

AGREGOMETRIE OPTIQUE POUR L'EXPLORATION DES FONCTIONS PLAQUETTAIRES : SYNTHÈSE DES RECOMMANDATIONS ET PROPOSITIONS POUR L'ACCREDITATION DES EXAMENS

Alain Stépanian¹, Florence Fischer², Claire Flaujac³, Valérie Eschwège⁴, Céline Delassaseigne⁵, Léna Leflem⁶, Frédéric Loridon⁷, Sophie Voisin⁸, Dominique Lasne⁹
S. Voisin et D. Lasne ont contribué de manière équivalente à la rédaction de ces propositions

1. Service d'hématologie biologique, Hôpital Lariboisière, Institut de Recherche Saint-Louis, Université de Paris, AP-HP Nord-Université de Paris, EA 3518, 75010 Paris, France
2. Laboratoire d'hématologie, CHU de Nice, France
3. Laboratoire d'hématologie, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France
4. Service d'hématologie hémostase, CHU de Nancy, France
5. Laboratoire d'hématologie, CHU de Bordeaux, France
6. Laboratoire Eurofins, Ivry-sur-Seine, France
7. Laboratoire de biologie médicale Notre-Dame, Thionville, France
8. Laboratoire d'hématologie, CHU de Toulouse, France
9. Laboratoire d'hématologie générale, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, AP-HP, 75015 Paris, France

Groupe de relecture

- Marie Christine Alessi, Laboratoire d'hématologie, Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, Marseille, France
- Anne Bauters, CHU Lille, Institut d'Hématologie Transfusion, Lille, 59000, France
- Amy Dericquebourg, Service d'Hématologie Biologique, Groupement Hospitalier Est, Lyon
- Mathieu Fiore, Laboratoire d'hématologie, Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, CHU de Bordeaux, Pessac
- Marc Fouassier, Service d'Hématologie Biologique, Hôtel Dieu, CHU de Nantes, Nantes, France
- Marie Françoise Hurtaud, Laboratoire d'hématologie, Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris, France
- Thomas Lecompte, Faculté de médecine, Université de Lorraine & Université de Namur, Department of Pharmacy, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), Namur, Belgium.
- Emmanuel de Maistre, Département de biologie et hématologie, CHU de Dijon, Dijon, France
- François Mullier, Namur Thrombosis and Hemostasis Center (NTHC), CHU UCL Namur, Université catholique de Louvain, Belgique.
- Philippe Nguyen, Département de biologie, CHU Robert Debré, Reims, France
- Claire Pouplard, Service d'Hématologie Hémostase, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, EA 7501, Université François Rabelais, Tours, France
- Caroline Vayne, Service d'Hématologie Hémostase, Hôpital Trousseau, CHU de Tours, EA 7501, Université François Rabelais, Tours, France

Résumé

L'agrégométrie optique est une méthode utilisée pour effectuer différents examens biologiques dont l'exploration des fonctions plaquettaires in vitro, en plasma riche en plaquettes dans un contexte de recherche de thrombopathie. Cette méthode présente des spécificités, résultant essentiellement de la nature de la matrice utilisée, dont il faut tenir compte pour l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. Plusieurs textes de recommandations issues de sociétés savantes ont été publiés afin de mieux standardiser ces examens. Après une enquête de pratiques réalisée auprès des membres du Groupe Français d'études sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT) en 2021, ce texte constitue une synthèse des recommandations en cours et formule 28 propositions, qui couvrent les aspects pré-analytiques, analytiques et post-analytiques pour l'accréditation des examens utilisant l'agrégométrie optique. Ces propositions ont été approuvées par le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires constitutionnelles et par les membres du GFHT après un vote.

Abstract

Light transmission aggregometry (LTA) is a method used for several examinations related to platelet functions in platelet-rich plasma, like the screening for platelet disorders. This method has its own specificities, due the nature of the sample matrix itself, which must be taken into account for the accreditation according to the standard NF EN ISO 15189. A number of guidelines have been published to improve the standardisation of LTA. We first carried out a survey of LTA practice among the members of the Groupe Français d'études sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT) in 2021; after a review of the guidelines, we present in this article 28 proposals, covering pre-analytical, analytical and post-analytical aspects for the accreditation of examinations using the LTA method. These proposals were approved by the Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires Constitutionnelles and the GFHT members after a vote.

Mots clefs

Etude des fonctions plaquettaires, accréditation, agrégométrie optique

Key word

Light transmission aggregometry, accreditation, platelet function study

L'agrégométrie optique est une méthode utilisée pour effectuer différents examens biologiques dont l'exploration des fonctions plaquettaires *in vitro* et la recherche d'anticorps de la thrombopénie induite par l'héparine (TIH). Concernant l'accréditation COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189, ces examens font partie des lignes de portée BM CB05 « Tests fonctionnels pour le diagnostic de TIH » et BM CB06 « Tests plaquettaires (agrégation plaquettaire, sensibilité à la ristocétine, PFA...) » du document COFRAC SH REF 50 (1). Cette méthode présente des spécificités, qui résultent essentiellement de la nature de la matrice utilisée, dont il faut tenir compte pour l'accréditation de ces examens. Des recommandations issues de sociétés savantes ont été publiées afin de mieux standardiser ces examens (2)(3)(4)(5)(6)(7). Après une synthèse des recommandations disponibles, et une enquête de pratique réalisée auprès des membres du GFHT en 2021 (Annexe 1), ce texte émet des propositions en accord avec le Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires constitutionnelles (CRPP), pour l'accréditation des examens utilisant l'agrégométrie optique pour l'étude des fonctions plaquettaires en plasma riche en plaquettes (PRP). Ces propositions ont pour objectif de guider la constitution des dossiers de validation de méthode et sont essentiellement centrées sur l'exploration des fonctions plaquettaires en PRP dans un contexte de recherche de thrombopathie et sur le test RIPA (*Ristocetin-induced platelet aggregation*). Cependant, la plupart de ces propositions peuvent être utilisées pour l'accréditation des autres examens utilisant l'agrégométrie optique. L'agrégométrie optique mesurée par impédance, de même que les spécificités des modules d'agrégométrie optique sur certains analyseurs d'hémostase, ne sont pas abordées dans ce texte. Les points critiques de la méthode à maîtriser concernent le processus pré-analytique, la préparation des agonistes et le processus post-analytique (absence de connexion informatique). Un exemple de SH Form 43 est proposé en Annexe 2.

I/ Besoins cliniques, justification médicale

L'étude de l'agrégométrie optique peut être utile dans des contextes très différents, notamment dans l'exploration des syndromes hémorragiques, en complément de la numération plaquettaire et de l'exploration de la coagulation plasmatique. Dans ce contexte, l'étude de l'agrégométrie optique en PRP permet de dépister un certain nombre de thrombopathies constitutionnelles ou acquises (8)(9).

L'agrégométrie optique peut également être utilisée pour le diagnostic de TIH, pathologie au cours de laquelle apparaissent des anticorps spécifiques (dirigés contre des complexes F4P-Héparine) activant les plaquettes en présence d'héparine (10)(11). De façon exceptionnelle,

certaines situations particulières de pathologie vasculaire et thrombotique justifient d'évaluer l'effet sur la fonction plaquettaire des médicaments antiplaquettaires (12)(13)(14).

Quel que soit le contexte de prescription, la maîtrise du processus pré-analytique est essentielle, les difficultés de prélèvement pouvant conduire à des interprétations erronées. C'est la raison pour laquelle, les indications doivent être évaluées avec précision et tout particulièrement en pédiatrie.

Actuellement, les examens de biologie médicale utilisant l'agrégométrie optique sont inscrits en France à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM), au référentiel des actes innovants hors nomenclature (RIHN) ou sur la liste complémentaire (LC) selon la répartition suivante :

- Le code NABM 1011 (B100 par agoniste, le nombre maximum de cotation ne peut être supérieur à 5) est appliqué lors de l'étude des fonctions plaquettaires par méthode photométrique dans «l'exploration d'un syndrome hémorragique évocateur d'anomalies des fonctions plaquettaires» (12). Il s'agit d'un examen effectué en plasma riche en plaquettes (PRP) pour l'exploration d'un syndrome hémorragique de type cutanéomuqueux. Si le nombre d'agonistes est supérieur à 5 lors de la poursuite du diagnostic de certaines thrombopathies en accord avec les recommandations du CRPP, alors le code E054 par agoniste s'applique (15). Le code E054 peut également être utilisé pour l'étude de la réponse aux traitements antiplaquettaires. L'exploration des fonctions plaquettaires peut également être complétée, dans certains cas, par l'étude de l'agrégation plaquettaire en plaquettes lavées (code E051) (15) ;

- Ce même code (NABM 1011) est applicable pour le diagnostic de TIH (10)(12) ;

- Le code NABM 0192 (B50) fait référence à la « mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand » par agrégométrie optique (12). Cet examen est effectué en présence de plaquettes « témoins » et de fortes concentrations de ristocétine (≥ 1 mg/mL) pour le diagnostic de maladie de Willebrand. Cette méthode de mesure de l'activité du facteur Willebrand (VWF) est actuellement délaissée, au profit des méthodes automatisées (16) ;

- La RIPA est un examen inscrit sur la liste complémentaire (code E132 ; en attente de l'intégration potentielle au sein de l'acte NABM 1011) de seconde intention, permettant une orientation diagnostique en faveur d'une maladie de Willebrand de type 2B ou d'une maladie de Willebrand de type plaquettaire (15). L'objectif de cet examen est de rechercher une agglutination plaquettaire paradoxale en présence de faibles concentrations de ristocétine, qui conduira au diagnostic de la maladie de Willebrand de

type 2B (hyperaffinité du VWF pour la GPIIb/IIIa) ou à celui de pseudo-Willebrand (maladie de Willebrand de type plaquettaire) (hyperaffinité de la GPIIb/IIIa pour le VWF) (16).

