur usuelle < 6 µg/ml - zone de linéarité : 5 µg/ml - 150 µg/ml). Ce réactif bénéficiant d'un marquage CE, nous avons suivi les recommandations du guide SH GTA 04 édité par le COFRAC pour la vérification des méthodes selon la portée de type A. La vérification sur site a été réalisée sur les trois STA-R[®] (automate 1 de référence et automates 2 et 3) du laboratoire et comprend la définition des limites d'acceptabilité, une étude de fidélité, une contamination inter-échantillon et une comparaison des trois automates.

Résultats-Discussion

Limites d'acceptabilité :

Elles ont été définies en fonction de l'état de l'art^{1,2} et de la pertinence clinique concernant le diagnostic biologique de la CIVD qui se base notamment sur l'utilisation du score de l'ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis).

Etude de fidélité (répétabilité et reproductibilité) :

Les résultats de l'étude (tableau 1) montrent des valeurs de CV (coefficient de variation) comparables aux données de la fiche du fabricant.

	Répétabilité				Reproductibilité			
	valeur basse	fabricant	valeur haute	fabricant	valeur basse	fabricant	valeur haute	fabricant
n	20	21	20	21	30	10	30	10
moyenne (µg/mL)	8,27	17,3	101,88	100,10	16,35	16,10	88,20	88,90
Ecart-type (µg/mL)	0,60	1,4	3,73	3,10	0,88	1,30	2,61	2,30
CV (%)	7,25	8,00	3,67	3,10	5,48	8,00	2,64	2,60

Tableau 1 : Etude de fidélité (moyenne des trois automates)

Pour les valeurs hautes : bien que nos CV soient légèrement supérieurs aux données de la fiche du fabricant, les variations sont acceptables. Elles n'entraînent pas de modification dans l'interprétation du résultat.

Pour les valeurs basses : les CV sont conformes. Les variations sont plus importantes dans ce niveau de valeur mais les écarts-types sont faibles. Quand la valeur de l'analyte est basse, l'écart-type est plus pertinent que le CV.

Les critères de fidélité sont acceptables ; en sachant que l'interprétation d'un bilan de CIVD nécessite de tenir compte des autres paramètres biologiques, de leur évolution et du contexte clinique sous-jacent.

Etude de contamination :

La contamination inter-échantillon pour les trois automates est acceptable. (tableau 2).

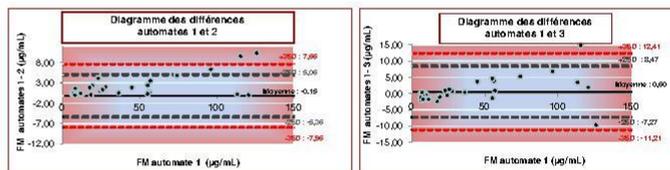
Test de contamination - seuil < +/- 3%		
automate 1	automate 2	automate 3
1,88%	-0,39%	0,81%

Tableau 2 : Etude de la contamination

Comparaison entre les trois automates :

L'étude présentée sur les figures 1 et 2 montre une bonne corrélation entre l'automate 1 et les automates 2 et 3.

Les différences sont plus importantes sur les valeurs hautes mais n'auront pas d'incidence sur l'interprétation des résultats.



Figures 1 et 2 : Comparaisons entre les trois automates du laboratoire

Justesse et estimation de l'incertitude de mesure :

Ces deux paramètres ne peuvent pas être réalisés en l'absence d'externalisation des CIQ et en l'absence de contrôle de qualité externe (EEQ). La mise en place d'un échange d'échantillon avec d'autres laboratoires utilisateurs du STA-Liatest[®] FM pourrait permettre de compléter la vérification du kit.

1- Poster GEHT 2009 - G. Lavigne-Lissade & Al. Etude prospective validant l'exactitude du dosage des monomères de fibrine circulants comme marqueur d'activation et de fibrinolyse dans le choc septique.
2- Poster CNBH 2010 - A. Toussaint & Al. Dosage des FM en pratique quotidienne.

Conclusion

Le STA-Liatest[®] FM a été vérifié selon les recommandations du SH GTA 04 en portée A et accepté dans le cadre de l'utilisation au laboratoire. Une phase de vérification continue va être mise en place. De plus, une évaluation externe de la qualité, permettant le calcul de l'incertitude de mesure, est à développer soit par un programme approprié, soit par un échange volontaire inter-laboratoire.

Annexe 4 : Document d'information aux patients (étude observationnelle)

DOCUMENT D'INFORMATION

Etude de l'intérêt du dosage des monomères de fibrine dans l'évaluation des complications hémorragiques après circulation extracorporelle

PROTOCOLE FM

Version n°0.I

Personne qui dirige et surveille la recherche : Docteur DONNARD Magali

Madame, Monsieur,

Votre médecin vous propose de participer à une recherche observationnelle. Avant de prendre une décision, il est important que vous lisiez attentivement ces pages qui vous apporteront les informations nécessaires concernant les différents aspects de cette recherche. N'hésitez pas à poser toutes les questions que vous jugerez utiles à votre médecin.

Votre participation à cette recherche est entièrement volontaire et vous avez le droit de vous opposer à y participer, sans avoir à vous justifier. Dans ce cas-là, vous continuerez à bénéficier de la meilleure prise en charge médicale possible, conformément aux connaissances actuelles et votre relation avec votre médecin ne sera pas affectée.

Pourquoi cette recherche?

Une intervention cardiaque avec circulation extracorporelle vous est nécessaire. Pendant l'opération, la procédure chirurgicale et la circulation extracorporelle induisent une perturbation des paramètres de la coagulation pouvant entraîner des saignements importants après l'opération. Un suivi biologique est donc réalisé sur les paramètres d'hémostase avant, pendant et après l'intervention pour diagnostiquer des troubles de la coagulation et ainsi prévenir ou corriger d'éventuels saignements.

Le dosage des monomères de fibrine par la technique STA Liatest® FM est d'apparition récente. C'est un marqueur de dégradation du fibrinogène, témoin d'une activation de la coagulation et de la fibrinolyse. Il a été démontré une relation entre le taux de monomères de fibrine et les pertes sanguines après circulation extracorporelle.

Le but de cette étude est d'évaluer l'intérêt du paramètre dans la prévision et le diagnostic du saignement après circulation extracorporelle pour ensuite intégrer le dosage dans la surveillance systématique de l'hémostase.

Quel est l'objectif de cette recherche?

L'objectif premier de cette étude est donc de déterminer si le dosage des monomères de fibrine présente un intérêt dans la prévision et le diagnostic du saignement après circulation extracorporelle.

Nous étudierons également la pertinence clinique des différents paramètres des bilans d'hémostase systématiques pour les adapter et intégrer le dosage des monomères de fibrine.

Comment va se dérouler cette recherche?

Vous participerez à cette étude au moment de votre hospitalisation pour intervention cardiaque avec circulation extracorporelle : de la consultation pré anesthésique au premier jour de surveillance postopératoire.

Nous incluons une centaine de personnes. Il s'agit d'une étude monocentrique sur le CHU de Limoges.

Qui peut participer ?

Votre médecin vous a proposé de participer à cette étude car vous êtes âgé de plus de 18 ans, et une intervention cardiaque avec circulation extracorporelle vous est nécessaire. Vous serez hospitalisé au CHU Dupuytren.

Votre inclusion dans cette étude observationnelle ne vous empêchera pas de participer à un autre projet de recherche.

Vous ne pourrez pas participer à cette étude si vous êtes sous tutelle ou curatelle, si votre intervention est réalisée en urgence, ou si votre opération programmée est une reprise chirurgicale précoce, greffe cardiaque, assistance implantable

Que vous demandera-t-on ?

Aucun prélèvement supplémentaire n'est nécessaire : pour votre suivi, un tube de sang est prélevé pour réaliser les bilans d'hémostase. Le dosage des monomères de fibrine est simplement réalisé en plus des examens habituellement demandés.

Cette analyse supplémentaire aura lieu lors de vos bilans :

- T-1 : la veille de l'intervention
- T0 : pendant l'intervention (avant sortie de CEC), une partie du prélèvement pour suivi de l'Activated Clotting Time (ACT) et des gaz du sang sera mise dans un tube d'hémostase pédiatrique (1,8mL)
- T1 : en postopératoire le jour de l'intervention
- T2 : en postopératoire le lendemain de l'intervention

Un traitement informatique de vos données personnelles et médicales va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche. Ces données seront identifiées par les deux premières lettres de votre nom et la première lettre de votre prénom.

Votre participation à cette étude ne modifiera pas votre prise en charge, il ne vous sera pas demandé de consulter votre médecin lors de visites supplémentaires ni de prendre des médicaments expérimentaux.

A compléter uniquement si la recherche inclut une collection biologique

Les prélèvements effectués ne seront pas conservés, ils seront détruits selon la procédure habituelle du laboratoire.

Conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez à tout moment d'un droit d'accès et de rectification des données informatisées vous concernant (loi n° 2004-801 du 6 août 2004 modifiant la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés). Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Vous pouvez également accéder directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix à l'ensemble de vos données médicales en application des dispositions de l'article L1111-7 du code de la santé publique. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de la recherche et qui connaît votre identité.

Conformément à la loi Politique de Santé Publique :

- lorsque cette recherche sera terminée, vous serez tenus informés personnellement des résultats globaux par votre médecin dès que ceux-ci seront disponibles, si vous le souhaitez.

S'agissant d'une recherche observationnelle, un accord oral vous sera demandé pour votre participation mais votre consentement écrit ne sera pas recueilli. Après avoir lu ce document d'information, n'hésitez pas à poser à votre médecin toutes les questions que vous désirez.

Merci pour votre participation.

Signature du médecin :

Annexe 5 : Formulaire de validation de la méthode STA[®] Liatest[®] FM

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA-Liatest [®] FM		PBH E1 P QUA 001 A
			Date d'application
			1 décembre 2011
Secteur :	COAGULATION		
Paramètre :	FM (monomère de fibrine)		
Type de portée d'accréditation	A		
DESCRIPTION DE LA METHODE			
Analyte / Mesurande	Monomères de Fibrine		
METHODE DE LA MESURE			
PRINCIPE :			
Dosage quantitatif des monomères de fibrine plasmatique par méthode immunoturbidimétrique sur les automates de la gamme STA [®] . On met en contact des monomères de fibrine du plasma à tester avec des microsphères de latex sur lesquelles sont fixés des anticorps spécifiques des monomères de fibrine. L'augmentation de la turbidité du mélange, mesurée par photométrie, est fonction de la quantité de monomères de fibrine contenue dans le plasma.			
Matrice	PLASMA		
Type de récipient	TUBE CITRATE		
Prétraitement de l'échantillon	centrifugation		
Unités:	µg/mL		
Domaine de mesure :	entre 5 et 150 µg/mL		
Intervalle de référence :	<6 µg/mL		
Lecture et interprétation :			
C'est une technique rapide automatisée, utilisée uniquement dans le cadre des CIVD (bilan CIVD, CEC, polytrauma..) Valeurs normales : <6 µg/mL Une élévation du taux de monomères de fibrine est observée en cas de situations pré-thrombotiques : - de coagulations intravasculaires disséminées (CIVD) - suivi post-opératoire des chirurgies à haut risque de thrombose. L'interprétation se fait en fonction du contexte clinico-biologique : pathologie compatible avec un état de CIVD, plaquettes, fibrinogène, facteurs de la coagulation, D-dimères. Action corrective : les dosages sont réalisés en double détermination suite à une lettre information qualité du fournisseur.			
Marquage CE	Oui		
Codage CNQ (s'il existe):	NON		
CIQ	STAGO : STA-Liatest [®] FM CONTROL		
CQE	NON		
Automate(s) :	STA-R 3503, 2671 et 2719		
	STA-R[®] 3503 : Appareil dédié à la réalisation des tests spécialisés du lundi au jeudi. Du vendredi au dimanche, l'appareil est utilisé pour les tests de routine.		
	STA-R[®] 2671 et 2719 : Automates utilisés tous les 2 jours en alternance pour les tests de routine du lundi au jeudi.		
	Le dosage des monomères de fibrine s'effectue en priorité sur le STA-R 3503. Les STA-R [®] 2719 et 2671 servent de back-up en cas de panne.		

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA-Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

Principe des automates:

Module photométrie :

Le principe des tests colorimétriques ou immunologiques est basé sur l'absorbance (densité optique, DO) d'une lumière monochromatique (405 ou 540 nm) passant au travers d'une cuvette au moment où une réaction chromogénique a lieu. La lumière incidente (I0) est partiellement absorbée par le milieu réactionnel lors de son passage. La lumière transmise (Ii) est mesurée et convertie en absorbance par l'équation suivante : $A = -\log(Ii/I0)$. La concentration du chromogène recherché est directement proportionnelle à l'absorbance ($A = \epsilon LC$ avec A l'absorbance, ϵ le coefficient d'extinction moléculaire, L la longueur du trajet optique et C la concentration).

N° de série:	3503	2719	2671
N° DTB:	5502827	5502777	5502776
Fournisseur :	STAGO		
Référence réactif / lot	STA Liatest® FM : Réactif 1 (buffer) et 2 (latex)		Réf. lot : 107141
Matériau d'étalonnage	5 points dont zéro lot 106998		
Raccordement métrologique :	Non raccordé		
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	5 points dont zéro		

MISE EN ŒUVRE

Opérateurs habilités ayant réalisé la vérification de la méthode

Biologistes responsables de la validation:	Magali DONNARD	
Techniciens, Internes responsables de la validation:	BD	Bienvendu Delphine
	BM	Belabed Marc

Période d'évaluation :	01/03/2011-30/11/2011
Date de mise en service :	12/12/2011
Autorisation de mise en service par :	Magali DONNARD

Vérifications bibliographiques

- DIAGNOSTICA STAGO – Groupe d'aide à l'accréditation des laboratoires (GRAAL) - Critères de Fidélité – Corrélations de système / Precision limits – version 1 janvier 2010 – QUAL 4001 – Anx 06/A
- Fiche fournisseur (cf. dernière page)
- Guide COFRAC LAB GTA 06 (Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale) révision 00 – juillet 2005
- Guide COFRAC SH GTA 04 (Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes de biologie médicale) révision 00 – avril 2011
- Guide COFRAC SH GTA 14 (Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale) révision 00 – octobre 2011
- GEHT (Groupe d'étude sur l'Hémostase et la Thrombose) mai 2007-
http://www.geht.org/fr/pages/hemostase_tab.html
- (1) Poster GEHT 2009 - G.Lavigne-Lissalde et al. Etude prospective validant l'intérêt du dosage des monomères de fibrine circulants comme marqueur d'activation et de fibrinoformation dans le choc septique.
- (2) Poster CNBH 2010 - A.Tournoys et al. Dosage des FM en pratique quotidienne.

 	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA-Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

Vérifications bibliographiques (suite)
<ul style="list-style-type: none"> • (3) Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. <i>Thromb Haemost.</i> 2001;86(5):1327–1330 • (4) ANNANE D., AUBÉ H., BEDOS J., CARIU A., DU CHEYRON D., GAIGNIER M., GUILLOIS B., HILBERT G., LECOMPTE T. « XXIIe Conférence de consensus en réanimation et médecine d'urgence organisée par la Société de réanimation de langue française ».

Matériel:	Centrifugeuse thermostatée à 20°C (N° DTB: 0010297 ou 0910140 ou 1010322)
------------------	---

MAITRISE DES RISQUES				
----------------------	--	--	--	--

	Points critiques à maîtriser Facteurs d'influence	Niveau d'incidence 1 / 2 / 3	Total	Modalités de maîtrise Couverts par EEQ, CIQ ou autres
Préanalytique				
Main d'œuvre	Préleveurs : Infirmières, techniciens...	2	27	<u>Prélèvement</u> : Enseignement en IFSI par le Biologiste responsable su secteur d'Hemostase Manuel de prélèvement sur intranet Plaquette sur l'ordre des tubes dans les services et sur intranet <u>Réception au laboratoire</u> Procédure d'accueil des prélèvements Procédure de gestion des non-conformités en préanalytique Centrifugeuse thermostatée <u>Prescription</u> Enseignement aux étudiants en médecine sur le « bien prescrire » par un biologiste du pôle
Méthode de prélèvement	Garrot < 1min	2		
	Ordre des tubes	3		
	Remplissage > 90%	3		
Milieu <i>(conditions de transport, centrifugation, dilution...)</i>	Délai avant le test < 4H	2		
	Centrifugation 2000 à 2500 g 15min 18 à 22°C	2		
Matériel utilisé	Tube sous vide ou PET, verre siliconé	3		
	Anticoagulant Citrate trisodique 0,109/0,129M	3		
Matière <i>(type d'échantillon primaire...)</i>	<u>Qualité de l'échantillon</u> : Plasma non hémolysé Plasma non coagulé	3		
	<u>Renseignements cliniques</u> : Pathologie Médicaments Facteurs personnels	1		
Analytique				
Main d'œuvre	Techniciens habilités	3	29	CIQ
Méthode	Mode opératoire de l'analyse	2		LHEM M23 A HEMO 001 A CIQ
	Manipulation de l'automate	3		
Milieu	Conditions ambiantes	1		CIQ relevé des températures
	Stockage des réactifs...	3		
Matériel utilisé	Automate	3	CIQ relevé des températures	
	Informatique	2		

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA-Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

Matière	Réactifs	3	CIQ
	Calibrateurs	3	
	Contrôle qualité	3	
	Echantillons patients	3	

Postanalytique			
Main d'œuvre	Techniciens, Biologistes	1	8 <u>Rendu des résultats</u> Le rendu des résultats (Procédure) se fait par des techniciens habilités sous couvert du Biologiste responsable du secteur Procédure de mode dégradé en cas de panne informatique Archivage des résultats : DSIT et laboratoire
Méthode	Mode opératoire des rendus des résultats	1	
Milieu	Archivage des résultats	3	
Matériel utilisé	Système informatique de laboratoire, paramétrage...	3	
Matière			

Incidence faible	1
Incidence moyenne	2
Incidence forte	3

 	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A	
		Date d'application	
		1 décembre 2011	
REPETABILITE			
Automate	STA-R 3503	STA-R 2671	STA-R 2719

NOMBRE	N° TRAVAIL	VALEUR	UNITE	
1	11029150	125,82	µg/mL	Niveau haut
2	11029270	106,66		
3	11029487	56,75		
4	11031275	179,37		
5	11031283	164,44		
6	11031290	166,08		
7	11031317	188,68		
NOMBRE	N° TRAVAIL	VALEUR	UNITE	
1	1107202	6,95	µg/mL	Niveau bas 3503
2	11072117	5,41		
3	11072113	10,12		
NOMBRE	N° TRAVAIL	VALEUR	UNITE	
1	11327185	9,71	µg/mL	Niveau bas
2	11327189	5,79		
3	11327198	6,18		
4	11327184	5,79		
5	11029197	6,95		
6	11029261	6,56		
7	11029262	5,79		
8	11029462	8,91		
9	11327951	7,34		
10	11029982	5,41		
11	11031402	6,18		
12	11329345	7,73		

CONTAMINATION			
Automate	STA-R 3503	STA-R 2671	STA-R 2719

NOMBRE	N° TRAVAIL	VALEUR	UNITE	
1	11327951	7,34	µg/mL	Niveau Bas
2	11029462	8,91		
3	11327185	9,71		
NOMBRE	N° TRAVAIL	VALEUR	UNITE	
1	11031283	164,44	µg/mL	Niveau Haut
2	11029270	106,66		
3	11029487	56,75		
NOMBRE	N° TRAVAIL	VALEUR	UNITE	
1	11031283	164,44	µg/mL	Niveau Haut 3503
2	11029270	106,66		
3	11029487	56,75		
NOMBRE	N° TRAVAIL	VALEUR	UNITE	
1	11030682	16,44	µg/mL	Niveau bas 3503
2	11030704	11,76		

REPRODUCTIBILITE (FIDELITE INTERMEDIAIRE)			
Automate	STA-R 3503	STA-R 2671	STA-R 2719

CQI STA FM CONTROL Niveau 1
lot 107141 (10-22µg/mL) valeur cible : 16 µg/ml

CQI STA FM CONTROL Niveau 2
lot 107141 (75-113µg/ml) valeur cible : 94 µg/ml

 	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011
CORRELATION		

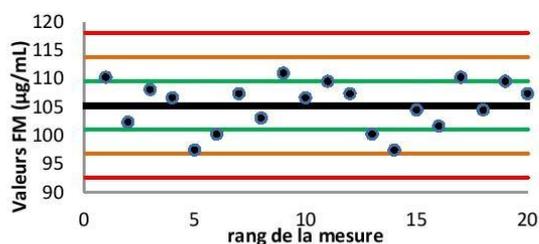
Automate	STA-R 3503	STA-R 2671	STA-R 2719
-----------------	------------	------------	------------

NOMBRE	N° TRAVAIL	VALEUR	UNITE
1	11333809	6,18	µg/mL
2	11333849	24,19	
3	11336767	27,56	
4	11336975	115,38	
5	11029146 = CORRFM1	23,72	
6	11029150 = CORRFM2	125,82	
7	11327199=CORRFM3	56,16	
8	11327185=CORRFM4	9,71	
9	11327198=CORRFM5	6,18	
10	11029197=CORRFM6	6,95	
11	11029262=CORRFM7	5,79	
12	11029270=CORRFM8	106,66	
13	11029503=CORRFM9	42,54	
14	11029462=CORRFM10	8,91	
15	11029487=CORRFM11	56,75	
16	11029732=CORRFM12	42,54	
17	11327951=CORRFM13	7,34	
18	11029946=CORRFM14	16,88	
19	11029982=CORRFM15	5,41	
20	11029984=CORRFM16	18,66	
21	11030704=CORRFM17	11,76	
22	11031407=CORRFM18	52,66	
23	11031402=CORRFM19	6,18	
24	11329345=CORRFM20	7,73	
25	11040854	96,06	
26	11040946	74,01	
27	11049293	25,62	
28	11345241	8,91	
29	11050710	11,35	
30	11050562	17,32	
31	11050565 1/4	56,75	
32	11050171	7,73	

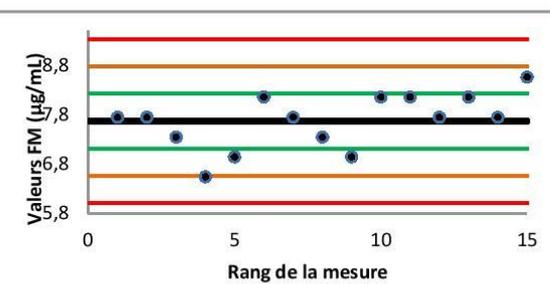
VALEURS DE REFERENCES							
N° travail	Valeur		N° travail	Valeur		N° travail	Valeur
11055174	5		11080005	5		11078241	6,01
11055926	5		11080006	5		11071933	6,56
11071930	5		11080135	5		11056055	6,95
11071931	5		11080137	5		11078090	15,77
11078126	5		11080389	5		11080146	16,27
11078127	5		11080417	5		11055927	20,93
11078130	5		11055913	5,04			
11078233	5		11055911	5,04			
11078295	5		11078154	5,14			
11078296	5		11055934	5,41			
11078297	5		11071932	5,41			
11078464	5		11078269	5,57			
11080003	5		11055279	5,79			

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM		PBH E1 P QUA 001 A
			Date d'application
			1 décembre 2011
TEST DE REPETABILITE			
Détermination des spécifications ou limites acceptables :		Niveau bas : 8%	Niveau haut : 5%
Vérifications bibliographiques :		Fiche fournisseur Stago STA-Liatest® FM Tournoy et al. Dosage des monomères de fibrine en pratique quotidienne. CHRU Lille	
Répétabilité annoncée par le fournisseur :		niveau bas : CV=8%	niveau haut : CV=3,1%
Etude de la Répétabilité réalisée au laboratoire ?		<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON
Plan d'expérimentation et de mise en oeuvre au laboratoire :			
<ul style="list-style-type: none"> Nous avons travaillé sur deux niveaux de concentration : un niveau bas proche du seuil de positivité et un niveau haut à partir de mélanges de plasmas de patients. Le dosage des FM est indiqué dans le diagnostic biologique des CIVD. Il n'existe pas de marqueur biologique spécifique de ce syndrome. Le dosage des FM doit s'interpréter en fonction d'autres marqueurs biologiques, de leurs évolutions et du contexte clinique (utilisation possible des scores ISTH, SFAR...⁽³⁾⁽⁴⁾). Les limites acceptables ont donc été définies en fonction de l'utilisation du paramètre dans notre laboratoire et des données bibliographiques. En raison du coût élevé des réactifs, il a été décidé d'effectuer : 20 mesures pour l'automate STA-R® 3503, automate de routine et 15 mesures pour les automates back-up STA-R® 2671 et 2719. 			

	NIVEAU BAS	NIVEAU HAUT
Date	04/08/11	19/04/11
Automate :	STA-R 3503	
Type échant.	Patient	Patient
Opérateurs	BM	BM
	BD	BD
Unité:	µg/ml	µg/ml
Réactifs/lots	107141	107141
Nb mesures	20	20



Mesure	Valeur	Valeur
1	9,31	110,27
2	9,31	102,38
3	8,91	108,1
4	9,31	106,66
5	8,91	97,46
6	7,73	100,26
7	8,91	107,38
8	9,31	103,09
9	8,91	110,99
10	8,91	106,66
11	8,12	109,54
12	8,52	107,38
13	7,73	100,26
14	8,12	97,46
15	8,12	104,51
16	8,91	101,67
17	7,73	110,27
18	7,73	104,51
19	7,73	109,54
20	8,12	107,38
Moyenne	8,52	105,29
Min	7,73	97,46
Max	9,31	110,99

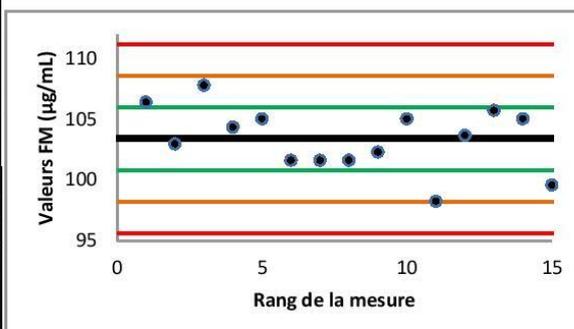
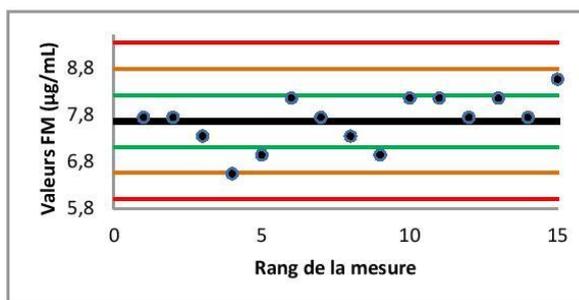


	Niveau bas	Niveau haut
Ecart Type	0,61	4,25
Moy - 2 SD	7,29	96,78
Moy + 2 SD	9,75	113,80
Moy - 3 SD	6,67	92,53
Moy + 3 SD	10,36	118,05
CV %	7,21	4,04
CV Stago	8	3,1
CV Lille		3,6
CV limite (%)	8	5
CONCLUSION	OK	OK

 	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM		PBH E1 P QUA 001 A
			Date d'application
			1 décembre 2011
TEST DE REPETABILITE			

	NIVEAU BAS	NIVEAU HAUT
Date essai	19/04/11	19/04/11
Automate :	STA-R 2719	
Type échant.	Patient	Patient
Opérateur(s)	BM	BM
	BD	BD
Unité:	µg/ml	µg/ml
Réactifs/lots	107141	107141
Nb mesures	15	15

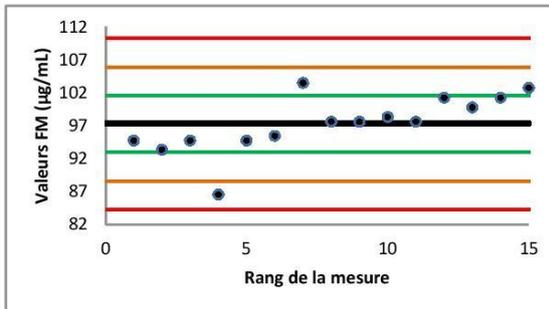
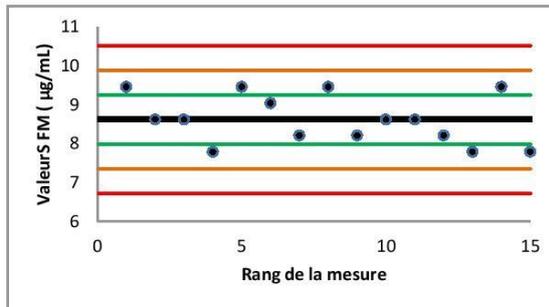
Mesure	Valeur	Valeur
1	7,74	106,42
2	7,74	102,98
3	7,34	107,81
4	6,54	104,35
5	6,94	105,04
6	8,15	101,62
7	7,74	101,62
8	7,34	101,62
9	6,94	102,3
10	8,15	105,04
11	8,15	98,24
12	7,74	103,67
13	8,15	105,73
14	7,74	105,04
15	8,55	99,58
Moyenne	7,66	103,40
Min	6,54	98,24
Max	8,55	107,81
Ecart Type	0,55	2,61
Moy - 2 SD	6,56	98,19
Moy + 2 SD	8,77	108,62
Moy - 3 SD	6,00	95,58
Moy + 3 SD	9,32	111,23
CV %	7,22	2,52
CV STAGO	8	3,1
CV Lille		3,6
CV limite (%)	8	5
CONCLUSION	OK	OK



	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A Date d'application
		1 décembre 2011
TEST DE REPETABILITE		

	NIVEAU BAS	NIVEAU HAUT
Date essai	19/04/11	19/04/11
Automate :	STA-R 2671	
Type échant.	Patient	Patient
Opérateur(s)	BM	BM
	BD	BD
Unité:	µg/ml	µg/ml
Réactifs/lots	107275	107275
Nb mesures	15	15

Mesure	Valeur	Valeur
1	9,46	94,72
2	8,62	93,32
3	8,62	94,72
4	7,79	86,52
5	9,46	94,72
6	9,04	95,43
7	8,21	103,49
8	9,46	97,58
9	8,21	97,58
10	8,62	98,3
11	8,62	97,58
12	8,21	101,24
13	7,79	99,76
14	9,46	101,24
15	7,79	102,74
Moyenne	8,62	97,26
Min	7,79	86,52
Max	9,46	103,49
Ecart Type	0,63	4,32
Moy - 2 SD	7,36	88,61
Moy + 2 SD	9,89	105,91
Moy - 3 SD	6,73	84,29
Moy + 3 SD	10,52	110,23
CV %	7,31	4,45
CV Stago	8	3,1
CV Lille		3,6
CV limite (%)	8	5
CONCLUSION	OK	OK

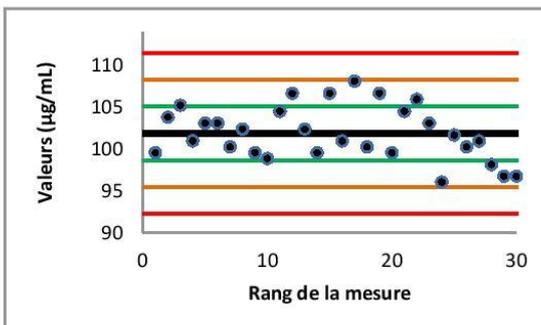
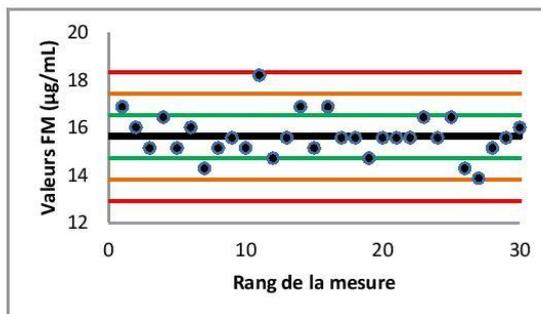


COMMENTAIRES ET CONCLUSIONS
<p><u>Pour le niveau haut</u> : les CV sont conformes</p> <p><u>Pour le niveau bas</u> : les CV sont conformes. On remarque que les variations sont plus importantes dans ce niveau de valeur. Cependant les écarts-types sont faibles, inférieurs à ceux du fabricant. Quand la valeur de l'analyte est basse, l'écart-type est plus pertinent que le CV.</p> <p>Les tests de répétabilité sont acceptables</p>

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM		PBH E1 P QUA 001 A
			Date d'application
			1 décembre 2011
TEST DE FIDELITE INTERMEDIAIRE			
Détermination des spécifications ou limites acceptables :		Niveau bas : 8%	Niveau haut : 5%
Vérifications bibliographiques :	Fiche fournisseur Stago STA-Liatest® FM Tournays et al. Dosage des monomères de fibrine en pratique quotidienne.		
Reproductibilité annoncée par le fournisseur :	niveau bas : CV=8%	niveau haut : CV=2,6%	
Etude de la Reproductibilité réalisée au laboratoire ?	<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON	
Plan d'expérimentation et de mise en oeuvre au laboratoire :			
Les limites acceptables ont été définies selon les mêmes critères que ceux des tests de répétabilité. Nous avons utilisé les deux niveaux de CIQ du kit Control Liatest® N et P, passés deux fois par jour.			