II/ Caractéristiques de l'agrégométrie optique – Revue de la littérature

II.1. Descriptif du test

Le principe de la mesure repose sur la méthode de Born. La transmission d'un faisceau lumineux au travers d'une suspension de plasma riche en plaquettes (PRP) soumis à une agitation à 37°C est enregistrée et comparée avec un plasma pauvre en plaquettes (PPP) autologue. L'activation plaquettaire induite par un agoniste provoque le regroupement des plaquettes en agrégats et s'accompagne d'un éclaircissement progressif du milieu, entraînant une augmentation de la transmission lumineuse (17).

Il est recommandé par l'ISTH d'incuber à 37°C le PRP durant 1 minute avant l'ajout de l'agoniste (5) ; les recommandations anglaises suggèrent 5 minutes (4). Les agonistes doivent être utilisés avec un volume n'excédant pas 10% du volume réactionnel final (4)(5) et ajoutés directement dans le PRP en évitant les dépôts sur les parois des cuvettes (2). La mesure doit être suivie entre 3 et 10 minutes après addition de l'agoniste (4)(5).

II.2. Caractéristiques des analyseurs

Le volume réactionnel doit être suffisamment important pour permettre la transmission du faisceau lumineux à travers le PRP et pour en mesurer ainsi la variation en fonction du temps, matérialisée par une courbe d'agrégométrie optique. Certains fournisseurs proposent des rehausseurs permettant de réduire le volume réactionnel. La température réactionnelle recommandée est de 37°C (5), avec une agitation continue de 1000 rotations par minute (rpm) (5) ou comprise entre 1000 et 1200 rpm (4).

Les principaux dispositifs exclusivement dédiés à l'agrégométrie optique distribués en France en 2022 ainsi que leurs caractéristiques figurent dans le Tableau 1.

Des différences substantielles entre les analyseurs sont mises en évidence, telles que la source lumineuse et les vitesses d'agitation. Il n'existe pas d'étude comparative permettant d'évaluer les conséquences de ces différences. Etant donné les volumes importants d'échantillon nécessaires, variables suivant les analyseurs (180 à 500 µL) et les nombreux réactifs disponibles sur le marché, les études comparatives des analyseurs dans nos laboratoires restent difficiles à effectuer et l'agrégométrie manque toujours de standardisation

analytique. A notre connaissance, aucune étude clinique n'est disponible sur la sensibilité/spécificité des examens effectués en agrégométrie optique pour la recherche des thrombopathies ; ceci entraînera des difficultés d'application de la nouvelle réglementation des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* de l'Union européenne (IVDR) (18).

II.3. Connectique

Etant donné l'absence de connexion entre les agrégomètres et les Systèmes d'Information de Laboratoire (SIL), les résultats doivent être saisis manuellement et donc les dispositions du laboratoire concernant la saisie manuelle des résultats doivent s'appliquer (1).

Tableau 1. Principales caractéristiques techniques des agrégomètres optiques disponibles en France en 2022 (données des fournisseurs).

Fournisseur	BIO/DATA Corporation®	HELENA Laboratories®	LABiTec®	SD MEDICAL®	CHRONO-LOG®
Nom des modèles	PAP-8E	AggRAM	APACT 4004	TA-4V TA-8V	700 490 4+4
Dimensions l x p x h	49 x 55 x 65 cm	15 x 25 x 43 cm	25 x 33 x 14 cm	12 x 39 x 36 cm	36 x 22 x 46 cm 36 x 22 x 38 cm
Poids	18 kg	6,75 kg	5,3 kg	10 kg	8,75 kg par module
Nombre de canaux réactionnels	8	4	4	4 8	4 (modulaire)
Nombre de puits pour les réactifs	2	4	4 dont 1 avec agitation (250-1200 rpm)	-	-
Nombre de puits pour incubation	-	12	2 x 15	8 16	2 - 36,5°C ± 1,0°C
Source lumineuse	UV LED (400-430 nm)	optique laser (650 nm)	LED - (740 nm)	LED-IR	LED
Volume de l'échantillon	225 µL + 25 µL agoniste	250 µL minimum	180 µL à 300 µL	250 µL minimum	400 à 500 µL
Température du puits réactionnel	37°C ± 0,5°C	37°C ± 1°C	37,4°C ± 0,3°C	37°C ± 0,5°C	37°C ± 0,2°C
Echelle de température	32°C - 45°C ajustable	-	-		35,0°C - 39,0°C ajustable (±0,1°C)
Agitation	0 - 1200 rpm réglable	oui	500 - 2000 rpm réglable	1100 ± 50 rpm	0 ou 400 - 1200 rpm (±100 rpm)

Numération plaquettaire (PRP)			30 à 600 G/L	≥ 100 G/L	≥ 50 G/L
Température de stockage				0°C - 40°C	-20°C - 60°C
Température ambiante d'utilisation de l'agrégomètre		15°C - 30°C		19°C - 30°C	15°C - 30°C
Remarques			Ecran tactile Temps de lecture max. 3600 sec		

II.4. Les agonistes plaquettaires – intérêt et utilisation

Une thrombopathie peut être mise en évidence par une réponse plaquettaire anormale à un seul agoniste, mais le plus souvent plusieurs agonistes sont concernés en raison de la mise en jeu de voies de signalisation communes et de l'existence de voies d'amplification (8). Les différentes recommandations proposent donc l'utilisation de plusieurs agonistes, avec parfois des divergences dans leur choix ou dans leur concentration (Tableau 2) (2)(3)(4)(5)(19). Ils peuvent être classés en agonistes de première intention ADP (adénosine diphosphate), épinéphrine ou adrénaline, collagène, acide arachidonique et ristocétine) et de seconde intention (γ -thrombine, TRAPs – PAR-1 SFLLRN et PAR-4 AYPGKF, CRP, U46619, A23187, convulxine) (4).

L'adénosine diphosphate (ADP) est un agoniste physiologique qui possède 2 principaux récepteurs à la surface des plaquettes, P2Y₁ et P2Y₁₂, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux G protéines. Aux faibles concentrations (1 à 2 μ M), l'ADP induit un changement de forme, avec une inversion de la transmission au début de la courbe d'agrégométrie optique, plus ou moins visible en fonction des analyseurs, puis une agrégation réversible impliquant le récepteur P2Y₁/G_q. Les concentrations comprises entre 2 et 4 μ M induisent en général l'apparition d'une double vague, qui résulte de l'activation et de la sécrétion plaquettaires (notamment ADP) par amplification via le récepteur P2Y₁₂/G_i et une agrégation stable et irréversible pour des concentrations \geq 5 μ M. Le *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) recommande de chercher la concentration minimale pouvant induire la seconde vague afin d'évaluer la sécrétion plaquettaire, sauf si celle-ci est explorée par ailleurs (2). Les fortes concentrations (jusqu'à 100 μ M) permettent d'explorer les anomalies de P2Y₁₂ (8).

L'acide arachidonique est rapidement transformé en thromboxane (TXA₂), *via* la cyclo-oxygénase 1 plaquettaire et induit ainsi l'agrégation des plaquettes. Il est habituellement utilisé à des concentrations variant de 0,5 et 1,6 mM. En cas de non réponse, l'exploration peut être complétée dans un second temps avec le U46619, analogue synthétique d'un dérivé du TXA₂ insensible à l'effet antiplaquettaire de l'aspirine, puisqu'il active directement le récepteur du TXA₂ (TP α). Un déficit en TP α induit ainsi une diminution de l'agrégation induite par le U46619 (1 à 3 μ M, corrigé à 10 μ M), mais également par l'acide arachidonique (0,5 à 1,5 mM), le collagène (2 μ g/mL) ou l'ADP et l'absence de double vague en présence d'épinéphrine (8).

Le collagène possède 2 principaux récepteurs à la surface des plaquettes, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (CD49b) et la glycoprotéine VI (GPVI) appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il s'agit d'un réactif particulier, complexe macromoléculaire d'extraction, hétérogène et de quantification difficile, ce qui explique les difficultés persistantes de standardisation. La plupart des recommandations proposent l'utilisation de collagène fibrillaire de type I / issu de tendon équin, à une concentration variant entre 1 et 5 $\mu\text{g/mL}$ (2)(3)(4)(5). Les concentrations comprises entre 1 et 2 $\mu\text{g/mL}$ sont considérées comme faibles et sont sensibles à l'effet antiplaquettaire de l'aspirine, tandis que les concentrations entre 4 et 5 $\mu\text{g/mL}$ sont considérées comme fortes et y sont insensibles. Après un temps de latence, le collagène induit un changement de forme des plaquettes (inversion initiale de la courbe d'agrégométrie optique) qui est plus ou moins visible selon les agrégomètres. En cas de réponse anormale au collagène, l'étude en agrégométrie optique peut être complétée avec des agonistes qui explorent spécifiquement le récepteur GPVI : le Collagen-related peptide (CRP), et/ou et la convulxine, un peptide issu d'un venin de serpent, qui induit la signalisation calcique intraplaquettaire *via* le récepteur GPVI.