	NIVEAU BAS	NIVEAU HAUT
Type échant	CIQ	CIQ
Opérateur(s)	BD	BD
	BM	BM
Automate :	STA-R 3503	
UNITE :	µg/ml	µg/ml
LOTS :	107141	107141
Nb mesures	30	30

Mesure	Valeur	Date	Valeur
1	16,88	04/04/11 09h49	99,56
2	16,01	04/04/11 15h04	103,8
3	15,14	05/04/11 09h52	105,23
4	16,44	05/04/11 15h05	100,97
5	15,14	06/04/11 09h11	103,09
6	16,01	06/04/11 15h05	103,09
7	14,28	07/04/11 09h48	100,26
8	15,14	07/04/11 14h57	102,38
9	15,57	08/04/11 08h45	99,56
10	15,14	08/04/11 14h44	98,86
11	18,21	11/04/11 09h29	104,51
12	14,71	11/04/11 15h22	106,66
13	15,57	12/04/11 08h38	102,38
14	16,88	12/04/2011 16h40	99,56
15	15,14	13/04/2011 09h27	106,66
16	16,88	13/04/11 15h21	100,97
17	15,57	14/04/11 09h23	108,1
18	15,57	14/04/11 16h43	100,26
19	14,71	15/04/11 09h34	106,66
20	15,57	15/04/11 15h07	99,56
21	15,57	18/04/11 09h26	104,51
22	15,57	18/01/11 16h44	105,94
23	16,44	19/04/11 10h11	103,09
24	15,57	19/04/11 17h16	96,06
25	16,44	20/04/11 10h59	101,67
26	14,28	20/04/11 15h43	100,26
27	13,86	21/04/11 08h48	100,97
28	15,14	21/04/11 16h34	98,16
29	15,57	22/04/11 10h09	96,76
30	16,01	22/04/11 14h57	96,76
Moyenne	15,6337		101,88
Min	13,86		96,06
Max	18,21		108,1

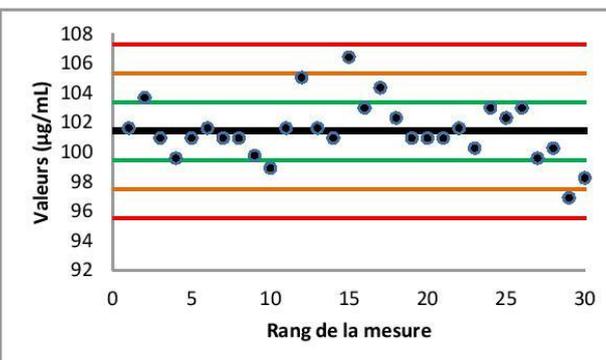
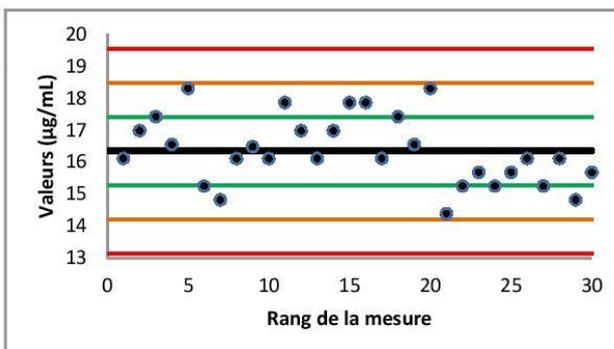


	Niveau bas	Niveau haut
Ecart Type	0,90	3,21
Moy - 2 SD	13,83	95,46
Moy + 2 SD	17,44	108,29
Moy - 3 SD	12,92	92,25
Moy + 3 SD	18,35	111,50
CV %	5,78	3,15
CV Stago	8	2,6
CV Lille	9,6	4
CV limite	8	5
CONCLUSION	OK	OK

 	RAPPORT VALIDATION		PBH E1 P QUA 001 A
	INITIALE METHODE ANALYTIQUE		Date d'application
	STA Liatest® FM		1 décembre 2011
TEST DE FIDELITE INTERMEDIAIRE			

	NIVEAU BAS	NIVEAU HAUT
Type échant	CIQ	CIQ
Opérateur(s)	BD	BD
	BM	BM
Automate :	STA-R 2719	
UNITE :	µg/ml	µg/ml
LOTS :	107141	107141
Nb mesures	30	30

Mesure	Valeur	Date	Valeur
1	16,11	04/04/11 09h18	101,62
2	16,98	04/04/11 16h33	103,67
3	17,42	05/04/11 09h37	100,94
4	16,55	05/04/11 15h41	99,58
5	18,3	06/04/11 08h55	100,94
6	15,25	06/04/11 16h53	101,62
7	14,82	07/04/11 09h14	100,94
8	16,11	07/04/11 15h49	100,94
9	16,48	08/04/11 09h15	99,76
10	16,11	08/04/11 15h11	98,91
11	17,86	11/04/11 09h26	101,62
12	16,98	11/04/11 15h45	105,04
13	16,11	12/04/11 09h3	101,62
14	16,98	12/04/11 15h35	100,94
15	17,86	13/04/11 09h11	106,42
16	17,86	13/04/11 15h46	102,98
17	16,11	14/04/11 09h19	104,35
18	17,42	14/04/11 14h36	102,3
19	16,55	15/04/11 08h36	100,94
20	18,3	15/04/11 15h46	100,94
21	14,39	18/04/11 09h05	100,94
22	15,25	18/04/11 15h30	101,62
23	15,68	19/04/11 08h41	100,26
24	15,25	19/04/11 15h21	102,98
25	15,68	20/04/11 10h58	102,3
26	16,11	20/04/11 16h30	102,98
27	15,25	21/04/11 08h41	99,58
28	16,11	21/04/11 15h44	100,26
29	14,82	22/04/11 09h50	96,9
30	15,68	22/04/11 15h44	98,24



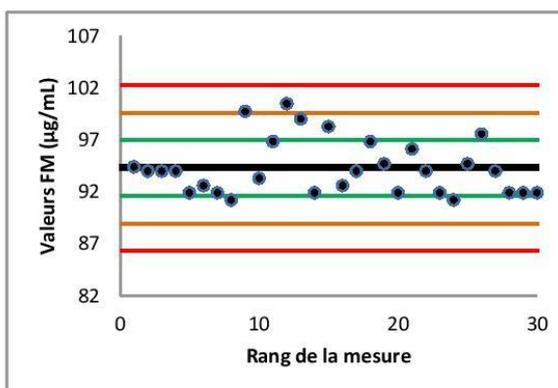
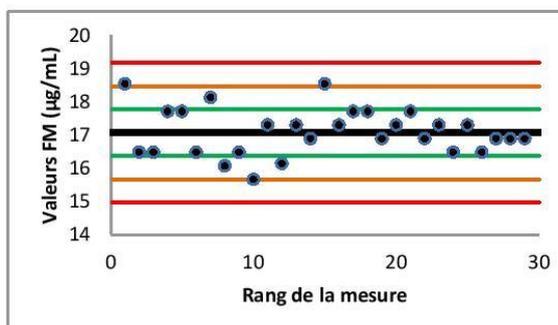
	Moyenne	16,346	101,40	niveau bas	niveau haut
Min	14,39		96,90	14,21	97,48
Max	18,3		106,42	18,48	105,33
Ecart Type	1,07		1,96	Moy - 3 SD	13,14
				Moy + 3 SD	19,55
				CV %	6,54
				CV Stago	8
				CV Lille	9,6
				CV limite	8
CONCLUSION				OK	OK

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

TEST DE FIDELITE INTERMEDIAIRE

	NIVEAU BAS	NIVEAU HAUT
Type échant	CIQ	CIQ
Opérateur(s)	BD	BD
	BM	BM
Automate :	STA-R 2671	
UNITE :	µg/ml	µg/ml
LOTS :	107141	107141
Nb mesures	30	30

Mesure	Valeur	Date	Valeur
1	18,54	04/04/2011 09h03	94,43
2	16,48	04/04/2011 16h09	94,02
3	16,48	05/04/2011 08h58	94,02
4	17,71	05/04/2011 15h59	94,02
5	17,71	06/04/11 09h04	91,93
6	16,48	06/04/11 15h44	92,62
7	18,13	07/04/2011 08h51	91,93
8	16,07	07/04/2011 16h01	91,24
9	16,48	08/04/11 09h40	99,76
10	15,66	08/04/11 15h39	93,32
11	17,3	11/04/11 09h09	96,86
12	16,14	11/04/2011 16h03	100,50
13	17,3	12/04/11 09h32	99,03
14	16,89	12/04/11 15h49	91,93
15	18,54	13/04/11 09h20	98,3
16	17,3	13/04/2011 15h58	92,62
17	17,71	14/04/11 09h00	94,02
18	17,71	14/04/11 16h29	96,86
19	16,89	15/04/11 09h13	94,72
20	17,3	15/04/11 14h33	91,93
21	17,71	18/04/11 09h13	96,14
22	16,89	18/04/11 16h33	94,02
23	17,3	19/04/11 08h59	91,93
24	16,48	19/04/2011 15h43	91,24
25	17,3	20/04/11 09h34	94,72
26	16,48	20/04/11 16h15	97,58
27	16,89	21/04/11 09h11	94,02
28	16,89	21/04/11 15h55	91,93
29	16,89	22/04/11 09h28	91,93
30	16,48	22/04/11 15h29	91,93
Moyenne	17,071		94,32
Min	15,66		91,24
Max	18,54		100,5
Ecart Type	0,70		2,66



	niveau bas	niveau haut
Moy - 2 SD	15,67	89,00
Moy + 2 SD	18,48	99,63
Moy - 3 SD	14,96	86,34
Moy + 3 SD	19,18	102,29
CV %	4,11	2,82
<i>CV Stago</i>	8	2,6
<i>CV Lille</i>	9,1	4
CV limite	8	5
CONCLUSION	OK	OK

COMMENTAIRES ET CONCLUSION	
Valeurs basses : Les CV sont conformes	
Valeurs hautes : Les CV sont conformes.	
Les tests de fidélité intermédiaire sont acceptables.	

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011
Détermination des spécifications ou limites acceptables :		+/- 3%
Vérifications bibliographiques :	Absence de bibliographie	
Contamination annoncée par le fournisseur :	Non communiquée	
Etude de la contamination réalisée au laboratoire ?	<input checked="" type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Plan d'expérimentation et de mise en œuvre au laboratoire :		
<p>Les échantillons haut et bas sont obtenus par mélange de plusieurs patients. Pour les trois automates, l'échantillon haut est passé trois fois suivi de l'échantillon bas trois fois. Afin de se mettre en conformité avec le guide SH GTA 04 paru en avril 2011, le test de contamination inter-échantillons a été aussi réalisé selon les nouvelles recommandations sur l'automate principal de routine (3503).</p>		

TEST DE CONTAMINATION (selon LAB GTA 04)			
Automates :	STA-R 3503	STA-R 2719	STA-R 2671
Date essai	18/04/11		
Opérateur	BD	BM	
Type échantillon élevé (H)	Patients	N° Lot	/
Type échantillon bas (B)	Patients		
Unité	µg/mL		
Rinçage effectué avant test ?	oui		

STA-R 3503					
Niveau Haut (H)			Niveau Bas (B)		
H1	H2	H3	B1	B2	B3
105,23	100,26	103,8	7,73	6,95	7,34
Moyenne					
103,096667					

TEST DE CONTAMINATION EN %	SEUIL MAXIMUM EN %	CONCLUSION
0,378285751	3	OK
TEST VALIDE		

STA-R 2719					
Niveau Haut (H)			Niveau Bas (B)		
H1	H2	H3	B1	B2	B3
101,62	100,26	105,04	6,94	5,75	7,34
Moyenne					
102,306667					

TEST DE CONTAMINATION EN %	SEUIL MAXIMUM EN %	CONCLUSION
-0,390981363	3	OK
TEST VALIDE		

STA-R 2671					
Niveau Haut (H)			Niveau Bas (B)		
H1	H2	H3	B1	B2	B3
101,24	101,99	102,74	9,04	9,46	8,21
Moyenne					
101,99					

TEST DE CONTAMINATION EN %	SEUIL MAXIMUM EN %	CONCLUSION
0,813805275	3	OK
TEST VALIDE		

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM		PBH E1 P QUA 001 A Date d'application
			1 décembre 2011
TEST DE CONTAMINATION (selon SH GTA O4)			
Automate :		STA-R 3503	
Date essai	25/08/11		
Opérateur	BD	BM	
Type échantillon élevé (H)	Patient		N° Lot /
Type échantillon bas (B)	Patient		
Unité	µg/mL		
Rinçage effectué avant test ?	OUI		

STA-R 3503						
Niveau Haut (H)			1	Niveau Bas (B)		
H1	H2	H3		B1	B2	B3
63,74	62,37	66,53		14,79	15,77	15,28
Moyenne						
64,21333333						
Niveau Haut (H)			2	Niveau Bas (B)		
H1	H2	H3		B1	B2	B3
62,37	58,29	65,13		13,35	11,92	10,98
Moyenne						
61,93						
Niveau Haut (H)			3	Niveau Bas (B)		
H1	H2	H3		B1	B2	B3
64,44	65,13	66,53		14,31	12,87	13,35
Moyenne						
65,36666667						
Niveau Haut (H)			4	Niveau Bas (B)		
H1	H2	H3		B1	B2	B3
63,74	63,74	64,44		13,83	13,83	11,92
Moyenne						
63,97333333						
Niveau Haut (H)			5	Niveau Bas (B)		
H1	H2	H3		B1	B2	B3
64,44	63,74	65,13		13,35	13,35	13,83
Moyenne						
64,43666667						

Comparaison des moyennes B1 et B3 (test de Student)		
valeur de p	seuil	Conclusion
0,222644024	< 0,05	<i>Pas de différence significative entre les moyennes B1 et B3</i>

TEST DE CONTAMINATION EN %	SEUIL MAXIMUM EN %	CONCLUSION
1,677404148	3	OK
TEST VALIDE		

COMMENTAIRES ET CONCLUSION
L'ensemble des tests de contamination est conforme à la limite fixée. On conclue à l'absence de contamination inter-échantillons.

 	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

INTERVALLE DE REFERENCE

Vérifications bibliographiques :
 Fiche fournisseur Stago STA-Liatest® FM
 Poster GEHT 2009 - G.Lavigne-Lissalde et al. Etude prospective validant l'intérêt du dosage des monomères de fibrine circulants comme marqueur d'activation et de fibrinof ormation dans le choc septique.

Valeurs de référence du fournisseur :
 < 6µg/mL

Etude des valeurs de référence réalisée au laboratoire ? OUI NON

Plan d'expérimentation et de mise en oeuvre au laboratoire :
 Vérification des données fournisseur avec dosage d'au moins 30 plasmas humains présumés normaux.
 Les critères de sélection sont : prélèvement provenant du service des urgences du CHU, hémostase normale (TCA,TP,fibrinogène), absence de pathologie pouvant interférer avec l'hémostase
 Pour les calculs, les taux < 5µg/mL ont été considérés à 5 µg/mL.