La ristocétine (agoniste non physiologique) est un glycopeptide qui permet d'établir un pont moléculaire entre le VWF et la GPIIb plaquettaire. Les fortes concentrations de ristocétine (0,8 à 1,5 mg/mL) induisent une agglutination plaquettaire lorsque l'interaction GPIIb-Willebrand est fonctionnelle. Elle est diminuée ou absente chez les patients atteints de maladie de Willebrand (hors type 2N) ou présentant un syndrome de Bernard et Soulier (déficit plaquettaire quantitatif ou qualitatif en GPIIb). Inversement, les faibles concentrations de ristocétine ($\leq 0,7 \text{ mg/mL}$) n'induisent pas d'agglutination plaquettaire. Celle-ci est présente en cas d'une anomalie gain de fonction observée chez les sujets atteints de maladie de Willebrand de type 2B ou de maladie de Willebrand de type plaquettaire. L'addition de VWF exogène (tests de mélange réalisable avec des plaquettes isolées du plasma) peut aider au diagnostic différentiel dans les deux cas (20)(21). Par ailleurs, cet agoniste sera le seul à entraîner une réponse plaquettaire en l'absence d'agrégométrie optique à proprement parler (thrombasthénie de Glanzmann, anomalies du fibrinogène) (22).

L'épinéphrine (adrénaline) est un agoniste plaquettaire faible, agissant sur les récepteurs $\alpha 2$ adrénergiques et EPHB2 (ephrin transmembrane receptor B2 tyrosine kinases). Dans la littérature l'épinéphrine est utilisée à des concentrations comprises entre 0,5 et 25 μM (3). Elle induit une agrégométrie optique avec une courbe biphasique, mais sans changement de forme initial. Il est à noter qu'une absence de réponse plaquettaire isolée à l'épinéphrine (5 à 10 μM) peut être observée chez certains sujets sains, du fait de la très grande variabilité

interindividuelle du nombre de récepteurs plaquettaires adrénergiques α_2A . A titre d'exemple, 16% des sujets au Japon en possèdent un nombre très faible (23). La concentration de 25 μ M devrait être privilégiée selon l'étude PAPS (19). Le syndrome plaquettaire du Québec, thrombopathie liée à une duplication du gène *PLAU* (Plasminogen Activator Urokinase) entraînant une surexpression de l'uPA (urokinase plasminogen activator), peut être associé à une absence isolée d'agrégométrie optique en présence d'épinéphrine et plusieurs anomalies de l'hémostase, indépendamment du nombre de récepteurs α_2A (3)(24). Par ailleurs, un déficit du récepteur EPHB2 induit un défaut d'agrégation en présence de plusieurs agonistes (collagène, acide arachidonique, U46619) (25). Du fait de la très grande variabilité de la réponse à l'épinéphrine, l'intérêt de son utilisation en pratique courante semble limité.

La thrombine (α thrombine) ne peut techniquement pas être utilisée avec un PRP, puisqu'elle induit la fibrinoformation. En revanche, la γ_2 thrombine est dépourvue de la région permettant la liaison au fibrinogène. Les peptides TRAP (thrombin-receptor activating peptide) dont les plus utilisés sont le TRAP-6 et le TRAP-14, activent le récepteur de la thrombine (PAR-1 – SFLLRN / TFLLRN – ou PAR-4 – AYPGKF). Ils peuvent être utilisés d'emblée, ou en cas de réponse anormale en présence de γ_2 -thrombine.

Enfin plusieurs agonistes permettent d'explorer le signal calcique intraplaquettaire : le ionophore A23187 permet d'explorer la mobilisation calcique intraplaquettaire, *via* plusieurs mécanismes ; le PMA (phorbol, 12-myristate, 13-acétate) active directement la protéine kinase C.

Tableau 2. Principaux agonistes utilisés pour l’exploration des fonctions plaquettaires en agrégométrie optique. Les concentrations finales utilisées sont indiquées en fonction des différents textes de recommandations : CLSI (2), recommandations nord-américaines (USA) (3), anglaises (UK) (4), internationales (ISTH) (5) et CRPP (8).

Agoniste	Cibles	CLSI - 2008	USA - 2010	UK - 2011	ISTH - 2013	CRPP - 2017
ADP	Récepteurs P2Y ₁ , P2Y ₁₂	0,5 - 10 µM Souvent 5 µM	2 - 10 µM	0,5 - 20 µM 2,5 µM initial	2 µM initial	2 µM - 10 µM - 100 µM
Collagène	Récepteurs GPVI, GPIIb/IIIa	type I : 1 à 5 µg/mL Souvent 2 µg/mL initial	type I : 1 à 5 µg/mL Souvent ,2 µg/mL	type I : 1 à 5 µg/mL / 1,25 µg/mL initial	Horm collagen (tendon équin) 2 µg/mL initial	2 µg/mL - 10 µg/mL
Epinéphrine (adrénaline)	Récepteurs α _{2A} ,	0,5 à 10 µM Souvent 5 µM initial	0,5 à 10 µM > 10 µM inutile	0,5 à 10 µM 5 µM initial	5 µM initial	25 µM
Gamma thrombine	Récepteurs PAR-1 et PAR-4,	Concentrations, non précisées *		50 à 200 ng/mL		
TRAP	Récepteurs PAR-1 et PAR-4	Concentrations non précisées		TRAP-6 = SFLLRN (agoniste de PAR-1) 10 à 100 µM / AYPGKF (PAR-4)	10 µM	TRAP-6 10 µM à 50 µM

				100 à 500 µM		
Acide arachidonique	Génération de TXA ₂ , agoniste du récepteur TP α	0,5 - 1,6 mM	0,5 - 1,64 mM	0,5 - 1,0 mM / 1 mM (1 seule concentration proposée)	1 mM initial	1 mM
U46619	Récepteur TP α	1 à 2 µM	1 µM	1 µM / point unique	1 µM	
Ristocétine	Interaction VWF-GPIb	2 concentrations : - Faible : ≤ 0,6 mg/mL - Forte : 0,8 à 1,5 mg/mL	2 concentrations : - Faible : 0,5 ou 0,6 mg/mL - Forte : 1,2 à 1,5 mg/mL	2 concentrations : - Faible : 0,5 à 0,7 mg/mL - Forte : 1,2 à 1,5 mg/mL	1,2 mg/mL initial Si normal : 0,5 à 0,7 mg/mL Si absente : 2 mg/mL	
CRP	Récepteur GPVI			10 à 1000 ng/mL		
Convulxine	Récepteur GPVI			1 à 1000 ng/mL		
Ionophore A23187	Signal calcique, fonction procoagulante			1,25 à 10 µM		
PMA	Protéine kinase C			30 mM		

ADP, adénosine diphosphate ; α_2A , récepteur adrénergique ; CRP, collagen-related peptide ; EPHB2, ephrin transmembrane receptor B2 tyrosine kinases ; PAR, protease activating receptor ; PMA, phorbol,12-myristate,13-acétate ; TP α , récepteur du thromboxane ; TRAP, thrombine-receptor activating peptide, peptides qui activent PAR-1 (SFLLRN ou TFLLRN) ou PAR-4 (AYPGKF) ; TXA₂, thromboxane A₂ ; VWF, facteur Willebrand. * dépend des préparations.

III/ Particularités de l'examen et propositions pour sa maîtrise

III.1 Approche globale, maîtrise des risques et habilitation

III.1.1 Approche globale

L'agrégométrie optique permet d'obtenir pour chaque agoniste des résultats quantitatifs (amplitude maximale d'agrégation, vitesse...) et qualitatif (aspect de la courbe). Etant donné cette particularité, il est possible de considérer les examens effectués en agrégométrie optique comme étant de type quantitatif ou qualitatif. La réponse à la ristocétine (RIPA) est à distinguer des autres agonistes, dans la mesure où elle détermine la présence ou l'absence d'agglutination en présence de fortes et faibles concentrations de ristocétine. L'interprétation de l'examen doit ensuite intégrer l'ensemble des réponses aux différents agonistes.

Proposition 1 Il est proposé que l'agrégométrie optique puisse être accréditée en s'appuyant sur des données quantitatives (par rapport à des valeurs de référence) et/ou qualitatives (aspect des courbes).

Si le laboratoire utilise un système agonistes/analyseur qualifié par le fournisseur, il est possible de réaliser une vérification de méthode en portée flexible standard (A).

Proposition 2

Il est proposé que l'agrégométrie optique puisse être accréditée en portée flexible standard (A) ou en portée flexible étendue (B).

III.1.2 La maîtrise des risques

La liste des risques à maîtriser est présentée dans le SH Form 43 (Annexe 2). Les principaux points critiques de cet examen sont : la connaissance du contexte clinique et thérapeutique pouvant influencer le choix des agonistes et l'interprétation des courbes d'agrégométrie optique ; l'acheminement des prélèvements ; la préparation des réactifs et du PRP ; le délai entre le prélèvement sanguin, et la préparation du PRP d'une part et d'autre part la réalisation des tests d'agrégation ; la saisie manuelle des résultats.

III.1.3 Formation/habilitation des opérateurs

Les différentes recommandations s'accordent sur le fait que ces examens doivent être réservés à des laboratoires spécialisés (3)(5) et que la réalisation et l'interprétation doivent être effectuées par un personnel qualifié et expérimenté (3)(4). Les recommandations britanniques préconisent également une démonstration de cette compétence et de son maintien par la participation par exemple à un programme de contrôle de qualité post-analytique (6).

Les critères d'habilitation, de maintien des compétences et de maintien d'habilitation doivent être définis comme pour tous les autres examens de biologie. Pour les techniciens, l'habilitation doit permettre de vérifier notamment une maîtrise de la préparation du PRP et des réactifs. Il est également possible d'utiliser des PRP résiduels de patients pour vérifier la concordance des résultats entre deux opérateurs. L'utilisation de questionnaires permet de standardiser l'évaluation des connaissances des opérateurs.

Pour les biologistes, une période de revue de prescription et de validation conjointe avec un biologiste habilité et/ou une revue collégiale des résultats peut être proposée pour l'habilitation initiale. La validation simultanée d'un échantillonnage de dossiers par tous les biologistes à fréquence régulière et/ou la participation à un programme d'EEQ post-analytique peut permettre le maintien d'habilitation pour l'interprétation des résultats et la maîtrise de la variabilité interindividuelle.

Proposition 3

La maîtrise de cette méthode par le personnel technique nécessite une formation spécifique. L'habilitation doit se focaliser sur la maîtrise des spécificités pré-analytiques et analytiques de l'agrégométrie optique.

Proposition 4

Le biologiste doit être formé à la revue de prescription et à l'interprétation des résultats, notamment par une période d'exercice conjoint avec un biologiste habilité. L'évaluation de la compétence post-analytique peut être effectuée par la validation simultanée d'une série de dossiers par plusieurs biologistes et/ou par la participation régulière à un programme d'EEQ post-analytique.

III.2 Conditions pré-analytiques

III.2.1 Renseignements cliniques

Afin d'étudier les fonctions plaquettaires par agrégométrie optique pour un diagnostic de thrombopathie, le biologiste doit pouvoir disposer de renseignements cliniques, qui sont habituellement recueillis au sein d'une consultation spécialisée d'hémostase. Dans les thrombopathies, les manifestations hémorragiques sont de type cutanéomuqueux (pétéchies, ecchymoses, ou hémorragies muqueuses par exemple) et l'exploration des fonctions plaquettaires est indiquée après exclusion d'une maladie de Willebrand. Afin de standardiser l'interrogatoire, l'utilisation de scores hémorragiques est encouragée (l'ISTH-BAT – Bleeding Assessment Tool – a été proposé (26)). Les renseignements cliniques comportent les antécédents personnels et familiaux avec le cas échéant, un arbre généalogique (27). L'examen clinique doit également rechercher des signes pouvant évoquer des maladies syndromiques associées à une thrombopénie et parfois à une dysfonction plaquettaire (surdité, atteinte rénale, déficit immunitaire, atteinte neurologique, atteinte osseuse, retard mental, dysmorphie faciale, etc) ; en effet, une thrombopénie modérée peut être associée à des dysfonctions plaquettaires (en présence des mutations *FLI1*, *SLFN14*, par exemple). La prise de substances exogènes pouvant interférer sur les fonctions plaquettaires doit idéalement être recherch e avant le prélèvement par un interrogatoire précis du patient (cf *paragraphe III.2.2*).

Cet examen spécialisé doit dans tous les cas bénéficier d'une revue de prescription préalable afin d'orienter au mieux les examens nécessaires pour le patient, définir le moment adéquat pour sa réalisation (en fonction de l'arrêt de certains médicaments par exemple) et le choix des agonistes, de leur concentration et leur hiérarchisation, surtout si le volume de prélèvement recueilli est faible.

Proposition 5

Il est proposé que les demandes d'examen utilisant l'agrégométrie optique soient effectuées dans un contexte clinique défini et précédées d'une revue de prescription.

III.2.2 Préparation du patient

Il est recommandé d'effectuer les tests d'agrégométrie chez les sujets au repos, afin d'éviter une activation des plaquettes par l'épinéphrine lib r e à la suite d'un exercice physique (4)(5).

Le CLSI et les recommandations anglaises préconisent un prélèvement réalisé à jeun (2)(4). Néanmoins, l'effet d'une collation légère semble négligeable et ne doit pas empêcher la réalisation des examens (5).

Il est recommandé de prélever le patient à distance d'une imbibition tabagique (30 min), d'une prise de caféine (2 heures), ou de tout médicament ou substance pouvant interférer sur les fonctions plaquettaires (2)(4)(5)(9). Pour ce dernier point, le CLSI et les recommandations anglaises proposent une liste de ces substances (2)(4). Un arrêt de 3 ou 10 à 14 jours, si possible est préconisé en fonction du caractère réversible (anti-inflammatoires non stéroïdiens) ou irréversible (aspirine, thiénoxydines) de l'inhibition des fonctions plaquettaires par ces substances (4)(5). Toutes les recommandations convergent sur la nécessité de recueillir ces données chez le patient et si l'examen ne peut être différé de tenir compte de leur présence pour l'interprétation des résultats (2)(3)(4)(5)(8).

Proposition 6

Il est proposé de ne pas réaliser l'étude des fonctions plaquettaires en agrégométrie optique en cas de prise de médicament ou substance pouvant interférer sur les fonctions plaquettaires, ou à défaut de tenir compte de leur présence pour l'interprétation des résultats.

III.2.3 Prélèvement, transport et conservation

L'étude des fonctions plaquettaires par agrégométrie optique est un examen particulièrement sensible à l'étape préanalytique (qualité du prélèvement, délai entre le prélèvement et la réalisation de l'analyse, étape de décantation du PRP, stabilité du PRP après décantation, conditions d'acheminement et préparation de l'échantillon). Le volume de sang à prélever doit tenir compte de l'âge du patient et du contexte clinique pouvant influencer le nombre d'agoniste à utiliser et des volumes de PRP utilisés par l'appareil. Les recommandations publiées en 2013 par l'ISTH (5) précisent que c'est un examen techniquement difficile, qui ne doit être réalisé que dans des laboratoires spécialisés.

Le sang veineux est collecté sur une solution de citrate de sodium tamponnée 109 mM ou 129 mM dans des tubes en plastique (polypropylène) ou en verre siliconé (28). Les recommandations du CLSI sont plus précises ; elles préconisent l'utilisation de citrate 105 à 109 mM (3,2%), ou d'une solution anticoagulante citrate dextrose formule A (ACD-A) qui permet le maintien du pH à 7,2 et excluent les autres anticoagulants, y compris l'ACD qui induit un pH de 6,4 (2). Le diamètre de l'aiguille doit être d'au plus 21 gauge (28). Idéalement, si l'âge du patient et le volume total de prélèvement le permettent, lorsqu'un garrot est utilisé, il doit être retiré dès le début du prélèvement et les 3 à 4 premiers millilitres ne doivent pas être recueillis pour cet examen. Si ces conditions ne peuvent être respectées, l'interprétation devra

en tenir compte et dans ce cas, l'examen permettra uniquement de faire un diagnostic d'exclusion de certaines thrombopathies, par exemple une maladie de Glanzmann.

Proposition 7

Il est proposé que le sang veineux soit collecté sans garrot ou avec un garrot peu serré sur une solution de citrate de sodium tamponnée 109 mM ou 129 mM dans des tubes en plastique (polypropylène) ou en verre siliconé et que le diamètre de l'aiguille soit d'au plus 21 gauge.

Les échantillons primaires (sang total) doivent être maintenus à température ambiante. La centrifugation doit être réalisée après stabilisation des échantillons primaires durant au moins 15 minutes d'après les recommandations de l'ISTH (5). Dans les différents textes de recommandations, le temps compris entre le prélèvement et la réalisation technique des examens doit être compris entre 15 min et 4 heures après le prélèvement (2)(4)(5), mais il n'y a pas eu d'étude rigoureusement menées permettant de supporter ces recommandations. Certaines données indiquent que les tests effectués trop précocement résulteraient en une perte de réponse en présence d'épinéphrine ou en une hyperréactivité en présence d'ADP du fait de la libération d'ADP potentielle après la centrifugation (2). Concernant, la stabilité du PRP avant l'examen, le CLSI précise que les résultats sont légèrement modifiés dès 2 heures, mais sans impact sur l'interprétation jusqu'à 4 heures et modifiés de façon significative après 4 heures (2). Les recommandations de l'ISTH préconisent de mentionner dans le compte-rendu les résultats obtenus plus de 4 heures après le prélèvement (5). La NABM indique que les tests d'agrégométrie optique sont à réaliser dans les 2 heures qui suivent le prélèvement sans citer de référence bibliographique.

Proposition 8

Il est proposé que l'heure de prélèvement soit systématiquement tracée et que les tests d'agrégométrie optique soient réalisés dans les 4 heures qui suivent le prélèvement, et centrifugés après un temps de stabilisation de 15 min des échantillons primaires. Des dispositions particulières peuvent être appliquées dans certains cas si elles sont validées par le laboratoire.

L'hémolyse peut être due à une ponction veineuse non conforme, une agitation excessive des tubes ou une exposition à la chaleur, en dehors d'une hémolyse intrinsèque chez le patient. Elle entraîne non seulement une surestimation de l'absorbance lumineuse du fait de la grande taille des globules rouges mais aussi une libération de nucléotides (purinergiques, dont l'ADP

notamment) qui peuvent activer ou désensibiliser les plaquettes, nécessitant un rejet systématique des prélèvements hémolysés. Le PRP peut également être contaminé par des globules rouges résiduels en cas de centrifugation non conforme, d'utilisation d'un frein ou de contamination durant la décantation du PRP. La présence de leucocytes peut également induire une surestimation de l'absorbance lumineuse. L'hyperlipémie peut interférer avec la turbidimétrie basale de l'échantillon, sans compensation certaine par le plasma pauvre en plaquettes (PPP) du patient (2). Il en est de même pour les prélèvements ictériques : des concentrations de bilirubine $> 34,2 \mu\text{M}$ (2 mg/dL) se traduisent par une diminution de l'intensité maximale de l'agrégométrie optique d'environ 12,5 % variable selon les analyseurs (2). Les recommandations anglaises et le CLSI préconisent de ne pas analyser les prélèvements présentant ces caractéristiques (2)(4). Les recommandations internationales proposent de rejeter uniquement les prélèvements hémolysés et de notifier les autres anomalies (PRP hyperlipémique) (5).