Date de recueil des données 03/08/2011 -

Automate : **STA-R 3503**

Calcul de l'intervalle de référence

Valeur	Nbre patients	Gauss
5	19	3,20
5,04	2	3,21
5,14	1	3,24
5,41	2	3,31
5,57	1	3,35
5,79	1	3,39
6,01	1	3,41
6,56	1	3,43
6,95	1	3,40
15,77	1	0,14
16,27	1	0,10
20,93	1	0,00

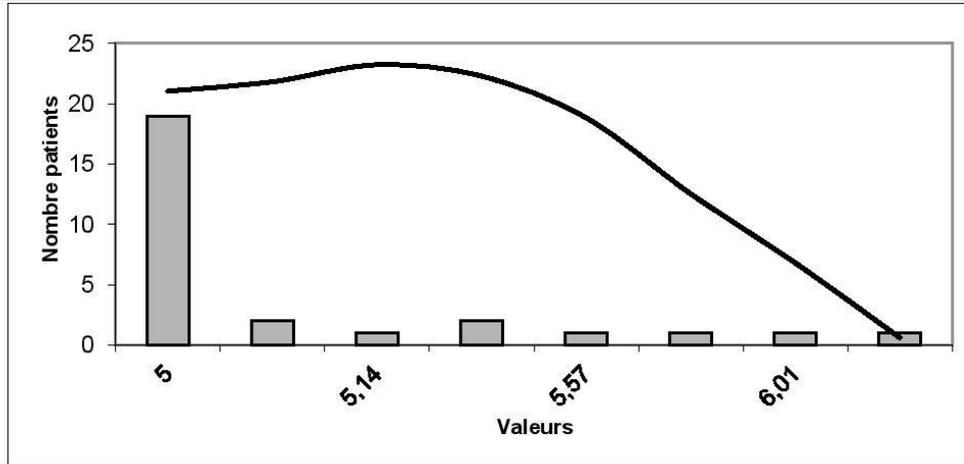
Panel patients	32
Moyenne (M _n)	6,40
Variance	13,82
Ecart-type (S _n)	3,72
Mn-2S _n	-1,03
Mn+2S _n	13,84

valeurs aberrantes > 13,84

Après élimination des valeurs aberrantes

Valeur	Nbre patients	Gauss
5	19	21,03
5,04	2	21,81
5,14	1	23,22
5,41	2	22,28
5,57	1	18,82
5,79	1	12,52
6,01	1	6,80
6,56	1	0,61
6,95	1	0,05
		0,00

Panel patients	29
Moyenne tronquée (Mt)	5,24
Variance	0,24
Ecart-type tronqué (St)	0,49



Valeurs de référence comprises entre	
$m_n - 2S_n$	4,26
$m_n + 2S_n$	6,22

COMMENTAIRES ET CONCLUSION
Nous retrouvons la valeur de référence annoncée par le fournisseur : < 6µg/mL

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

TEST DE CORRELATION DE METHODES			
Automate :	STA-R 3503		
Automate :	STA-R 2671		
Test entre 2 méthodes différentes ?	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON	
Si oui, lister les 2 méthodes /	Méthode 1 :		
	Méthode 2 :		
Détermination des spécifications ou limites acceptables :	pente : 0,9-1,1		
Vérifications bibliographiques :	DIAGNOSTICA STAGO – Groupe d'aide à l'accréditation des laboratoires (GRAAL) - - Critères de Fidélité – Corrélations de système / Precision limits – version 1 janvier 2010 – QUAL 4001 – Anx 06/A		
Corrélation annoncée par le(s) fournisseur(s) :	NC		
Etude de corrélation réalisée au laboratoire ?	<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON	
Plan d'expérimentation et de mise en oeuvre au laboratoire :			
<p>Il n'existe pas de bibliographie concernant les corrélations; nous nous sommes basés sur les données concernant le dosage des D-Dimères effectué sur le même principe technique de dosage (technique Liatest®).</p> <p>Les échantillons couvrent l'ensemble du domaine de mesure de la méthode. L'analyse des échantillons frais ou après congélation a été effectuée sur les trois automates dans un délai le plus court possible.</p>			
Test entre 2 méthodes identiques ?	<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON	
Si oui, quelle est cette méthode ?	STA Liatest® FM		
Fournisseurs différents ?	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON	
Préciser le ou les fournisseurs	Méthode 1 :	STAGO	Méthode 2 : STAGO
Mode fonctionnement des 2 automates (techniques) ?	Back-up		
Opérateurs	BD	Date des analyses	24/05/2011
	BM		

Mesures	3503 (xi)	2671 (yi)	Nb mesures		Biais %
			(xi - yi)	yi / xi	
1	6,18	8,21	-2,03	1,33	-32,85
2	6,18	6,11	0,07	0,99	1,13
3	6,18	7,37	-1,19	1,19	-19,26
4	6,95	6,53	0,42	0,94	6,04
5	7,73	8,62	-0,89	1,12	-11,51
6	7,73	9,46	-1,73	1,22	-22,38
7	7,73	9,46	-1,73	1,22	-22,38
8	8,52	8,21	0,31	0,96	3,64
9	8,91	10,29	-1,38	1,15	-15,49
10	8,91	10,7	-1,79	1,20	-20,09
11	10,12	10,7	-0,58	1,06	-5,73
12	11,35	13,18	-1,83	1,16	-16,12
13	12,17	13,6	-1,43	1,12	-11,75
14	17,32	19,77	-2,45	1,14	-14,15
15	18,21	18,95	-0,74	1,04	-4,06
16	19,11	20,18	-1,07	1,06	-5,60
17	22,78	21,83	0,95	0,96	4,17
18	24,19	24,73	-0,54	1,02	-2,23
19	25,62	24,31	1,31	0,95	5,11
20	27,56	26,81	0,75	0,97	2,72
21	36,14	35,75	0,39	0,99	1,08
22	44,73	41,06	3,67	0,92	8,20
23	54,99	56,36	-1,37	1,02	-2,49
24	54,99	50,4	4,59	0,92	8,35
25	56,16	52,36	3,80	0,93	6,77
26	56,75	55,85	0,90	0,98	1,59
27	74,01	68,73	5,28	0,93	7,13
28	96,06	89,19	6,87	0,93	7,15
29	113,18	109,67	3,51	0,97	3,10
30	115,38	100,5	14,88	0,87	12,90
31	120,56	118,63	1,93	0,98	1,60
32	125,82	135,46	-9,64	1,08	-7,66

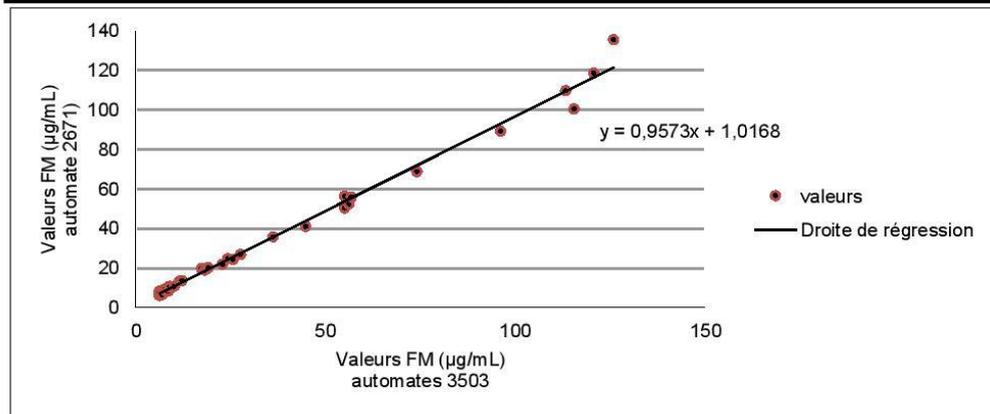
TEST DE CORRELATION DE METHODES (SUITE 1)			
	Automate 1	Automate 2	
Moyenne	37,9	37,3	Différence xi -yi
Mini	6,18	6,11	
Max	125,82	135,46	Rapport yi/xi
N	32	32	Moyenne
			Biais analytique en %

	Moyenne (xi-yi)	Biais moyen
x<20	-1,13	-11,91
20<x<150	2,33	3,59

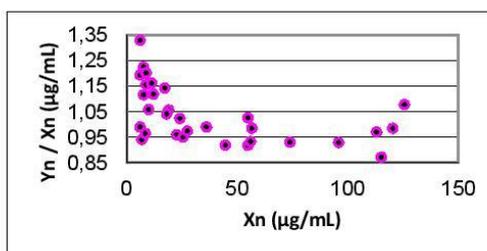
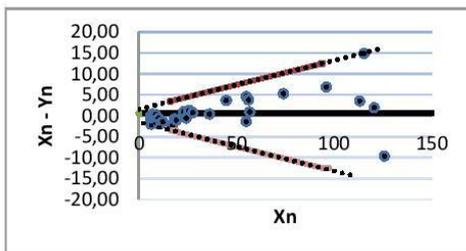
	Limite de suivi	
	niveau bas	niveau haut
CIQ (µg/mL)	16	94
Limite	3,42	12,51
	-3,42	-12,51

Ecart-type des différences (xi-yi)	
écart-types	3,94
2 x écart-types	7,87
3 x écart-types	11,81
Moyenne	0,60
Moyenne - 2SD	-7,27
Moyenne + 2SD	8,47
Moyenne - 3SD	-11,21
Moyenne +3SD	12,41

GRAPHIQUES yi=xi



	SEUIL	CONCLUSION
Pente 0,9573	0,9-1,1	OK
Origine 1,017	NC	
R 0,99527		



	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

TEST DE CORRELATION DE METHODES					
Automate :	STA-R 3503				
Automate :	STA-R 2719				
Test entre 2 méthodes différentes ?	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON			
Si oui, lister les 2 méthodes /	Méthode 1 :				
	Méthode 2 :				
Détermination des spécifications ou limites acceptables :	pente : 0,9-1,1				
Vérifications bibliographiques :	DIAGNOSTICA STAGO – Groupe d'aide à l'accréditation des laboratoires (GRAAL) - - Critères de Fidélité – Corrélations de système / Precision limits – version 1 janvier 2010 – QUAL 4001 – Anx 06/A				
Corrélation annoncée par le(s) fournisseur(s) :	NC				
Etude de corrélation réalisée au laboratoire ?	<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON			
Plan d'expérimentation et de mise en oeuvre au laboratoire :					
Il n'existe pas de bibliographie concernant les corrélations; nous nous sommes basées sur les données concernant le dosage des D-Dimères effectué sur le même principe technique de dosage (technique Liatest).					
Les échantillons couvrent l'ensemble du domaine de mesure de la méthode. L'analyse des échantillons frais ou après congélation a été effectuée sur les trois automates dans le délai le plus court possible.					
Test entre 2 méthodes identiques ?	<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON			
Si oui, quelle est cette méthode ?	STA Liatest® FM				
Fournisseurs différents ?	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON			
Préciser le ou les fournisseurs	Méthode 1 :	STAGO	Méthode 2 :	STAGO	
Mode fonctionnement des 2 automates (techniques) ?	Back-up				
Opérateurs	BD	Date des analyses			
	BM				

Mesures	3503 (xi)	2719 (yi)	Nb mesures		Biais %
			(xi - yi)	yi / xi	
1	6,18	6,54	-0,36	1,06	-5,83
2	6,18	5,75	0,43	0,93	6,96
3	6,18	6,94	-0,76	1,12	-12,30
4	6,95	7,34	-0,39	1,06	-5,61
5	7,73	9,37	-1,64	1,21	-21,22
6	7,73	8,15	-0,42	1,05	-5,43
7	7,73	7,74	-0,01	1,00	-0,13
8	8,52	6,94	1,58	0,81	18,54
9	8,91	10,19	-1,28	1,14	-14,37
10	8,91	9,37	-0,46	1,05	-5,16
11	10,12	9,78	0,34	0,97	3,36
12	11,35	11,85	-0,50	1,04	-4,41
13	12,17	11,85	0,32	0,97	2,63
14	17,32	19,19	-1,87	1,11	-10,80
15	18,21	18,3	-0,09	1,00	-0,49
16	19,11	21,43	-2,32	1,12	-12,14
17	22,78	26,96	-4,18	1,18	-18,35
18	24,19	23,25	0,94	0,96	3,89
19	25,62	26,96	-1,34	1,05	-5,23
20	27,56	25,56	2,00	0,93	7,26
21	36,14	36,69	-0,55	1,02	-1,52
22	44,73	42,83	1,90	0,96	4,25
23	54,99	54,67	0,32	0,99	0,58
24	54,99	57,47	-2,48	1,05	-4,51
25	56,16	56,91	-0,75	1,01	-1,34
26	56,75	60,31	-3,56	1,06	-6,27
27	74,01	69,07	4,94	0,93	6,67
28	96,06	89,64	6,42	0,93	6,68
29	113,18	113,43	-0,25	1,00	-0,22
30	115,38	105,73	9,65	0,92	8,36
31	120,56	120,61	-0,05	1,00	-0,04
32	125,82	136,23	-10,41	1,08	-8,27

TEST DE CORRELATION DE METHODES (SUITE 1)

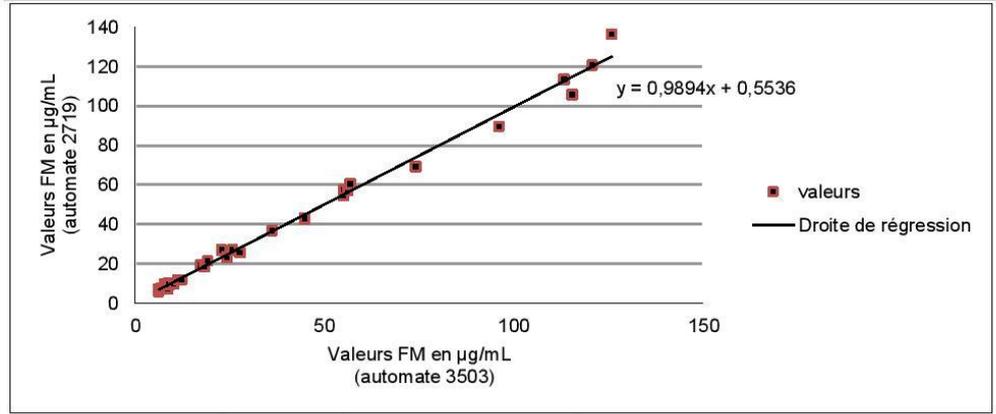
	Automate 1	Automate 2		Différence xi - yi	Rapport yi/xi
Moyenne	37,9	38,0			
Mini	6,18	5,75			
Max	125,82	136,23			
N	32	32			
			Moyenne	-0,15	1,02
			Biais analytique en %		-2,33

	Moyenne (xi-yi)	Biais moyen
x<20	-0,46	-4,15
20<x<150	0,16	-0,50

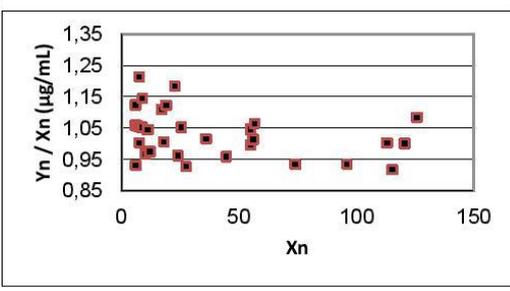
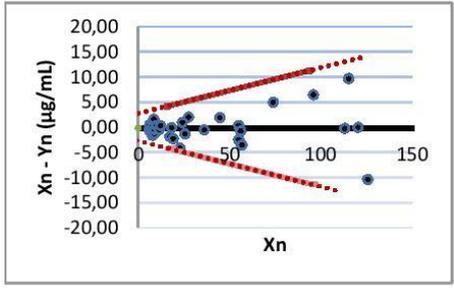
Ecart-type des différences (xi-yi)	
écart-types	3,27
2 x écart-types	6,54
3 x écart-types	9,81
Moyenne	-0,15
Moyenne - 2SD	-6,69
Moyenne + 2SD	6,39
Moyenne - 3SD	-9,96
Moyenne +3SD	9,66

	Limite de suivi	
	niveau bas	niveau haut
CQI (µg/mL)	16	94
Limite	4,19	11,28
	-4,19	-11,28

GRAPHIQUES yi=xi



	SEUIL	CONCLUSION
Pente	0,9894	0,9-1,1
Origine	0,554	NC
R	0,99635	OK



	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

TEST DE JUSTESSE

Détermination des spécifications ou limites acceptables :		NA
Vérifications bibliographiques :	NA	
Justesse annoncée par le fournisseur :	NA	
Etude de Justesse réalisée au laboratoire ?	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON
Automate :	NA	
MATERIAU DE REFERENCE	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON
ECHANTILLON EEQ	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON
ECHANTILLON CIQ EXTERNALISE	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON
Nb mesures	NA	

COMMENTAIRES ET CONCLUSION
<p>Il n'existe pas pour l'instant d'EEQ ni de programme d'externalisation des CIQ. Le test de justesse ne peut donc être réalisé.</p> <p>Un échange d'échantillons ou de données avec d'autres laboratoires utilisateurs du kit pourraient permettre de réaliser le test.</p>

INCERTITUDE DE MESURE

MATERIAU DE REFERENCE	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON
ECHANTILLON EEQ	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON
ECHANTILLON CIQ EXTERNALISE	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON
Nb mesures	NA	

COMMENTAIRES ET CONCLUSION
<p>En l'absence d'EEQ, de matériau de référence et de programme d'externalisation des CIQ, l'incertitude de mesure ne peut être estimée.</p> <p>De la même façon que pour la justesse, un échange d'échantillons ou de données avec d'autres laboratoires utilisateurs du kit pourraient permettre de calculer l'incertitude de mesure.</p> <p>Les facteurs de variabilités ont été définis (cf feuille d'information)</p>

Etude de Stabilité des réactifs FM buffer 1 et FM Liatest 2

Détermination des spécifications ou limites acceptables :		NA
Vérifications bibliographiques :	Fiche fournisseur Stago STA-Liatest® FM	
Stabilité annoncée par le fournisseur :		
<ul style="list-style-type: none"> • 2 jours sur STA Compact® et STA-R® dans leur flacon d'origine avec STA® - mini Reducer et capsule operculée • 15 jours à 2-8°C dans leur flacon d'origine bouché (enlever le STA® - mini Reducer) 		
Etude de la Stabilité réalisée au laboratoire ?	<input type="checkbox"/> OUI	<input checked="" type="checkbox"/> NON

COMMENTAIRES ET CONCLUSION
<p>Compte tenu du nombre de tests estimés par jour, les réactifs FM buffer 1 et FM Liatest 2 n'excéderont pas la limite de stabilité annoncée par le fabricant. Nous les conservons donc 48 heures maximum après ouverture sur STA-R®.</p>

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application
		1 décembre 2011

SPECIFICITE INTERFERENCES

Type de lecture : turbidimétrie

Vérifications bibliographiques :
Fiche fournisseur Stago STA-Liatest® FM

Spécificité annoncée par fournisseur

- Le taux de monomères de fibrine des plasmas particulièrement turbides peut-être sous-estimé.
- L'interférence du facteur rhumatoïde dans le dosage n'a pas été mise en évidence, cependant elle n'est pas totalement exclue. Aussi, en cas de taux de monomères de fibrine inexpliqué, il peut être utile de pratiquer la recherche du facteur rhumatoïde.
- La présence d'anticorps anti-souris chez certains sujets peut entrainer une surestimation du taux de monomères de fibrine.
- In vitro, une surcharge en fibrinogène peut induire une sous-estimation du taux de monomères de fibrine.
- Il a été montré que l'hémoglobine, la bilirubine, les héparines non fractionnées, les héparines de bas poids moléculaire n'interféraient pas dans le dosage jusqu'à des concentrations respectives de 5g/L, 200mg/L, 1UI/mL et 2 UI anti-Xa/mL.

Etude de spécificité réalisée au laboratoire ? OUI NON

COMMENTAIRES ET CONCLUSION

Ces données sont prises en compte dans l'interprétation du résultat si besoin.

INTERVALLE DE MESURE

LIMITE DE DETECTION ET QUANTIFICATION

Vérifications bibliographiques :
Fiche fournisseur Stago STA-Liatest® FM

Limite de quantification annoncée par le fournisseur :
le seuil de détection de la méthode est 5 µg/mL

Etude réalisée au laboratoire ? OUI NON

LINEARITE

Vérifications bibliographiques :
Fiche fournisseur Stago STA-Liatest® FM
Tournoy et al. Dosage des monomères de fibrine en pratique quotidienne. CHRU Lille

Linéarité annoncée par le fournisseur :
la zone de mesure s'étend de 5 à 150 µg/mL.

Etude de la linéarité réalisée au laboratoire ? OUI NON

	RAPPORT VALIDATION INITIALE METHODE ANALYTIQUE STA Liatest® FM	PBH E1 P QUA 001 A
		Date d'application 1 décembre 2011

RECAPITULATIF DE VALIDATION DE LA METHODE QUANTITATIVE

Paramètre : **Monomères de fibrine**

Automate :	STA-R 3503	STA-R 2719	STA-R 2671
N° de série :	5502827	5502777	5502776
Matrice :	PLASMA		

Unité :	µg/mL			
Paramètres à vérifier et/ou connaître	Bibliographie	Vérification labo	Validé ?	Commentaires
Fidélité <i>(répétabilité-fidélité intermédiaire)</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	OUI	
Contamination	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	OUI	
Intervalle de référence	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	OUI	
Justesse (approche de la)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		En attente de CIQ externalisé ou d'EEQ
Incertitudes/facteurs de variabilité	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Stabilité réactifs	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	OUI	
Intervalle de mesure <i>(Limite de quantification-Limite de linéarité)</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	OUI	
Interférences	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	OUI	
Spécificité analytique	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	OUI	
Comparaison :				
Avec méthode de référence	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	OUI	
Avec méthode déjà utilisée au labo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Entre 2 automates identiques	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		
Analyse des discordances	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	OUI	

CONCLUSION
VALIDATION INITIALE

OUI NON

VALIDÉ LE	01/12/2011	PAR	Magali Donnard

Annexe 6 : Caractéristiques cliniques pré et peropératoires des patients (étude observationnelle)

	Moy (ET)	n (%)	N
Sexe (hommes)		61 (70,11)	87
Poids (kg)	77 (14)		86
Age (années)	68 (12)		87
EUROSCORE II®	1,96 (2,14)		86
Type de Chirurgie			
pathologie coronarienne		20 (22,99)	87
pathologie valvulaire		26 (29,89)	87
complexe		41 (47,13)	87
Durée CEC (min)	110 (51)		86
Débit maximum CEC (L/min)	7,26 (10,24)		86
Dose totale héparine (UI)	30 224 (7 052)		85
Transfusion peropératoire (nombre de patients)			
CGR		39 (44,83)	87
PFC		23 (26,44)	87
Fibrinogène		5 (5,75)	87
Plaquettes		2 (2,30)	87
Produits hors CGR		24 (27,59)	87

Annexe 7 : Caractéristiques cliniques postopératoires des patients (étude observationnelle)

	Moy (ET)	Med (Q1-Q3)	n (%)	N
Saignement (mL)				
+1H	125 (219)	60 (40-120)		81
+24H	847 (818)	660 (460-930)		82
Température (°C)				
+1H	36,12 (0,70)			84
+3H	36,25 (0,68)			84
+6H	36,45 (0,74)			84
Date d'ablation des drains (jours)	3,61 (1,61)			79
Cell Saver® (mL)	877 (543)			84
reprise chirurgicale (nombre de patients)			3 (3,45)	87
Première sortie des Soins Intensifs (jours)	5,26 (2,44)			76
Décès (nombre de patients)			3 (3,45)	87
transfusion postopératoire (nombre de patients)				
CGR			25 (28,74)	87
PFC			18 (20,69)	87
Fibrinogène			9 (10,34)	87
Plaquettes			5 (5,75)	87
Produits hors CGR			19 (21,84)	87

Annexe 8 : Comparaisons des données cliniques entre les patients avec saignement excessif et saignement normal (étude observationnelle)

	Saignement normal		Saignement excessif		p
	Moy (ET)		Moy (ET)		
Age (années)	66 (11)	n=56	72 (12)	n=29	0,011
Sexe (hommes)	41 (73,21)	n=56	19 (65,52)	n=29	0,106
Transfusions hors CGR					
peropératoire	12 (21,43)	n=56	11 (37,93)	n=29	0,104
postopératoire	6 (10,71)	n=56	13 (44,83)	n=29	0,0001
EUROSCORE II®	1,79 (1,58)	n=55	2,24 (2,95)	n=29	0,241
Type de chirurgie					
Pathologie coronarienne	16 (28,57)	n=56	6 (20,69)	n=29	0,602
Pathologie valvulaire	18 (32,14)	n=56	7 (24,14)	n=29	0,467
complexe	21 (37,50)	n=56	15 (51,72)	n=29	0,250
Durée CEC (min)	105 (44)	n=55	119 (64)	n=29	0,440
Debit max CEC (L/min)	8,09 (12,76)	n=55	5,80 (0,78)	n=29	0,481
Dose totale héparine (UI)	30 027 (7 281)	n=55	30 603	n=29	0,574
Température (°C)					
H+1	36,11 (0,77)	n=56	36,15 (0,54)	n=28	0,750
H+3	36,29 (0,74)	n=56	36,16 (0,55)	n=28	0,381
H+6	36,55 (0,77)	n=56	36,26 (0,63)	n=28	0,062
Date d'ablation des drains (jours)	3,53 (1,68)	n=51	3,75 (1,51)	n=28	0,278
Cell Saver® (mL)	818 (435)	n=53	993 (714)	n=29	0,404
Nombre de reprises chirurgicales	0 (0,00)	n=56	3 (10,34)	n=29	0,014
Date de première sortie des soins intensifs (jours)	5,10 (2,68)	n=56	5,54 (1,97)	n=17	0,089
Décès	3 (0,00)	n=42	0 (0,00)	n=29	0,507

Annexe 9 : Comparaisons des données biologiques entre les patients avec saignement excessif et saignement normal (étude observationnelle)

	Saignement normal		Saignement excessif		p
	Moy (ET)		Moy (ET)		
Bilan Préopératoire					
TCA (s)	33,67 (4,96)	n=55	34,66 (4,10)	n=27	0,121
TQ (s)	13,87 (3,90)	n=54	13,49 (1,64)	n=27	0,551
Hémoglobine (g/dL)	14,35 (1,44)	n=55	14,45 (2,05)	n=25	0,848
Hématocrite (%)	42,81 (4)	n=55	43,34 (5,94)	n=25	0,640
Plaquettes (G/L)	258 (67)	n=54	234 (48)	n=25	0,144
Bilans Péropératoire					
TCA (s)	53,39 (35,79)	n=28	53,05 (30,11)	n=13	0,119
TQ (s)	20,81 (9,87)	n=28	20,87 (2,65)	n=13	0,071
Fibrinogène (g/l)	2,01 (0,47)	n=27	1,71 (0,47)	n=13	0,069
1^{er} Bilan Postopératoire J0 [0min]					
TCA (s)	35,90 (5,59)	n=54	40,55 (5,92)	n=28	0,0001
TQ (s)	16,86 (1,69)	n=54	18,31(2,11)	n=28	0,002
Fibrinogène (g/L)	2,23 (0,54)	n=54	1,96 (0,42)	n=27	0,037
Temps de thrombine (s)	19.61 (2.08)	n=36	18,47 (2,15)	n=24	0.062
Facteur II (%)	59 (12,03)	n=54	53 (12)	n=27	0,023
Facteur X (%)	57 (15)	n=54	48 (15)	n=27	0,010
Facteur V (%)	60 (14)	n=54	55 (16)	n=27	0,062
D-Dimère (µg/mL)	0,62 (0,30)	n=53	0,65 (0,35)	n=25	0,236
Test éthanol	1 (1,85)	n=54	0 (0,00)	n=25	-
Hémoglobine (g/dL)	11,88 (1,25)	n=53	10,86 (1,60)	n=27	0,006
Hématocrite (%)	34,79 (3,85)	n=54	31,70 (4,80)	n=27	0,003
Plaquettes (G/L)	152 (51,50)	n=53	108 (36)	n=26	0,0001

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GRIS J.-C., BOUVIER S., COCHERY-NOUVELLON E., FAILLIE J.-L., LISSALDE-LAVIGNE G., LEFRANT J.-Y. « Fibrin-related markers in patients with septic shock: individual comparison of D-dimers and fibrin monomers impacts on prognosis ». *Thromb. Haemost.* [En ligne]. décembre 2011. Vol. 106, n°6, p. 1228–1230. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1160/TH11-07-0489> > (consulté le 27 mai 2012)
- [2] WHITLOCK R., CROWTHER M. A., NG H. J. « Bleeding in Cardiac Surgery: Its Prevention and Treatment—an Evidence-Based Review ». *Critical Care Clinics* [En ligne]. juillet 2005. Vol. 21, n°3, p. 589–610. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2005.04.003> > (consulté le 15 janvier 2012)
- [3] VIVACQUA A., KOCH C. G., YOUSUF A. M., NOWICKI E. R., HOUGHTALING P. L., BLACKSTONE E. H., SABIK J. F. 3rd. « Morbidity of bleeding after cardiac surgery: is it blood transfusion, reoperation for bleeding, or both? ». *Ann. Thorac. Surg.* [En ligne]. juin 2011. Vol. 91, n°6, p. 1780–1790. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2011.03.105> > (consulté le 28 mai 2012)
- [4] KARKOUTI K., MCCLUSKEY S. A., SYED S., PAZARATZ C., POONAWALA H., CROWTHER M. A. « The influence of perioperative coagulation status on postoperative blood loss in complex cardiac surgery: a prospective observational study ». *Anesth. Analg.* [En ligne]. 1 juin 2010. Vol. 110, n°6, p. 1533–1540. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1213/ANE.0b013e3181db7991> > (consulté le 11 avril 2012)
- [5] « Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale ». [s.l.] : [s.n.], [s.d.]. Disponible sur : < <http://legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000021683301&categorieLien=id> >
- [6] *Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 15189: août 2007 (AFNOR).*
- [7] DE REVEL T., DOGHMI K. « Physiologie de l'hémostase ». *EMC-Dentisterie*. 2005. Vol. 1, n°1, p. 71–81.
- [8] ELEDJAM J. J., SCHVED J. F., BONNAFOUX J. « Physiologie de l'hémostase ». *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* [En ligne]. 1985. Vol. 4, n°3, p. 35A–42A. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0750-7658\(85\)80156-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0750-7658(85)80156-8) > (consulté le 27 mai 2012)
- [9] WOLBERG A. S. « Thrombin generation and fibrin clot structure ». *Blood Rev.* [En ligne]. mai 2007. Vol. 21, n°3, p. 131–142. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2006.11.001> > (consulté le 27 mai 2012)
- [10] BELLUCCI S. « Physiologie de l'hémostase primaire ». *EMC (Elsevier SAS, Paris), Hématologie*. 2002. p. 9.
- [11] MCKENZIE S. B., WILLIAMS J. L. *Clinical Laboratory Hematology*. [s.l.] : Pearson, 2009. 942 p. ISBN : 9780135137321.
- [12] ZANDECKI M. *Physiologie de la coagulation* [En ligne]. Disponible sur : < http://med2.univ-angers.fr/discipline/lab_hema/PATHOL2007/HEMOST/h19coagphy.pdf > (consulté le 4 juin 2012)
- [13] HOFFMAN M. « A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa ». *Blood reviews*. 2003. Vol. 17, p. S1–S5.
- [14] MONROE D. M. « What Does It Take to Make the Perfect Clot? ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [En ligne]. 1 janvier 2006. Vol. 26, n°1, p. 41–48. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83> > (consulté le 27 mai 2012)
- [15] HARROIS A., DURANTEAU J. « Le point sur la coagulation — Coagulopathies et syndromes hémorragiques en réanimation ». *Réanimation*. Vol. 20, n°2, p. 583–594.
- [16] GODAL H. C., ABILDGAARD U. « Gelation of Soluble Fibrin in Plasma by Ethanol ». *Scandinavian Journal of Haematology* [En ligne]. 1 décembre 1966. Vol. 3, n°5, p. 342–350. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.1966.tb02378.x> > (consulté le 26 février 2012)