Proposition 9

En cas de prélèvement hémolysé, ictérique ou hyperlipémique, il est proposé de rejeter les prélèvements hémolysés, de notifier les autres anomalies et d'en tenir compte dans l'interprétation.

Les recommandations de 2015 du Groupe Français d'Etude sur l'Hémostase et la thrombose (GFHT) préconisent un acheminement préférentiel par coursier ou de réaliser un essai de qualification spécifique pour cet examen si un acheminement par pneumatique est réalisé (28). Le CLSI proscrit l'utilisation des pneumatiques et préconise un transport des tubes en position verticale et précise que celui-ci doit être effectué à température ambiante (15 à 25°C selon la pharmacopée Européenne) par un coursier (2).

Proposition 10

L'acheminement des prélèvements par pneumatique n'est pas recommandé. Etant donné l'hétérogénéité des systèmes de transport par pneumatique, en cas d'acheminement par pneumatique, il est proposé que le laboratoire effectue impérativement une qualification de ces prélèvements pour l'étude des fonctions plaquettaires en agrégométrie optique.

Etant donné l'importance de la qualité du prélèvement pour l'agrégométrie, les procédures doivent permettre de tracer le délai entre le prélèvement et la réalisation de l'analyse, la durée totale de réalisation des examens et le mode d'acheminement du prélèvement. L'accès à un

centre de prélèvement à proximité du laboratoire, avec des examens effectués sur rendez-vous, permet une meilleure maîtrise des contraintes pré-analytiques.

III.2.4 Préparation et stabilité du PRP et du PPP

Le PRP est préparé après centrifugation entre 170 et 200 g pendant 10 à 15 min à température ambiante sans frein (2)(4)(5). Toutefois, compte-tenu de l'hétérogénéité du freinage des différentes centrifugeuses, si le temps d'arrêt de la centrifugeuse est jugé trop long, l'utilisation d'un freinage à minima peut être validé localement. Le PRP est recueilli sans toucher le culot globulaire, il est transféré dans un tube préalablement identifié (PRP) et le tube doit être bouché. Il est à noter que ce mode de préparation n'est pas adapté en cas de thrombopénie avec plaquettes géantes (2)(5) ; en effet, la centrifugation dans les conditions standards recommandées pour l'obtention du PRP risque d'entraîner la perte des plaquettes géantes. L'ISTH propose dans ce cas d'obtenir le PRP après sédimentation du tube en position verticale de préférence à une inclinaison du tube à 45° (5) ; la sédimentation du primaire incliné à 45°C ne semble cependant pas adaptée. Il est également possible de recueillir le PRP enrichi en macroplaquettes après une première centrifugation du prélèvement 10 min à 65 g, suivie d'une seconde centrifugation à 200 g de la phase cellulaire résiduelle pour recueillir les plaquettes de taille normale (données du groupe non publiées).

Une numération plaquettaire du PRP doit être réalisée. Le compte plaquettaire optimal du PRP pour réaliser l'examen est compris entre 150 et 600 G/L. L'ISTH suggère que les résultats d'agrégométrie optique peuvent être inexacts si la numération plaquettaire est < 150 G/L dans le PRP et indique que la numération plaquettaire ne doit pas être ajustée avant de réaliser les tests d'agrégation jusqu'à 600 G/L : au-delà de cette numération plaquettaire, il n'est pas certain que les résultats soient interprétables ; par ailleurs, la dilution d'un PRP avec un PPP autologue perturbe les fonctions plaquettaires (5). Les recommandations anglaises préconisent de diluer le PRP si la numération plaquettaire est > 600 G/L, mais sans en préciser les modalités (4). Une dilution du PRP avec un PPP autologue peut interférer avec les fonctions plaquettaires (29)(30). Les deux textes précisent également que même en cas de numération plaquettaire basse du PRP, les examens peuvent être réalisés afin d'exclure les principales thrombopathies sévères (thrombasthénie de Glanzmann, syndrome de Bernard et Soulier, maladie de Willebrand de type 2B et maladie de Willebrand de type plaquettaire) (4)(5).

Le PPP est préparé à partir du sang total ou à partir des tubes dans lesquels le PRP a été recueilli, par centrifugation 1500 à 2000 g pendant 15 min ou 2000 à 2500 g pendant au moins 10 min à température ambiante selon les recommandations du GFHT (28).

Proposition 11

Il est proposé d'effectuer la préparation du PRP après une centrifugation à une accélération comprise entre 170 et 200 g, durant 10 à 15 min à température ambiante, sans utilisation de frein, sauf validation locale d'un freinage a minima.

Proposition 12

Il est proposé que la numération plaquettaire du PRP ne soit pas ajustée, si elle est inférieure à 600 G/L. Au-delà de 600 G/L, une dilution du PRP avec un PPP autologue peut interférer avec les fonctions plaquettaires ; compte-tenu de l'absence de recommandations sur les modalités de dilution du PRP, il est proposé de ne pas réaliser l'examen. Dans des situations particulières si l'examen est réalisé, il convient de notifier les conditions de réalisation et d'en tenir compte dans l'interprétation.

Proposition 13

Il est proposé qu'en cas de numération plaquettaire (PRP) < 150 G/L, l'interprétation soit faite avec prudence et en tenant compte des seuils analytiques indiqués par le fournisseur de l'agrégomètre et/ou des agonistes le cas échéant.

III. 3. Les critères de qualité en agrégométrie optique

La norme ISO 15189 précise que les contrôles internes de qualité, ainsi que les comparaisons inter-laboratoires participent à la maîtrise du processus analytique (1). Pour les examens effectués en PRP, étant donné la nature labile de la matrice de l'échantillon et les contraintes pré-analytiques de préparation, il n'existe actuellement pas de contrôle de qualité analytique (interne ou externe) proposé par les industriels ni de méthode de stabilisation d'un PRP (congélation, lyophilisation, ...). La courte durée de stabilité des plaquettes fonctionnelles *in vitro* et les volumes de prélèvement importants nécessaires rendent très difficile la réalisation d'échanges inter-laboratoires, même avec un nombre restreint de participants (6).

La norme ISO 15189 précise que dans ce cas, les laboratoires doivent mettre en œuvre d'autres approches pour objectiver la qualité des résultats. Les différentes recommandations (2)(3)(4)(5)(6) proposent différentes solutions pour y parvenir. L'approche qualitative de l'agrégométrie optique permet de s'affranchir de l'utilisation de CIQ ou EEQ si l'analyse de risque est effectuée correctement et révisée régulièrement et que des études de concordance sont réalisées.

III.3.1 Calibration des canaux de mesure

S'agissant d'une méthode optique, l'établissement des 0 % de transmission (PRP) et 100 % (PPP) des canaux de mesure est un point essentiel, commun à toutes les recommandations (2)(4)(5). Lorsque cela est possible, cette étape doit être effectuée sur chaque canal (certains agrégomètres prennent en compte le 0% effectué sur le premier canal et l'appliquent aux canaux suivants).

Le CLSI suggère que chaque laboratoire procède à :

- Une évaluation de la précision, par exemple en effectuant des mesures dupliquées sur au moins 10 prélèvements et calcul du CV (nature des prélèvements, et limites acceptables non précisées) ;
- Une comparaison entre deux analyseurs et/ou canaux d'un même appareil, mais le CLSI ne donne pas de critères d'interprétation ;
- Une vérification de la linéarité de transmission avec le point 50 % (dilution volume à volume PRP + PPP), dont l'intérêt en pratique reste à vérifier ;
- Une validation, avec des intervalles d'acceptation à définir, de la température au sein des cuvettes et de l'agitation des barreaux aimantés, difficilement applicable à l'échelle du laboratoire mais devant être effectuée par le fournisseur

Proposition 14

Il est proposé d'établir systématiquement des 0 % de transmission (PRP) et 100 % (PPP) pour chaque échantillon étudié.

III.3.2 Contrôles de qualité interne

III.3.2.1 Recours à des « témoins »

Les différentes recommandations suggèrent le recours à des « témoins », notamment dans les cas suivants :

- validation des réactifs (2)(3)(4) ;
- si une réponse anormale est observée chez un patient (2) (3) (4) ou de manière systématique (5), l'étude du PRP d'un sujet normal doit être inclus dans la série ; compte tenu de variabilité interindividuelle de réponse à certains agonistes, cette pratique est sujette à caution ;
- en cas de numération plaquettaire < 150 G/L dans le PRP du patient à tester, utilisation d'un PRP issu de témoin, ajusté de façon à obtenir la même numération

plaquettaire (3)(4). Toutefois, la dilution d'un PRP peut entraîner des résultats erronés, comme indiqué plus haut (29)(30) ;

- l'établissement de valeurs de référence pour les paramètres quantitatifs (2)(3)(4)
– cf. *infra*.

Les recommandations anglaises notent cependant qu'il est concrètement difficile pour la plupart des laboratoires de recourir à des « témoins » pour établir des valeurs usuelles et que l'interprétation des résultats dépend des compétences du biologiste et tient compte de l'aspect des courbes (4). De même, les recommandations Nord-Américaines précisent que certains laboratoires n'ont pas systématiquement recours à des « témoins » (3).

En France, le prélèvement de sujets « témoins » est encadré par l'article L.1221-4 du code de la santé publique (CSP) : « **Le sang, ses composants et leurs dérivés peuvent être distribués et utilisés à des fins de recherche, de contrôle des examens de biologie médicale ou de contrôle des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro, à l'exclusion de toute administration à l'homme, avant l'obtention des résultats des examens biologiques et des tests de dépistage prévus au premier alinéa** » (31). Toutefois, l'article L.1221-3 précise que « *le prélèvement ne peut être fait qu'avec le **consentement du donneur** par un médecin ou sous sa direction et sa responsabilité* ».

Compte tenu des difficultés d'accès à des prélèvements de « témoins » dans le respect de la réglementation, le recours à ces prélèvements doit être réservé aux situations sans autre alternative telle que l'établissement des valeurs de référence. De plus, les échantillons sanguins de sujets « témoins » pour les tests d'agrégométrie optiques destinés à être utilisés comme matériel de contrôle devraient être qualifiés en tant que tel.

Proposition 15

Il est proposé que le recours à des « témoins » (sujets sains prélevés spécifiquement à cette fin, en dehors de toute indication médicale d'exploration d'hémostase) ne soit pas indispensable pour la maîtrise de l'agrégométrie optique. Le cas échéant, il est proposé que le laboratoire se mette en conformité avec les articles L.1221-4 et L.1221-3 CSP.

III.3.2.2 Contrôle de la matrice

La validation de la matrice doit être effectuée en observant des réactions négatives et positives. La réalisation d'un test d'agrégométrie optique en l'absence d'agoniste permet de vérifier l'absence d'agrégation spontanée durant au moins 5 min et constitue un contrôle négatif de la matrice (par exemple après addition de solution de NaCl isotonique dans le PRP à la place de l'agoniste). Inversement, la présence d'agrégométrie optique avec au moins un agoniste peut constituer un contrôle positif de la matrice.

Proposition 16

Pour valider chaque PRP, il est proposé que l'absence d'activation plaquettaire spontanée soit systématiquement vérifiée (absence d'agrégométrie optique en l'absence d'agoniste). Un seuil d'agrégation maximale pour ce contrôle négatif doit être préalablement défini par le laboratoire. De même, il est proposé qu'une agrégation optique soit présente avec au moins un agoniste.

En l'absence de CIQ, les réactifs doivent être contrôlés de façon adaptée à la fréquence des tests réalisés par le laboratoire. Il faut pouvoir observer des agrégations plaquettaires normales, anormales ou absentes pour chaque réactif lors de la qualification et de l'utilisation d'un lot. Les aspects des courbes d'agrégométrie optique doivent également correspondre à celles attendues. Le biologiste doit pouvoir objectiver la conformité des réactifs, en observant les différentes réponses au sein d'une même série et/ou en confrontant plusieurs séries et/ou en utilisant ces mêmes réactifs avec une autre méthode, et/ou en contrôlant une réponse anormale avec un nouveau flacon ou une nouvelle dilution du réactif. Notamment, l'exploration de plusieurs patients le même jour permet de pouvoir observer suffisamment de réponses négatives (ou diminuées) et positives avec le même jeu de réactifs.

Proposition 17

En l'absence de CIQ, le laboratoire doit mettre en place une procédure permettant de s'assurer de la conformité des réactifs basé sur une analyse de risque. Le recours à des échantillons provenant de « témoins » sains ne sera effectué que si le biologiste le juge nécessaire Cf proposition 15.

III.3.2.3 Qualification des réactifs à réception

Cf paragraphe III.4.6

III.3.3 Comparaisons inter-laboratoires

Compte tenu des particularités de la méthode et de la nature de la matrice, les comparaisons inter-laboratoires, telles que préconisées par la norme NF EN ISO 15189, ne sont pas réalisables. L'absence d'EEQ analytique ou d'une matrice stable dans le temps ne permet pas le calcul de la justesse, de l'exactitude ni de l'incertitude de mesure. Seuls des EEQ post-analytique sont proposés, permettant principalement de standardiser les interprétations des résultats.

Proposition 18

En l'absence d'EEQ analytique :

- (i) pour les aspects qualitatifs, il est proposé d'effectuer périodiquement l'analyse de risque et/ou de participer à un EEQ post-analytique ;
- (ii) pour les aspects quantitatifs, le calcul de la justesse, de l'exactitude et de l'incertitude de mesure ne sont pas réalisables.

III.4 Etude des performances

III.4.1 Qualification de l'agrégomètre

En l'absence de matériel de contrôles de qualité (*cf. infra*) et des faibles volumes d'échantillon disponibles, il est difficile de réaliser les études de répétabilité et reproductibilité permettant de déterminer les performances analytiques de la méthode. La littérature fournit quelques données, cependant sans documentation précise et systématique sur les agrégomètres et réactifs. Les coefficients de variation (CV) intra-essais des intensités maximales d'agrégation chez les donneurs sains sont compris entre 6,7 et 11,4% en utilisant les concentrations d'agonistes recommandées par l'*International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) (collagène 2 µg/mL, acide arachidonique 1 mM, ristocétine 1,2 mg/mL et épinéphrine 5 µM) ; les faibles concentrations d'ADP (2 µM) sont associées à des CV supérieurs (17,4%) (7). Des CV inter-essais de l'agrégométrie optique sont disponibles pour l'exploration de la réponse à l'aspirine en présence d'acide arachidonique, les CV de répétabilité rapportés sont compris entre 0,6 et 21,1% et ceux de l'exploration de la réponse au clopidogrel en présence d'ADP sont compris entre 4,3 et 13,4% (32). Par ailleurs, la mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand (VWF:RCo) réalisée en agrégométrie en utilisant des plaquettes lyophilisées présente un CV inter-essai de l'ordre de 20-30% (33). Le CV limite acceptable pour les études de répétabilité n'est donc pas clairement défini dans la littérature ; les données disponibles, ainsi que les CV de répétabilité indiqués par 12 laboratoires Français à la suite de l'enquête de pratique (Annexe 1) nous ont conduit à proposer un CV limite acceptable de 15%.

Les études de répétabilité peuvent être effectuées au moyen du PRP résiduel de patients analysés. En cas de volume insuffisant il est possible de pooler différents PRP (données du groupe non publiées).

Proposition 19

Il est proposé d'effectuer les essais de répétabilité initialement lors de l'acquisition d'un nouvel analyseur sur chaque canal et ultérieurement en cas de doute sur la répétabilité des résultats, à l'aide de mesures répétées (par exemple 5 mesures) avec au moins un agoniste, sur un même canal, en utilisant un même PRP résiduel issu de patients analysés ou de « témoins » prélevés dans le respect de la réglementation. Il est proposé de fixer la limite acceptable de 15% pour le CV aux concentrations d'agonistes usuelles. Il est proposé de ne pas effectuer d'essais de reproductibilité.

Proposition 20

Il est proposé d'effectuer des essais de concordance initialement lors de l'acquisition d'un nouvel analyseur entre les canaux et ultérieurement en cas de doute sur la concordance des canaux, à l'aide de mesures avec au moins un agoniste, en utilisant du PRP résiduel issu de patients analysés ou de « témoins » prélevés dans le respect de la réglementation. Dans ces conditions, une mesure issue de chaque canal est nécessaire. Il est proposé de fixer la limite acceptable de 15% pour le CV aux concentrations d'agonistes usuelles ou une bonne concordance dans l'interprétation qualitative des résultats.

Lors de la qualification initiale d'un agrégomètre ou après une maintenance, les données de conformité vérifiées par le fournisseur à l'installation doivent être analysées (notamment la transmission de la lumière comparable dans les différents canaux). Lors de la qualification initiale, en l'absence d'agrégomètre déjà en service dans le laboratoire, le recours à des « témoins » dans le respect de la réglementation est nécessaire pour les essais de répétabilité.

Proposition 21

En cas de qualification initiale d'un appareil et en l'absence d'autre appareil qualifié existant dans le laboratoire, il est proposé de vérifier les performances à l'aide d'échantillons de « témoins » prélevés dans le respect de la réglementation.

Proposition 22

A l'occasion d'une maintenance préventive ou de panne, en cas de mise à disposition d'un appareil de prêt, il est proposé de vérifier, lorsque c'est possible, la concordance des deux appareils avant l'utilisation.

III.4.2 Sensibilité et spécificité analytiques

Ces paramètres sont difficiles à calculer pour chaque agoniste étant donné la faible prévalence des pathologies concernées et l'absence d'échantillons contrôles. Cependant, trois éléments permettent d'objectiver la conformité des résultats observés :

- La calibration avec le PRP et le PPP du patient pour chaque échantillon testé
- Le CIQ de la matrice : contrôle négatif (absence d'agrégation spontanée) et contrôle positif (réponse plaquettaire avec au moins un agoniste)
- En l'absence de réponse à un agoniste, le technicien doit vérifier la présence du barreau aimanté dans la cuvette.

Proposition 23

Il est proposé qu'en l'absence de réponse isolée à un agoniste, le technicien vérifie la présence du barreau aimanté dans la cuvette puis renouvelle le test.