- [17] B L., K W. « Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulphate test. ». *Thrombosis et diathesis haemorrhagica*. novembre 1968. Vol. 20, n°1, p. 44.
- [18] CONARD J., BOGATY-YVER J., SAMAMA M. « [Comparison of 2 tests of paracoagulation. Ethanol test and protamine sulfate test in the diagnosis of intravascular coagulation] ». *Nouv Presse Med*. 21 décembre 1974. Vol. 3, n°44, p. 2639–2641.
- [19] GERRITS W. B., PRAKKE E. M., VAN DER MEER J., VREEKEN J. « Causes of a negative ethanol gelation test in diffuse intravascular coagulation ». *Thromb Diath Haemorrh*. 15 mai 1974. Vol. 31, n°2, p. 299–308.
- [20] LARGO R., HELLER V., STRAUB P. W. « Detection of soluble intermediates of the fibrinogen-fibrin conversion using erythrocytes coated with fibrin monomers ». *Blood*. juin 1976. Vol. 47, n°6, p. 991–1002.
- [21] VAN WERSCH J. W. « Adaptation and evaluation of a chromogenic test procedure for fibrin monomers on a centrifugal analyzer ». *J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. mars 1990. Vol. 28, n°3, p. 169–174.
- [22] HAMANO A., TANAKA S., TAKEDA Y., UMEDA M., SAKATA Y. « A novel monoclonal antibody to fibrin monomer and soluble fibrin for the detection of soluble fibrin in plasma ». *Clinica Chimica Acta* [En ligne]. avril 2002. Vol. 318, n°1–2, p. 25–32. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00779-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00779-3) > (consulté le 5 février 2012)
- [23] SOE G., KOHNO I., INUZUKA K., ITOH Y., MATSUDA M. « A monoclonal antibody that recognizes a neo-antigen exposed in the E domain of fibrin monomer complexed with fibrinogen or its derivatives: its application to the measurement of soluble fibrin in plasma ». *Blood*. 15 septembre 1996. Vol. 88, n°6, p. 2109–2117.
- [24] RAHR H. B., DANIELSEN D., ANDERSEN B. S., BORRIS L. C., LASSEN M. R. « Poor correlation between soluble fibrin concentrations measured by two commercially available immunoassays ». *Thrombosis research*. 1996. Vol. 81, n°6, p. 607–614.
- [25] WADA H., KOBAYASHI T., ABE Y., HATADA T., YAMADA N., SUDO A., UCHIDA A., NOBORI T. « Elevated levels of soluble fibrin or D-dimer indicate high risk of thrombosis ». *J. Thromb. Haemost.* [En ligne]. juin 2006. Vol. 4, n°6, p. 1253–1258. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01942.x> > (consulté le 27 mai 2012)
- [26] WADA H., SAKURAGAWA N. « Are fibrin-related markers useful for the diagnosis of thrombosis? ». *Semin. Thromb. Hemost.* [En ligne]. février 2008. Vol. 34, n°1, p. 33–38. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1066021> > (consulté le 27 mai 2012)
- [27] WADA H., SASE T., MATSUMOTO T., KUSHIYA F., SAKAKURA M., MORI Y., NISHIKAWA M., OHNISHI K., NAKATANI K., GABAZZA E. C., SHIKU H., NOBORI T. « Increased soluble fibrin in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation ». *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* juillet 2003. Vol. 9, n°3, p. 233–240.
- [28] DEMPFLÉ C.-E., WURST M., SMOLINSKI M., LORENZ S., OSIKA A., OLENIK D., FIEDLER F., BORGGREFE M. « Use of soluble fibrin antigen instead of D-dimer as fibrin-related marker may enhance the prognostic power of the ISTH overt DIC score ». *Thromb. Haemost.* [En ligne]. avril 2004. Vol. 91, n°4, p. 812–818. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1267/THRO04040812> > (consulté le 27 mai 2012)
- [29] LEROLLE N., BORGEL D., DIEHL J.-L. « Coagulation intravasculaire disséminée en réanimation : physiopathologie, épidémiologie, diagnostic et prise en charge thérapeutique ». *Hématologie*. 1 décembre 2007. Vol. 13, n°6, p. 409–420.
- [30] BOLLAERT P. E., ANNANE D., AUBE H., BEDOS J. P., CARIOU A., DU CHEYRON D., GAINNIER M., GUILLOIS B., HILBERT G., LECOMPTE T., LEGRAS A., LUTUN P. « Coagulations intravasculaires disséminées (CIVD) en réanimation : définition, classification et traitement (à l'exception des cancers et hémopathies malignes) ». *Réanimation* [En ligne]. décembre 2002. Vol. 11, n°8, p. 567–574. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S1624-0693\(02\)00315-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1624-0693(02)00315-8) > (consulté le 27 mai 2012)
- [31] GANDO S., SAITOH D., OGURA H., MAYUMI T., KOSEKI K., IKEDA T., ISHIKURA H., IBA T., UYAMA M., EGUCHI Y., OTHERS. « Disseminated intravascular coagulation (DIC) diagnosed based on the Japanese Association for Acute Medicine criteria is a dependent continuum to overt DIC in patients with sepsis ». *Thrombosis research*. 2009. Vol. 123, n°5, p. 715–718.

- [32] LEVI M., TOH C. H., THACHIL J., WATSON H. G. « Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology ». *Br. J. Haematol.* [En ligne]. avril 2009. Vol. 145, n°1, p. 24–33. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07600.x> > (consulté le 27 mai 2012)
- [33] LEVI M. « Disseminated intravascular coagulation: What's new? ». *Crit Care Clin* [En ligne]. juillet 2005. Vol. 21, n°3, p. 449–467. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2005.02.001> > (consulté le 27 mai 2012)
- [34] ELALAMY I. « Coagulation intravasculaire disséminée ». *EMC (Elsevier SAS, Paris), Hématologie*. 2006.
- [35] TAYLOR F. B. Jr, TOH C. H., HOOTS W. K., WADA H., LEVI M. « Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation ». *Thromb. Haemost.* novembre 2001. Vol. 86, n°5, p. 1327–1330.
- [36] FOURRIER F. « Coagulations intra-vasculaires disséminées ». *STV. Sang thrombose vaisseaux*. 2003. Vol. 15, n°6, p. 333–339.
- [37] HORAN J. T., FRANCIS C. W. « Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation ». *Semin. Thromb. Hemost.* [En ligne]. décembre 2001. Vol. 27, n°6, p. 657–666. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1055/s-2001-18870> > (consulté le 27 mai 2012)
- [38] PARK K.-J., KWON E.-H., KIM H.-J., KIM S.-H. « Evaluation of the diagnostic performance of fibrin monomer in disseminated intravascular coagulation ». *Korean J Lab Med* [En ligne]. juillet 2011. Vol. 31, n°3, p. 143–147. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.3.143> > (consulté le 27 mai 2012)
- [39] DEMPFLER C. E. « The use of soluble fibrin in evaluating the acute and chronic hypercoagulable state ». *Thromb. Haemost.* août 1999. Vol. 82, n°2, p. 673–683.
- [40] WELLS P. S., ANDERSON D. R., RODGER M., FORGIE M., KEARON C., DREYER J., KOVACS G., MITCHELL M., LEWANDOWSKI B., KOVACS M. J. « Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis ». *N. Engl. J. Med.* [En ligne]. 25 septembre 2003. Vol. 349, n°13, p. 1227–1235. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa023153> > (consulté le 27 mai 2012)
- [41] ONISHI H., KANIYU K., IWASHITA M., TANAKA A., WATANABE T. « Fibrin monomer complex in normal pregnant women: a potential thrombotic marker in pregnancy ». *Ann. Clin. Biochem.* [En ligne]. septembre 2007. Vol. 44, n°Pt 5, p. 449–454. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1258/000456307781646076> > (consulté le 30 janvier 2012)
- [42] JANVIER G., LEHOT J.-J. *Circulation extracorporelle: principes et pratique*. [s.l.] : Arnette, 2004. 684 p.ISBN : 9782718410791.
- [43] GRAVLEE G. P. *Cardiopulmonary Bypass: Principles And Practice*. [s.l.] : Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 808 p.ISBN : 9780781768153.
- [44] CHASSOT P. « Pac - Précis d'anesthésie cardiaque - ». [s.l.] : [s.n.], [s.d.]. Disponible sur : < <http://www.precisdanesthesiecardiaque.ch/index.html> > (consulté le 28 mai 2012)
- [45] COHN L. H. *Cardiac Surgery in the Adult*. [s.l.] : McGraw-Hill Prof Med/Tech, 2007. 1731 p.ISBN : 9780071469135.
- [46] CHOONG C. K., GERRARD C., GOLDSMITH K. A., DUNNINGHAM H., VUYLSTEKE A. « Delayed re-exploration for bleeding after coronary artery bypass surgery results in adverse outcomes ». *European journal of cardio-thoracic surgery*. 2007. Vol. 31, n°5, p. 834–838.
- [47] CHANDLER W. L. « Effects of Hemodilution, Blood Loss, and Consumption on Hemostatic Factor Levels During Cardiopulmonary Bypass ». *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* [En ligne]. août 2005. Vol. 19, n°4, p. 459–467. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1053/j.jvca.2004.11.046> > (consulté le 23 mars 2012)
- [48] BULL B. S., HAY K. L., HERRMANN P. C. « Postoperative bypass bleeding: A bypass-associated dilutional (BAD) coagulopathy? ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2009. Vol. 43, n°3, p. 256–259.

- [49] HALL T. S. « The Pathophysiology of Cardiopulmonary Bypass: The Risks and Benefits of Hemodilution ». *Chest* [En ligne]. 1 avril 1995. Vol. 107, n°4, p. 1125–1133. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1378/chest.107.4.1125> > (consulté le 24 mars 2012)
- [50] JUDE B., BAUTERS A., GAUDRIC J., VINCENTELLI A., DECOENE C., SUSEN S. « Hémostase et hypothermie ». *STV. Sang thrombose vaisseaux*. Vol. 16, n°10, p. 515–519.
- [51] BERT A. A., STEARNS G. T., FENG W., SINGH A. K. « Normothermic cardiopulmonary bypass ». *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* [En ligne]. février 1997. Vol. 11, n°1, p. 91–99. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S1053-0770\(97\)90262-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1053-0770(97)90262-7) > (consulté le 28 mai 2012)
- [52] DE SOMER F., VAN BELLEGHEM Y., CAES F., FRANCOIS K., VAN OVERBEKE H., ARNOUT J., TAEYMANS Y., VAN NOOTEN G. « Tissue factor as the main activator of the coagulation system during cardiopulmonary bypass ». *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1 mai 2002. Vol. 123, n°5, p. 951–958.
- [53] DESPOTIS G. J., AVIDAN M. S., HOGUE JR C. W. « Mechanisms and attenuation of hemostatic activation during extracorporeal circulation ». *The Annals of thoracic surgery*. 2001. Vol. 72, n°5, p. S1821–S1831.
- [54] HARTMANN M., SUCKER C., BOEHM O., KOCH A., LOER S., ZACHAROWSKI K. « Effects of cardiac surgery on hemostasis ». *Transfus Med Rev* [En ligne]. juillet 2006. Vol. 20, n°3, p. 230–241. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2006.03.003> > (consulté le 28 mai 2012)
- [55] TE VELTHUIS H., BAUFRETON C., JANSEN P. G. M., THIJS C. M., HACK C. E., STURK A., WILDEVUUR C. R. H., LOISANCE D. Y. « Heparin coating of extracorporeal circuits inhibits contact activation during cardiac operations ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [En ligne]. juillet 1997. Vol. 114, n°1, p. 117–122. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5223\(97\)70124-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5223(97)70124-7) > (consulté le 28 mai 2012)
- [56] KHALI P. N., ISMAIL M., KALMAR P., VON KNOBELSDORFF G., MARX G. « Activation of fibrinolysis in the pericardial cavity after cardiopulmonary bypass ». *Thrombosis and haemostasis*. Vol. 92, n°3, p. 568–574.
- [57] TEOH K. H., YOUNG E., BRADLEY C. A., HIRSH J. « Heparin binding proteins. Contribution to heparin rebound after cardiopulmonary bypass ». *Circulation*. novembre 1993. Vol. 88, n°5 Pt 2, p. II420–425.
- [58] GRAM J., JANETZKO T., JESPERSEN J., BRUHN H. D. « Enhanced effective fibrinolysis following the neutralization of heparin in open heart surgery increases the risk of post-surgical bleeding ». *Thromb. Haemost.* 12 avril 1990. Vol. 63, n°2, p. 241–245.
- [59] TEOH K. H. T., YOUNG E., BLACKALL M. H., ROBERTS R. S., HIRSH J. « Can extra protamine eliminate heparin rebound following cardiopulmonary bypass surgery? ». *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* [En ligne]. août 2004. Vol. 128, n°2, p. 211–219. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.12.023> > (consulté le 28 mai 2012)
- [60] BARSTAD R. M., STEPHENS R. W., HAMERS M. J., SAKARIASSEN K. S. « Protamine sulphate inhibits platelet membrane glycoprotein Ib-von Willebrand factor activity ». *Thromb. Haemost.* février 2000. Vol. 83, n°2, p. 334–337.
- [61] MOCHIZUKI T., OLSON P. J., SZLAM F., RAMSAY J. G., LEVY J. H. « Protamine reversal of heparin affects platelet aggregation and activated clotting time after cardiopulmonary bypass ». *Anesth. Analg.* octobre 1998. Vol. 87, n°4, p. 781–785.
- [62] DESPOTIS G. J., GOODNOUGH L. T. « Management approaches to platelet-related microvascular bleeding in cardiothoracic surgery ». *Ann Thorac Surg*. 1 août 2000. Vol. 70, n°90020, p. S20–32.
- [63] RAY M. J., HAWSON G. A. T., JUST S. J. E., MCLACHLAN G., O'BRIEN M. « Relationship of platelet aggregation to bleeding after cardiopulmonary bypass ». *The Annals of Thoracic Surgery* [En ligne]. avril 1994. Vol. 57, n°4, p. 981–986. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975\(94\)90218-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975(94)90218-6) > (consulté le 28 mai 2012)
- [64] KESTIN A. S., VALERI C. R., KHURI S. F., LOSCALZO J., ELLIS P. A., MACGREGOR H., BIRJINIUK V., OUIMET H., PASCHE B., NELSON M. J. « The platelet function defect of cardiopulmonary bypass ». *Blood*. 1993. Vol. 82, n°1, p. 107–117.

- [65] WEERASINGHE A., TAYLOR K. M. « The platelet in cardiopulmonary bypass ». *Ann Thorac Surg.* 1 décembre 1998. Vol. 66, n°6, p. 2145–2152.
- [66] HARKER L. A., MALPASS T. W., BRANSON H. E., HESSEL E. A. 2nd, SLICHTER S. J. « Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: acquired transient platelet dysfunction associated with selective alpha-granule release ». *Blood.* novembre 1980. Vol. 56, n°5, p. 824–834.
- [67] EDMUNDS L. H., COLMAN R. W. « Thrombin During Cardiopulmonary Bypass ». *The Annals of Thoracic Surgery* [En ligne]. décembre 2006. Vol. 82, n°6, p. 2315–2322. Disponible sur: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2006.06.072> > (consulté le 28 mai 2012)
- [68] HUNT B. J., PARRATT R. N., SEGAL H. C., SHEIKH S., KALLIS P., YACOUB M. « Activation of coagulation and fibrinolysis during cardiothoracic operations ». *The Annals of thoracic surgery.* 1998. Vol. 65, n°3, p. 712–718.
- [69] GELB A. B., ROTH R. L., LEVIN J., LONDON M. J., NOALL R. A., HAUCK W. W., CLOUTIER M., VERRIER E., MANAGANO D. T. « Changes in blood coagulation during and following cardiopulmonary bypass: Lack of correlation with clinical bleeding ». *American journal of clinical pathology.* Vol. 106, n°1, p. 87–99.
- [70] CHANDLER W. L., VELAN T. « Estimating the Rate of Thrombin and Fibrin Generation in Vivo During Cardiopulmonary Bypass ». *Blood* [En ligne]. 6 janvier 2003. Vol. 101, n°11, p. 4355–4362. Disponible sur: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-08-2400> > (consulté le 25 mars 2012)
- [71] SOLOMON C., RAHE-MEYER N., SØRENSEN B. « Fibrin formation is more impaired than thrombin generation and platelets immediately following cardiac surgery ». *Thrombosis research.* 2011.
- [72] LEVY J. H., TANAKA K. A. « Inflammatory response to cardiopulmonary bypass ». *The Annals of thoracic surgery.* 2003. Vol. 75, n°2, p. S715–S720.
- [73] VALEN G., ERIKSSON E., RISBERG B., VAAGE J. « Fibrinolysis during cardiac surgery. Release of tissue plasminogen activator in arterial and coronary sinus blood ». *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994. Vol. 8, n°6, p. 324–330.
- [74] RAY M., MARSH N., HAWSON G. « Relationship of fibrinolysis and platelet function to bleeding after cardiopulmonary bypass ». *Blood coagulation & fibrinolysis.* 1994. Vol. 5, n°5, p. 679.
- [75] BEVAN D. H. « Cardiac bypass haemostasis: putting blood through the mill ». *British Journal of Haematology* [En ligne]. 25 décembre 2001. Vol. 104, n°2, p. 208–219. Disponible sur: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01182.x> > (consulté le 28 mai 2012)
- [76] KUEPPER F., DANGAS G., MUELLER-CHORUS A., KULKA P. M., ZENZ M., WIEBALCK A. « Fibrinolytic activity and bleeding after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass and low-dose aprotinin therapy ». *Blood Coagul. Fibrinolysis* [En ligne]. février 2003. Vol. 14, n°2, p. 147–153. Disponible sur: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.mbc.0000046186.72384.be> > (consulté le 28 mars 2012)
- [77] GABRIEL D. A., MUGA K., BOOTHROYD E. M. « The Effect of Fibrin Structure on Fibrinolysis. ». *J. Biol. Chem.* 12 mai 1992. Vol. 267, n°34, p. 24259–24263.
- [78] MENGISTU A. M., RÖHM K. D., BOLDT J., MAYER J., SUTTNER S. W., PIPER S. N. « The influence of aprotinin and tranexamic acid on platelet function and postoperative blood loss in cardiac surgery ». *Anesth. Analg.* [En ligne]. août 2008. Vol. 107, n°2, p. 391–397. Disponible sur: < <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e31817b7732> > (consulté le 28 mai 2012)
- [79] SZEFFNER J. « Preventing and managing postoperative bleeding in cardiac surgery by controlling disseminated intravascular coagulation ». *European Journal of Anaesthesiology* [En ligne]. 9 juillet 2007. Vol. 24, n°S40, p. 59. Disponible sur: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0265021507000658> > (consulté le 28 mai 2012)
- [80] SHORE-LESSERSON L. « Monitoring anticoagulation and hemostasis in cardiac surgery ». *Anesthesiol Clin North America.* septembre 2003. Vol. 21, n°3, p. 511–526.
- [81] DESPOTIS G. J., HOGUE C. W. « Pathophysiology, prevention, and treatment of bleeding after cardiac surgery: a primer for cardiologists and an update for the cardiothoracic team ». *American Journal of Cardiology.* 18 février 1999. Vol. 83, n°4, p. 15–30.