III.4.3 Limite de détection

La notion de limite de détection n'est pas pertinente pour cette méthode dans le cadre de l'exploration des thrombopathies.

III.4.4 Comparaisons entre deux équipements

Ces essais sont à effectuer si le laboratoire possède plusieurs agrégomètres utilisés indifféremment pour une même indication et lors de l'utilisation d'un autre analyseur permanent ou temporaire lorsque cela est possible. En l'absence de CIQ, il convient de comparer des résultats obtenus avec un même PRP, un même agoniste à la même concentration, en utilisant les PRP résiduels des patients ou le PRP issu de sujets sains, prélevés dans le respect de la réglementation. Le choix du (ou des) agoniste(s) et de leur concentration(s) doit également être effectué par le laboratoire. En l'absence de recommandation concernant les critères de comparaison, en cas d'interprétation quantitative, un biais $\leq 15\%$ peut être retenu. En cas d'interprétation qualitative, une concordance dans l'interprétation des résultats doit être obtenue.

Proposition 24

Si le laboratoire possède plusieurs agrégomètres utilisés indifféremment pour une même indication, il est proposé de vérifier la concordance entre les appareils au minimum lors de la mise en service d'un nouvel agrégomètre. Cette vérification peut être effectuée à l'aide d'échantillons de patients. Il est proposé de réaliser des comparaisons en choisissant des agonistes et des concentrations induisant une forte intensité maximale d'agrégation. Il est proposé un biais limite acceptable de 15 % entre les réponses des agrégomètres, et/ou une concordance dans l'interprétation des résultats.

III.4.5 Interférences

Les essais d'interférence (substances exogènes ou liées à la qualité du PRP, *cf. supra*) ne sont pas réalisables. Un prélèvement ictérique ou lipémique ne constitue pas une non-conformité critique pour l'utilisation du PRP. Seul un prélèvement hémolysé sera non conforme. Ces aspects doivent être signalés au biologiste afin qu'il puisse en tenir compte dans son interprétation (cf proposition 9).

III.4.6 Gestion des lots de réactif

Le laboratoire doit mettre en place un système de traçabilité des lots d'agonistes utilisés, puisque les équipements disponibles n'intègrent pas cette gestion. Il doit également adopter un protocole d'évaluation et de validation d'un nouveau lot de réactif.

Les différents textes de recommandations n'abordent pas cette question de façon détaillée. Le CLSI et les recommandations anglaises suggèrent de tester chaque nouveau lot de réactif parallèlement à l'ancien en utilisant des plaquettes issues de « témoins » (2)(3)(4). Le CLSI précise que le cumul des valeurs obtenues avec les « témoins » peut permettre un suivi de la performance des réactifs (2). L'ISTH recommande à chaque laboratoire de valider les performances des réactifs, sans en préciser les modalités. Les recommandations Nord-Américaines soulignent la difficulté d'obtenir des plaquettes « témoin » et précisent que la validation des réactifs peut être adaptée à l'activité des laboratoires (3). Les recommandations anglaises préconisent de valider un nouveau lot de réactif en comparant les résultats obtenus, parallèlement avec l'ancien lot du même réactif (4).

En l'absence de CIQ, un nouveau lot peut être validé en comparant les résultats obtenus avec ceux du lot en cours, soit en utilisant un PRP résiduel de patient, soit en ayant recours à des prélèvements de « témoins », prélevés dans le respect de la réglementation.

Proposition 25

Il est proposé que la qualification des réactifs (nouvelle livraison ou nouveau lot) soit réalisée en les comparant aux réactifs en cours d'utilisation sur le PRP résiduel des patients ou à partir d'échantillons issus de « témoins » prélevés en accord avec la réglementation. Il est proposé un biais limite acceptable de 15 % entre les résultats obtenus avec les 2 lots et/ou une concordance dans l'interprétation des résultats.

III.5 Post analytique

III.5.1 Expression et interprétation des résultats

Les résultats peuvent être exprimés de façon qualitative (présence ou absence de changement de forme, description de la courbe mono ou biphasique, réversible ou irréversible, ...) et/ou quantitative (agrégation maximale exprimée en pourcentage ou en aire sous la courbe, associée ou non à la vélocité (la pente initiale de la courbe d'agrégation) et à la durée de la phase de latence de l'agrégation en réponse au collagène (cf Proposition 1). Il est également possible de transmettre les tracés d'agrégométrie optique.

Les recommandations ne sont pas très précises en ce qui concerne le compte-rendu des examens utilisant l'agrégométrie optique. Le texte du CLSI est le plus précis à ce propos et préconise de faire figurer sur le compte-rendu : la vélocité (exprimée en pourcentage d'agrégation par unité de temps), la concentration minimale d'agoniste induisant la seconde vague d'agrégation (ADP ou épinéphrine), les pourcentages (amplitudes) final et maximal d'agrégation (2). L'ISTH propose des items pour l'interprétation des résultats (cf. *supra*) et préconise de mettre un commentaire en cas d'échantillon lipémique, ou pour des résultats obtenus plus de 4 heures après le prélèvement (5). Le texte complémentaire des recommandations anglaises suggère d'indiquer des valeurs de référence établies des valeurs quantitatives utilisées (amplitude d'agrégation ou vélocité), plutôt que faire figurer la courbe d'agrégation elle-même et de l'interpréter (6).

III.5.2 Interprétation biologique et étapes post-analytiques

III.5.2.1 Valeurs de référence

Si le mode quantitatif est retenu, le compte-rendu de résultats doit préciser les valeurs de référence. Le nombre de prélèvements nécessaire pour « établir des valeurs de référence » selon le CLSI est de 120, soit un objectif non atteignable en pratique (34). Lorsque des valeurs de références sont déjà disponibles, par exemple dans la littérature, il propose comme

alternative de « vérifier » des valeurs de référence établies dans des conditions rigoureuses sur un effectif de 20 échantillons provenant de « témoins sains » et de les comparer aux données disponibles (2). Les recommandations américaines préconisent la détermination par chaque laboratoire d'intervalles de référence spécifiques de l'amplitude maximale d'agrégation pour chaque concentration d'agoniste testé, à l'aide d'au moins 40 « individus sains « témoins » volontaires », en utilisant des tests statistiques non paramétriques ; elles précisent que ces valeurs de références peuvent être appliquées aux enfants, mais pas aux nouveau-nés (3).

Propositions 26

Il est proposé de définir les valeurs de référence en se basant sur les données bibliographiques, les données des fournisseurs d'analyseurs et de réactifs et si possible une vérification locale en ayant recours à des sujets « témoins » (≥ 20) bien sélectionnés par un interrogatoire médical pour éviter des interférences notamment liées à des prises médicamenteuses et dans le respect de la réglementation.

III.5.2.2 Interprétation des résultats

L'ensemble des recommandations s'accorde sur l'importance de l'interprétation des résultats en agrégométrie par rapport aux données cliniques et thérapeutiques et au reste du bilan biologique. En effet, outre l'indication de l'examen et du contexte clinique (*cf. supra*), les textes s'accordent sur une interprétation des résultats pouvant faire appel à des méthodes complémentaires, comme la cytométrie en flux, l'étude de la sécrétion plaquettaire ou la microscopie électronique (2)(3)(4), voire le génotypage dans certains cas (8). Les résultats pathologiques doivent être confirmés sur un nouvel échantillon avant de poser un diagnostic de thrombopathie.

Les recommandations de l'ISTH et le référentiel du CLSI sont essentiellement centrés sur la méthodologie (2)(5). L'ISTH recommande cependant d'interpréter les tracés d'agrégométrie optique en s'appuyant sur la présence d'un changement de forme, la durée de la phase de latence, la pente initiale de la courbe d'agrégométrie optique, l'amplitude maximale d'agrégation, l'amplitude d'agrégation à la fin de l'enregistrement de la courbe, la présence ou non d'une désagrégation, l'examen visuel des courbes d'agrégation et la présence ou non de double vague d'agrégométrie optique (5).

Les autres textes de recommandations fournissent des éléments plus ou moins détaillés permettant de guider l'interprétation des courbes d'agrégométrie optique par rapport aux

différentes thrombopathies connues. Les recommandations nord-américaines proposent quelques éléments généraux (3). Les recommandations anglaises fournissent un tableau détaillé avec des exemples de courbes par type de pathologie (4). Le CRPP propose un guide pratique d'interprétation en distinguant les thrombopathies d'observation relativement courante, de mécanisme établi, dont le diagnostic peut être précisé par des méthodes complémentaires (cytométrie en flux, microscopie électronique, exploration des composants granulaires, exploration génétique, etc.) et les autres thrombopathies décrites dans la littérature, de mécanisme incertain, avec une description des mécanismes physiopathologiques, des tableaux et des exemples de courbes (7)(8). Par ailleurs, les recommandations anglaises suggèrent de répéter les tests avec un autre prélèvement, parallèlement à un témoin, en cas de résultat anormal (4)(6) et les recommandations nord-américaines suggèrent de considérer les anomalies réduites à un seul agoniste comme étant d'éventuels « faux-positifs » (3).

Enfin, les recommandations anglaises donnent quelques précisions pour la pédiatrie (4). Etant donné le volume minimum nécessaire (20 mL de sang total, réduit en pédiatrie), l'absence de valeurs de référence chez le nourrisson et l'utilisation d'aiguilles habituellement plus fines en néonatalogie (23 gauge), ces recommandations préconisent la réalisation des examens, dans la mesure du possible, à partir de l'âge de 1 an, parallèlement à un témoin adulte, en utilisant les valeurs de référence des adultes et en testant si possible des membres apparentés.