- [82] BIANCARI F., MIKKOLA R., HEIKKINEN J., LAHTINEN J., AIRAKSINEN K. E. J., JUVONEN T. « Estimating the risk of complications related to re-exploration for bleeding after adult cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis ». *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* [En ligne]. juin 2011. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcts.2011.04.023> > (consulté le 28 mai 2012)
- [83] MOULTON M. J., CRESWELL L. L., MACKEY M. E., COX J. L., ROSENBLOOM M. « Reexploration for bleeding is a risk factor for adverse outcomes after cardiac operations ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [En ligne]. mai 1996. Vol. 111, n°5, p.1037–1046. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5223\(96\)70380-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5223(96)70380-X) > (consulté le 28 mai 2012)
- [84] PELLETIER M. P., SOLYMOSS S., LEE A., CHIU R. C.-J. « Negative Reexploration for Cardiac Postoperative Bleeding: Can It Be Therapeutic? ». *Ann Thorac Surg*. 1 avril 1998. Vol. 65, n°4, p. 999–1002.
- [85] SAMPOL J. *Manuel d'hémostase*. [s.l.] : Elsevier, 1995. 772 p.ISBN : 9782906077737.
- [86] TRZECIAK C., DENNINGER M.-H. *L'hémostase en question*. [s.l.] : BioMérieux, 2003. 184 p.ISBN : 9782951496330.
- [87] BLOME M., ISGRO F., KIESSLING A. H., SKURAS J., HAUBELT H., HELLSTERN P., SAGGAU W. « Relationship between factor XIII activity, fibrinogen, haemostasis screening tests and postoperative bleeding in cardiopulmonary bypass surgery ». *Thromb. Haemost.* [En ligne]. juin 2005. Vol. 93, n°6, p. 1101–1107. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1267/THRO05061101> > (consulté le 28 mai 2012)
- [88] KORTE W. « Fibrin monomer and factor XIII: a new concept for unexplained intraoperative coagulopathy ». *Hamostaseologie*. 2006. Vol. 26, p. S30–5.
- [89] KARKOUTI K., MCCLUSKEY S. A., SYED S., PAZARATZ C., POONAWALA H., CROWTHER M. A. « The Influence of Perioperative Coagulation Status on Postoperative Blood Loss in Complex Cardiac Surgery ». *Anesthesia & Analgesia* [En ligne]. juin 2010. Vol. 110, n°6, p. 1533–1540. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1213/ANE.0b013e3181db7991> > (consulté le 28 mai 2012)
- [90] SPAHN D. R., ASMIS L. M. « Excessive Perioperative Bleeding ». *Anesthesiology* [En ligne]. janvier 2009. Vol. PAP,. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181942c65> > (consulté le 28 mai 2012)
- [91] JUDE B., LASNE D., MOUTON C., DE MOERLOOSE P. « Surveillance de l'anticoagulation des circulations extracorporelles par l'héparine non fractionnée : quels sont les problèmes non résolus ? ». *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* [En ligne]. juin 2004. Vol. 23, n°6, p. 589–596. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.annfar.2004.02.047> > (consulté le 28 mai 2012)
- [92] AFNOR. *Analyses de biologie délocalisées (ADBD) - Exigences concernant la qualité et la compétence NF EN ISO 22870: Mai 2006* [En ligne]. 2006. Disponible sur : < <http://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-22870/analyses-de-biologie-delocalisees-adbd-exigences-concernant-la-qualite-et-la-competence/article/789323/fa132759> > (consulté le 28 mai 2012)
- [93] DESPOTIS G. J., GRAVLEE G., FILOS K., LEVY J. « Anticoagulation monitoring during cardiac surgery: a review of current and emerging techniques ». *Anesthesiology*. octobre 1999. Vol. 91, n°4, p. 1122–1151.
- [94] HIRSH J., WARKENTIN T. E., RASCHKE R., GRANGER C., OHMAN E. M., DALEN J. E. « Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety ». *Chest*. novembre 1998. Vol. 114, n°5 Suppl, p. 489S–510S.
- [95] DESPOTIS G. J., SANTORO S. A., SPITZNAGEL E., KATER K. M., BARNES P., COX J. L., LAPPAS D. G. « On-site prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and platelet count. A comparison between whole blood and laboratory assays with coagulation factor analysis in patients presenting for cardiac surgery ». *Anesthesiology*. février 1994. Vol. 80, n°2, p. 338–351.
- [96] LANG T., BAUTERS A., BRAUN S. L., PÖTZSCH B., VON PAPE K.-W., KOLDE H.-J., LAKNER M. « Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry ». *Blood Coagul. Fibrinolysis*. juin 2005. Vol. 16, n°4, p. 301–310.
- [97] SLAUGHTER T. F., SREERAM G., SHARMA A. D., EL-MOALEM H., EAST C. J., GREENBERG C. S. « Reversible shear-mediated platelet dysfunction during cardiac surgery as assessed by the PFA-100 platelet function analyzer ». *Blood Coagul. Fibrinolysis*. mars 2001. Vol. 12, n°2, p. 85–93.

- [98] GURBEL P. A., MAHLA E., TANTRY U. S. « Peri-operative platelet function testing: The potential for reducing ischaemic and bleeding risks ». *Thrombosis and haemostasis*. 2011. Vol. 106, n°2, p. 248.
- [99] ALSTRÖM U., GRANATH F., OLDGREN J., STÅHLE E., TYDÉN H., SIEGBAHN A. « Platelet inhibition assessed with VerifyNow, flow cytometry and PlateletMapping in patients undergoing heart surgery ». *Thromb. Res.* [En ligne]. novembre 2009. Vol. 124, n°5, p. 572–577. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2009.06.024> > (consulté le 28 mai 2012)
- [100] SHORE-LESSERSON L., MANSPEIZER H. E., DEPERIO M., FRANCIS S., VELA-CANTOS F., ERGIN M. A. « Thromboelastography-Guided Transfusion Algorithm Reduces Transfusions in Complex Cardiac Surgery ». *Anesth Analg.* 2 janvier 1999. Vol. 88, n°2, p. 312–312.
- [101] ESSELL J. H., MARTIN T. J., SALINAS J., THOMPSON J. M., SMITH V. C. « Comparison of thromboelastography to bleeding time and standard coagulation tests in patients after cardiopulmonary bypass ». *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* [En ligne]. août 1993. Vol. 7, n°4, p. 410–415. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/1053-0770\(93\)90161-D](http://dx.doi.org/10.1016/1053-0770(93)90161-D) > (consulté le 28 mai 2012)
- [102] MEMBRÉ A., WAHL D., LECOMPTE T., REGNAULT V. « Test de génération de thrombine La thrombinographie: Méthodologie ». *Revue Francophone des Laboratoires* [En ligne]. juin 2007. Vol. 2007, n°393, p. 37–43. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(07\)80263-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(07)80263-2) > (consulté le 28 mai 2012)
- [103] COAKLEY M., HALL J. E., EVANS C., DUFF E., BILLING V., YANG L., MCPHERSON D., STEPHENS E., MACARTNEY N., WILKES A. R., COLLINS P. W. « Assessment of thrombin generation measured before and after cardiopulmonary bypass surgery and its association with postoperative bleeding ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [En ligne]. 27 janvier 2011. Vol. 9, n°2, p. 282–292. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04146.x> > (consulté le 28 mai 2012)
- [104] KARTHIK S., GRAYSON A. D., MCCARRON E. E., PULLAN D. M., DESMOND M. J. « Reexploration for bleeding after coronary artery bypass surgery: risk factors, outcomes, and the effect of time delay ». *Ann. Thorac. Surg.* [En ligne]. août 2004. Vol. 78, n°2, p. 527–534; discussion 534. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2004.02.088> > (consulté le 29 mai 2012)
- [105] SELLMAN M., INTONTI M. A., IVERT T. « Reoperations for bleeding after coronary artery bypass procedures during 25 years ». *Eur J Cardiothorac Surg.* mars 1997. Vol. 11, n°3, p. 521–527.
- [106] OUATTARA A., NICULESCU M., BOCCARA G., LANDI M., VAISSIER E., LÉGER P., RIOU B., GANDJBAKCH I., CORIAT P. « Identification des facteurs prédictifs de transfusion sanguine homologue en chirurgie cardiaque à partir d'une étude observationnelle ». *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* [En ligne]. avril 2003. Vol. 22, n°4, p. 278–283. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0750-7658\(03\)00058-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0750-7658(03)00058-3) > (consulté le 28 mai 2012)
- [107] VUYLSTEKE A., PAGEL C., GERRARD C., REDDY B., NASHEF S., ALDAM P., UTLEY M. « The Papworth Bleeding Risk Score: a stratification scheme for identifying cardiac surgery patients at risk of excessive early postoperative bleeding ». *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2010.
- [108] WOODMAN R. C., HARKER L. A. « Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass ». *Blood*. 1 novembre 1990. Vol. 76, n°9, p. 1680–1697.
- [109] HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ. *Surdosage en AVK situations à risque et accidents hémorragiques. Recommandations* [En ligne]. Disponible sur : < http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2008-09/surdosage_en_avk_situations_a_risque_et_accidents_hemorragiques_-_recommandations_v2.pdf > (consulté le 4 juin 2012)
- [110] RE R., JW J., TA M., DA L. « A prospective study of aspirin's effect on red blood cell loss in cardiac surgery. ». *The Journal of cardiovascular surgery*. février 1991. Vol. 32, n°1, p. 1.
- [111] REICH D. L., PATEL G. C., VELA-CANTOS F., BODIAN C., LANSMAN S. « Aspirin does not increase homologous blood requirements in elective coronary bypass surgery ». *Anesth. Analg.* juillet 1994. Vol. 79, n°1, p. 4–8.
- [112] KUNADIAN B., THORNLEY A. R., TANOS M., DUNNING J. « Should Clopidogrel Be Stopped Prior to Urgent Cardiac Surgery? ». *Interact CardioVasc Thorac Surg* [En ligne]. 10 janvier 2006. Vol. 5, n°5, p. 630–636. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1510/icvts.2006.140038> > (consulté le 29 mai 2012)

- [113] VOROBCSUK A., ARADI D., FARKASFALVI K., HORVÁTH I. G., KOMÓCSI A. « Outcomes of patients receiving clopidogrel prior to cardiac surgery ». *Int. J. Cardiol.* [En ligne]. 5 avril 2012. Vol. 156, n°1, p. 34–40. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.10.034> > (consulté le 29 mai 2012)
- [114] KER K., EDWARDS P., PEREL P., SHAKUR H., ROBERTS I. « Effect of tranexamic acid on surgical bleeding: systematic review and cumulative meta-analysis ». *BMJ* [En ligne]. 20 mai 2012. Vol. 344, n°may17 1, p. e3054–e3054. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.e3054> > (consulté le 29 mai 2012)
- [115] COFFEY A., PITTMAM J., HALBROOK H., FEHRENBACHER J., BECKMAN D., HORMUTH D. « The use of tranexamic acid to reduce postoperative bleeding following cardiac surgery: a double-blind randomized trial ». *Am Surg.* juillet 1995. Vol. 61, n°7, p. 566–568.
- [116] OZIER Y. « L'arrêt de l'aprotinine: pourquoi, comment faire, quelles alternatives? ». *Sang Thrombose Vaisseaux.* 1 février 2009. Vol. 21, n°2, p. 89–94.
- [117] GRAVLEE G. P., ARORA S., LAVENDER S. W., MILLS S. A., HUDSPETH A. S., CORDELL A. R., JAMES R. L., BROCKSCHMIDT J. K., STUART J. J. « Predictive value of blood clotting tests in cardiac surgical patients ». *The Annals of Thoracic Surgery* [En ligne]. juillet 1994. Vol. 58, n°1, p. 216–221. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975\(94\)91103-7](http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975(94)91103-7) > (consulté le 28 mai 2012)
- [118] AFFSAPS. *Transfusion de globules rouges homologues: Produits, Indications, Alternatives.* août 2002.
- [119] AFFSAPS. *Transfusion de plaquettes: produits, indications.* juin 2003.
- [120] AFFSAPS. *Transfusion de plasma frais congelé: produits, indications.* août 2002.
- [121] FERRARIS V. A., BROWN J. R., DESPOTIS G. J., HAMMON J. W., REECE T. B., SAHA S. P., SONG H. K., CLOUGH E. R., SHORE-LESSERSON L. J., GOODNOUGH L. T., MAZER C. D., SHANDER A., STAFFORD-SMITH M., WATERS J., BAKER R. A., DICKINSON T. A., FITZGERALD D. J., LIKOSKY D. S., SHANN K. G. « 2011 update to the Society of Thoracic Surgeons and the Society of Cardiovascular Anesthesiologists blood conservation clinical practice guidelines ». *Ann. Thorac. Surg.* [En ligne]. mars 2011. Vol. 91, n°3, p. 944–982. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2010.11.078> > (consulté le 28 mai 2012)
- [122] FITCH J. C. K., MIRTO G. P., GEARY K. L. B., BYRNE D. W., HINES R. L. « Point-of-Care and Standard Laboratory Coagulation Testing During Cardiovascular Surgery: Balancing Reliability and Timeliness ». *Journal of Clinical Monitoring and Computing* [En ligne]. 1 mai 1999. Vol. 15, n°3, p. 197–204. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1009934804369> > (consulté le 26 mars 2012)
- [123] DESPOTIS G. J., JOIST J. H., GOODNOUGH L. T. « Monitoring of Hemostasis in Cardiac Surgical Patients: Impact of Point-of-Care Testing on Blood Loss and Transfusion Outcomes ». *Clinical Chemistry.* 9 janvier 1997. Vol. 43, n°9, p. 1684–1696.
- [124] AVIDAN M. S., ALCOCK E. L., DA FONSECA J., PONTE J., DESAI J. B., DESPOTIS G. J., HUNT B. J. « Comparison of Structured Use of Routine Laboratory Tests or Near-patient Assessment with Clinical Judgement in the Management of Bleeding After Cardiac Surgery ». *Br. J. Anaesth.* [En ligne]. 2 janvier 2004. Vol. 92, n°2, p. 178–186. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1093/bja/aeh037> > (consulté le 28 mars 2012)
- [125] DORMAN B. H., SPINALE F. G., BAILEY M. K., AATZ J. M., ROY R. C. « Identification of Patients at Risk for Excessive Blood Loss During Coronary Artery Bypass Surgery Thromboelastograph Versus Coagulation Screen ». *Anesth Analg.* 4 janvier 1993. Vol. 76, n°4, p. 694–700.
- [126] NUBRET-LE-CONIAT K., MARTY J. C., CALDERON J., PÉREZ P., PUNTOUS M., JANVIER G. « Plasma frais congelé et apport transfusionnel en chirurgie cardiaque ». *IRBM.* 2009. Vol. 30, p. S31–S34.
- [127] DESPOTIS G. J., JOIST J. H. « Anticoagulation and anticoagulation reversal with cardiac surgery involving cardiopulmonary bypass: an update ». *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* août 1999. Vol. 13, n°4 Suppl 1, p. 18–29; discussion 36–37.
- [128] RAHE-MEYER N., PICHLMAIER M., HAVERICH A., SOLOMON C., WINTERHALTER M., PIEPENBROCK S., TANAKA K. A. « Bleeding management with fibrinogen concentrate targeting a high-normal plasma fibrinogen level: a pilot study ». *Br J Anaesth* [En ligne]. juin 2009. Vol. 102, n°6, p. 785–792. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1093/bja/aep089> >

- [129] SOLOMON C., PICHLMAIER U., SCHOECHL H., HAGL C., RAYMONDOS K., SCHEINICHEN D., KOPPERT W., RAHE-MEYER N. « Recovery of fibrinogen after administration of fibrinogen concentrate to patients with severe bleeding after cardiopulmonary bypass surgery ». *Br J Anaesth* [En ligne]. mai 2010. Vol. 104, n°5, p. 555–562. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1093/bja/aeq058> > (consulté le 29 mai 2012)
- [130] SPAHN D. R., CERNY V., COATS T. J., DURANTEAU J., FERNÁNDEZ-MONDÉJAR E., GORDINI G., STAHEL P. F., HUNT B. J., KOMADINA R., NEUGEBAUER E., OZIER Y., RIDDEZ L., SCHULTZ A., VINCENT J.-L., ROSSAINT R. « Management of bleeding following major trauma: a European guideline ». *Crit Care* [En ligne]. 2007. Vol. 11, n°1, p. R17. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1186/cc5686> >
- [131] DIPROSE P., HERBERTSON M. J., O'SHAUGHNESSY D., GILL R. S. « Activated recombinant factor VII after cardiopulmonary bypass reduces allogeneic transfusion in complex non-coronary cardiac surgery: randomized double-blind placebo-controlled pilot study ». *Br J Anaesth* [En ligne]. novembre 2005. Vol. 95, n°5, p. 596–602. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1093/bja/aei244> > (consulté le 28 mai 2012)
- [132] VINCENT J.-L., ROSSAINT R., RIOU B., OZIER Y., ZIDEMAN D., SPAHN D.-R. « Recommandations européennes pour l'utilisation du facteur VII activé recombinant comme thérapeutique adjuvante du saignement majeur ». *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* [En ligne]. février 2007. Vol. 26, n°2, p. 145–156. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.annfar.2006.10.008> > (consulté le 28 mai 2012)
- [133] GÖDJE O., GALLMEIER U., SCHELIAN M., GRÜNEWALD M., MAIR H. « Coagulation factor XIII reduces postoperative bleeding after coronary surgery with extracorporeal circulation ». *Thorac Cardiovasc Surg* [En ligne]. février 2006. Vol. 54, n°1, p. 26–33. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-872853> > (consulté le 28 mai 2012)
- [134] CHANDLER W. L., PATEL M. A., GRAVELLE L., SOLTOW L. O., LEWIS K., BISHOP P. D., SPIESS B. D. « Factor XIIIa and clot strength after cardiopulmonary bypass ». *Blood Coagul. Fibrinolysis*. mars 2001. Vol. 12, n°2, p. 101–108.
- [135] LEVY J. H., GILL R., NUSSMEIER N. A., OLSEN P. S., ANDERSEN H. F., BOOTH F. V. M., JESPERSEN C. M. « Repletion of factor XIII following cardiopulmonary bypass using a recombinant A-subunit homodimer. A preliminary report ». *Thromb. Haemost.* [En ligne]. octobre 2009. Vol. 102, n°4, p. 765–771. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1160/TH08-12-0826> > (consulté le 1 avril 2012)
- [136] MANNUCCI P. M. « Desmopressin (DDAVP) in the Treatment of Bleeding Disorders: The First 20 Years ». *Blood*. 10 janvier 1997. Vol. 90, n°7, p. 2515–2521.
- [137] ÉCOFFEY C., VIVIAND X., BILLARD V., CAZALAÀ J. ., MOLLIEUX S., SERVIN F., LAXENAIRE M. . « Anesthésie intraveineuse à objectif de concentration (Aivoc) avec le propofol. Évaluation des formations et pratiques au bloc opératoire ». *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* [En ligne]. mars 2001. Vol. 20, n°3, p. 228–245. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0750-7658\(01\)00353-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0750-7658(01)00353-7) > (consulté le 28 mai 2012)
- [138] BILLARD V., CAZALAÀ J. B., SERVIN F., VIVIAND X. « Anesthésie intraveineuse à objectif de concentration ». *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* [En ligne]. 1997. Vol. 16, n°3, p. 250–273. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0750-7658\(97\)86410-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0750-7658(97)86410-6) > (consulté le 28 mai 2012)
- [139] NASHEF S. A., ROQUES F., MICHEL P., GAUDUCHEAU E., LEMESHOW S., SALAMON R. « European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE) ». *Eur J Cardiothorac Surg*. juillet 1999. Vol. 16, n°1, p. 9–13.
- [140] TOURNOYS A., JEANPIERRE E., SAUTERS A., CARON C., ZAWADZKI C. *Dosage des monomères de fibrine en pratique quotidienne*. 2009.
- [141] JO W., PL B., MR H., T G. « A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. ». *Clinical chemistry*. mars 1981. Vol. 27, n°3, p. 493.
- [142] NUTTALL G. A., OLIVER W. C., ERETH M. H., SANTRACH P. J. « Coagulation tests predict bleeding after cardiopulmonary bypass ». *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* décembre 1997. Vol. 11, n°7, p. 815–823.
- [143] AVIDAN M. S. « Comparison of structured use of routine laboratory tests or near-patient assessment with clinical judgement in the management of bleeding after cardiac surgery ». *British Journal of Anaesthesia* [En ligne]. 1 février 2004. Vol. 92, n°2, p. 178–186. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1093/bja/ae037> > (consulté le 28 mai 2012)

[144] COMUNALE M. E., CARR J. M., MOORMAN R. M., ROBERTSON L. K. « Significance of D-dimer concentrations during and after cardiopulmonary bypass ». *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 1996. Vol. 10, n°4, p. 477–481.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
SOMMAIRE	7
ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	14
1. ASPECTS REGLEMENTAIRES DE L'ACCREDITATION.....	15
1.1 Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale	15
1.2 Norme NF EN ISO 15189	16
2. RAPPELS SUR LA PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE [7–10]	17
2.1 Acteurs cellulaires	18
2.1.1 Plaquettes.....	18
2.1.2 Endothélium	19
2.2 Acteurs moléculaires	20
2.2.1 Facteur Von Willebrand	20
2.2.2 Protéines de la coagulation (facteurs et inhibiteurs de la coagulation)	20
2.2.2.1 Facteur tissulaire.....	20
2.2.2.2 Facteurs de la coagulation	20
2.2.2.3 Les inhibiteurs de la coagulation.....	22
2.2.3 Le Plasminogène et ses protéines régulatrices (figure 3).....	24
2.3 Déroulement de l'hémostase primaire.....	24
2.3.1 Adhésion plaquettaire.....	24
2.3.2 Activation plaquettaire	25
2.3.3 Agrégation plaquettaire	25
2.4 Déroulement de la coagulation.....	25
2.4.1 Initiation de la coagulation	27
2.4.2 Formation de thrombine et amplification du phénomène	28
2.4.3 Propagation.....	28
2.4.4 Fibrinoformation (figure 5) [9].....	28
2.4.5 Contrôle du phénomène.....	29
2.5 Déroulement de la fibrinolyse	29

3.	PRESENTATION DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE AUTOMATISE DES MONOMERES DE FIBRINE.....	31
3.1	Précision sur le terme « monomères de fibrine »	31
3.2	Historique du dosage des monomères de fibrine.....	31
3.3	Principe de la méthode de dosage STA [®] Liatest [®] FM.....	32
3.4	Intérêts du dosage quantitatif des monomères de fibrine	33
3.4.1	Coagulation Intravasculaire Disséminée [29–33]	33
3.4.2	Pathologies thrombotiques	36
4.	SAIGNEMENT ET CHIRURGIE CARDIAQUE AVEC CIRCULATION EXTRACORPORELLE	37
4.1	Généralités [42–44]	38
4.1.1	Composition du circuit de CEC.....	39
4.1.2	Déroulement de la circulation extracorporelle	42
4.2	Mécanismes à l'origine du saignement en chirurgie cardiaque.....	44
4.2.1	Origines chirurgicales.....	44
4.2.2	Origines non chirurgicales.....	44
4.3	Prise en charge du saignement postopératoire.....	49
4.3.1	Tests biologiques dans l'évaluation du saignement non chirurgical.....	50
4.3.1.1	Tests conventionnels [85,86].....	50
4.3.1.2	Tests non conventionnels	54
4.3.1.3	Monitoring de l'hémostase au CHU de Limoges	57
4.3.2	Utilisation des tests biologiques conventionnels dans la prise en charge du saignement postopératoire non chirurgical	58
4.3.2.1	Thérapeutiques préventives	58
4.3.2.2	Thérapeutiques curatives	60
	DEUXIEME PARTIE : ETUDES EXPERIMENTALES	65
1.	MATERIELS ET METHODES.....	66
1.1	Etude de vérification de la méthode	66
1.1.1	Matériels.....	66
1.1.2	Méthodes	66
1.2	Etude prospective observationnelle.....	74
1.2.1	Population étudiée	74
1.2.2	Déroulement de l'intervention.....	74
1.2.3	Recueil des données cliniques.....	75
1.2.4	Recueil des données biologiques.....	76
1.2.5	Analyses des données	78
1.2.6	Aspects réglementaires et éthiques.....	79
2.	RESULTATS	80

2.1	Résultats de l'étude de vérification de la méthode.....	80
2.1.1	Etude de fidélité.....	80
2.1.2	Intervalle de mesure	83
2.1.3	Contamination inter-échantillons	84
2.1.4	Stabilité des réactifs.....	84
2.1.5	Interférences	84
2.1.6	Intervalle de référence	85
2.1.7	Comparaison des trois automates	85
2.2	Résultats de l'étude prospective observationnelle.....	88
2.2.1	Analyse des données cliniques générales	88
2.2.2	Analyse des données biologiques générales.....	88
2.2.3	Analyse des résultats en fonction du saignement.....	93
3.	DISCUSSIONS.....	97
3.1	Discussion de l'étude de vérification de la méthode	97
3.1.1	Etude de fidélité.....	97
3.1.2	Contamination inter-échantillons	98
3.1.3	Stabilité des réactifs.....	99
3.1.4	Intervalle de référence	99
3.1.5	Spécificités	99
3.1.6	Comparaison des trois automates	99
3.2	Discussion de l'étude prospective observationnelle.....	100
3.2.1	Cinétique des taux de FM.....	100
3.2.2	Monomères de fibrine et saignement postopératoire	100
3.2.3	Evaluation des autres paramètres biologiques.....	102
	CONCLUSION.....	104
	ANNEXES	107
	BIBLIOGRAPHIE	139
	TABLE DES MATIERES	149
	TABLE DES ILLUSTRATIONS	152
	TABLE DES TABLEAUX.....	153
	TABLE DES ANNEXES.....	154
	SERMENT DE GALIEN	155

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Facteurs de la coagulation, d'après [7].....	21
Figure 2 : Structure d'une molécule de fibrinogène, d'après [11].....	22
Figure 3 : Concept ancien du processus de coagulation, d'après [12].....	26
Figure 4 : Modèle cellulaire de la coagulation, d'après [15]	27
Figure 5 : Etape de la formation de fibrine, d'après [9]	29
Figure 6 : Principales situations cliniques pouvant être associées à une CIVD, d'après [34].....	33
Figure 7 : Schéma simplifié des mécanismes biologiques à l'origine d'une CIVD, d'après [34]	34
Figure 8 : Représentations schématiques de la physiopathologie de la CIVD, d'après [34].....	35
Figure 9 : Représentation schématique du circuit de CEC, d'après [41].....	38
Figure 10 : composition d'un circuit de CEC, d'après [45]	39
Figure 11 : Critères de performance lors d'une vérification/validation de méthode quantitative selon le guide SH GTA 04	68
Figure 12 : Répétabilité de l'automate 3503 des niveaux bas (1) et haut (2).....	81
Figure 13 : Répétabilité de l'automate 2719 des niveaux bas (1) et haut (2).....	81
Figure 14 : Répétabilité de l'automate 2671 des niveau bas (1) et haut (2)	81
Figure 15 : Fidélité intermédiaire de l'automate 3503 des niveaux bas (1) et haut (2).....	82
Figure 16 : Fidélité intermédiaire de l'automate 2719 des niveaux bas (1) et haut (2).....	83
Figure 17 : Fidélité intermédiaire de l'automate 2671 des niveaux bas (1) et haut (2).....	83
Figure 18 : Comparaison des automates 3503 et 2671	86
Figure 19 : Diagramme des différences entre les automates 3503 et 2671.....	86
Figure 20 : Comparaison entre les automates 3503 et 2719	87
Figure 21 : Diagramme des différences entre les automates 3503 et 2719.....	87
Figure 22 : Variations du taux de FM par patients	90
Figure 23 : Variation globale du taux de FM.....	91
Figure 24 : Variations du taux de FM chez les patients réopérés.	93
Figure 25 : Exemple de règles de Westgard [141].....	98

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Définitions courantes du saignement excessif et massif après chirurgie cardiaque, d'après [2].....	49
Tableau II : Limites d'acceptabilité des critères de performance vérifiés sur site	73
Tableau III : Récapitulatif du recueil biologique (étude observationnelle)	76
Tableau IV : Etude de répétabilité des automates STA-R 350, 2719 et 2671	80
Tableau V : Etude de fidélité intermédiaire des automates 3503, 2719 et 2671.....	82
Tableau VI : Test de contamination des automates 3503, 2719 et 2671	84
Tableau VII : Intervalle de référence du test STA [®] Liatest [®] FM	85
Tableau VIII : Comparaison de la méthode entre les automates 3503 et 2671	86
Tableau IX : Comparaison entre les automates 3503 et 2719.....	87
Tableau X : Evolution moyenne des paramètres biologiques le jour de l'intervention	89
Tableau XI : Pourcentage de valeurs de FM positives par bilans.....	90
Tableau XII : Evolution des paramètres biologiques du patient A.....	92
Tableau XIII : Corrélation des taux de FM avec les pertes sanguines.....	93
Tableau XIV : Comparaison des taux de FM entre les patients avec saignement normal et saignement excessif.....	95
Tableau XV : Corrélation entre les taux de FM et les pertes sanguines (patients sans transfusions peropératoires)	95
Tableau XVI : Comparaison des taux de FM entre les patients avec saignement normal et saignement excessif (patients sans transfusions peropératoires)	96

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Score de CIVD du Ministère de la Santé japonais (1) et de la conférence de consensus de la Société de Réanimation de Langue Française (2).....	107
Annexe 2 : Scores de CIVD de l'ISTH.....	108
Annexe 4 : Vérification de méthode du test STA [®] Liatest [®] FM (poster présenté au congrès du GEHT d'octobre 2011)	109
Annexe 4 : Document d'information aux patients (étude observationnelle)	110
Annexe 5 : Formulaire de validation de la méthode STA [®] Liatest [®] FM.....	112
Annexe 6 : Caractéristiques cliniques pré et peropératoires des patients (étude observationnelle) .	135
Annexe 7 : Caractéristiques cliniques postopératoires des patients (étude observationnelle)	136
Annexe 8 : Comparaisons des données cliniques entre les patients avec saignement excessif et saignement normal (étude observationnelle)	137
Annexe 9 : Comparaisons des données biologiques entre les patients avec saignement excessif et saignement normal (étude observationnelle)	138

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.