Proposition 27

L'interprétation des résultats est contextualisée ; le compte-rendu doit préciser les agonistes et la concentration utilisés, et contenir une interprétation biologique des résultats et peut comporter des résultats de type quantitatif, qualitatif ou des courbes d'agrégométrie. Tout résultat anormal doit être contrôlé sur un nouvel échantillon en utilisant l'agrégométrie optique et/ou une autre méthode d'exploration des fonctions plaquettaires.

Proposition 28

Il est proposé de ne pas réaliser d'agrégométrie optique pour la recherche de thrombopathie avant l'âge de 1 an. En pédiatrie, il est proposé de tenir compte d'éventuelles difficultés de prélèvement dans l'interprétation biologique.

Conclusions

L'absence de contrôle de qualité analytique pour l'étude des fonctions plaquettaires et les particularités de la matrice de cet examen nécessitent une pratique régulière, ainsi que la mise en œuvre de procédures particulières pour sa maîtrise, qui sont proposées dans ce document. Les évolutions technologiques permettent actuellement de produire des plaquettes *in vitro* (35) qui permettent d'espérer à court terme de disposer d'un contrôle de qualité proche des plaquettes humaines, sous réserve que le coût de production soit raisonnable.

Références

1. COFRAC - Comité français d'accréditation [Internet]. Disponible sur: <https://tools.cofrac.fr/fr/search>
2. Christie DJ. H58AE - Platelet Function Testing by Aggregometry - 1st Edition [Internet]. 2008. Disponible sur: <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h58/>
3. Hayward CPM, Moffat KA, Raby A, Israels S, Plumhoff E, Flynn G, et al. Development of North American Consensus Guidelines for Medical Laboratories That Perform and Interpret Platelet Function Testing Using Light Transmission Aggregometry. *Am J Clin Pathol*. 1 déc 2010;134(6):955-63.
4. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function: Guideline. *Br J Haematol*. oct 2011;155(1):30-44.
5. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. juin 2013;11(6):1183-9.
6. Jennings I, Perry D, Watson H, Alikhan R, Laffan M, Gomez K, et al. Quality assurance and tests of platelet function. *Br J Haematol*. mai 2018;181(4):560-1.
7. Alessi MC, Sié P, Payrastre B. Strengths and Weaknesses of Light Transmission Aggregometry in Diagnosing Hereditary Platelet Function Disorders. *J Clin Med*. 12 mars 2020;9(3):763.
8. Alessi MC, Payrastre B, Sié P. Strengths and weaknesses of platelet aggregation in diagnosis of hereditary platelet disorders. *Hématologie*. sept 2017;23(5):298-311.
9. Ibrahim-Kosta M, Alessi MC, Hezard N. Laboratory Techniques Used to Diagnose Constitutional Platelet Dysfunction. *Hämostaseologie*. nov 2020;40(04):444-59.
10. Lau KKE, Mohammed S, Pasalic L, Favalaro EJ. Laboratory Testing Protocols for Heparin-Induced Thrombocytopenia (HIT) Testing. In: Favalaro EJ, Lippi G, éditeurs. *Hemostasis and Thrombosis* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cité 29 janv 2023]. p. 227-43. (Methods in Molecular Biology; vol. 1646). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7196-1_19
11. Gruel Y, De Maistre E, Pouplard C, Mullier F, Susen S, Rouillet S, et al. Diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia. *Anaesth Crit Care Pain Med*. avr 2020;39(2):291-310.
12. NABM - Table Nationale de codage de Biologie [Internet]. Disponible sur: http://www.codage.ext.cnamts.fr/codif/nabm/index_presentation.php?p_site=AMELI
13. Frelinger AL, Gachet C, Mumford AD, Noris P, Mezzano D, Harrison P, et al. Laboratory monitoring of P2Y12 inhibitors: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. nov 2018;16(11):2341-6.
14. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 7 janv 2019;40(2):87-165.
15. Le référentiel des actes innovants hors nomenclature de biologie et d'anatomopathologie (RIHN) [Internet]. Disponible sur: <https://sante.gouv.fr/systeme-de-sante/innovation-et-recherche/rihn>
16. James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv*. 12 janv 2021;5(1):280-300.
17. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 9 juin 1962;194:927-9.

18. Testa S, Meijer P, Lasne D, Mullier F. Implementation of the new EUR IVD regulation and relation with ISO15189 accreditation: Guidance is urgently required for haemostasis testing. *Int J Lab Hematol.* sept 2022;44(S1):71||8.
19. Alessi, Marie Christine, Ibrahim M, Gresele P, Bacci M, Voisin S, Rivera J, et al. Multicentric evaluation of platelet aggregation reagents: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost.* 2023;sous presse.
20. Frontroth JP, Favalaro EJ. Ristocetin-Induced Platelet Aggregation (RIPA) and RIPA Mixing Studies. In: Favalaro EJ, Lippi G, éditeurs. *Hemostasis and Thrombosis [Internet].* New York, NY: Springer New York; 2017 [cité 29 janv 2023]. p. 473||94. (Methods in Molecular Biology; vol. 1646). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7196-1_35
21. Othman M, Favalaro EJ. 2B von Willebrand disease diagnosis: Considerations reflecting on 2021 multisociety guidelines. *Res Pract Thromb Haemost.* déc 2021;5(8):e12635.
22. Girolami A, Marco L, Virgolini L, Peruffo R, Fabris F. Platelet adhesiveness and aggregation in congenital afibrinogenemia: An investigation of three patients with post-transfusion, cross-correction studies between two of them. *Blut Z Für Gesamte Blutforsch.* févr 1975;30(2):87||100.
23. Kambayashi J ichi, Shinoki N, Nakamura T, Ariyoshi H, Kawasaki T, Sakon M, et al. Prevalence of impaired responsiveness to epinephrine in platelets among Japanese. *Thromb Res.* janv 1996;81(1):85||90.
24. Liang M, Soomro AU, Tasneem S, Abatti LE, Alizada A, Yuan X, et al. Enhancer-gene rewiring in the pathogenesis of Quebec Platelet Disorder. *Blood.* 14 juill 2020;blood.2020005394.
25. Berrou E, Soukaseum C, Favier R, Adam F, Elaib Z, Kauskot A, et al. A mutation of the human EPHB2 gene leads to a major platelet functional defect. *Blood.* 8 nov 2018;132(19):2067||77.
26. Gresele P, Falcinelli E, Bury L, Pecci A, Alessi M, Borhany M, et al. The ISTH bleeding assessment tool as predictor of bleeding events in inherited platelet disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost.* mai 2021;19(5):1364||71.
27. Gresele P, Harrison P, Gachet C, Hayward C, Kenny D, Mezzano D, et al. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* févr 2015;13(2):314||22.
28. Delahousse Bénédicte, Flaujac Claire, Hurtaud-Roux Marie Françoise. *Recommandations pré-analytiques en hémostase (oct 2015 mis à jour 2018) - Groupe Français d'Hémostase et Thrombose.* [Internet]. Disponible sur: <https://site.geht.org/docutheque/>
29. Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica.* 1 mai 2007;92(5):694||7.
30. Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost.* avr 2008;6(4):677||83.
31. Collecte, préparation et conservation du sang, de ses composants et des produits sanguins labiles. (Articles L1221-1 à L1221-14) [Internet]. Code de la santé publique juill 29, 2022. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000022104845
32. Quellec SL, Bordet JC, Negrier C, Dargaud Y. Comparison of current platelet functional tests for the assessment of aspirin and clopidogrel response: A review of the literature. *Thromb Haemost.* 2016;116(10):638||50.

33. Bodó I, Eikenboom J, Montgomery R, Patzke J, Schneppenheim R, Di Paola J, et al. Platelet-dependent von Willebrand factor activity. Nomenclature and methodology: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* JTH. juill 2015;13(7):1345||50.
34. Horowitz Gary L., Altaie S, Boyd James C, Ceriotti Ferruccio, Garg Uttam, Horn Paul, et al. EP28-A3C - Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Third Edition [Internet]. 2008. Disponible sur: <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h58/>
35. Flahou C, Sugimoto N, Eto K. La culture de plaquettes à partir de cellules souches pluripotentes induites. *Bull Académie Natl Médecine*. déc 2020;204(9):961||70.
36. ter Hark Petra. Platelet function disorders - Clinical and Laboratory Aspects [Internet]. ECAT foundation; 2018. Disponible sur: <http://www.ecat.nl/wp-content/uploads/2018/12/ECAT-education-Special-Issue-8-2018-Final.pdf>.

ANNEXE 1 – Expérience pratique : enquête réalisée auprès des membres du GFHT en début d'année 2021.

En 2021, nous avons réalisé un état des lieux concernant l'utilisation de l'agrégométrie optique en France. Nous avons adressé un questionnaire (*via* l'outil de sondage en ligne site SurveyMonkey) aux biologistes des centres hospitaliers universitaires (CHU) et généraux (CHG) par l'intermédiaire de la liste de diffusion du GFHT.

Cinquante-six laboratoires de biologie médicale (LBM) ont participé : 44 (79 %) réalisent des tests d'agrégométrie optique, dont la majorité sont des CHU (79 %), 15 % des CHG et 6 % des LBM privés. Le nombre médian [min-max] annuel d'examens est de 100 [49-1562] pour la recherche de thrombopathie, de 16 [28-400] pour la RIPA et de 2 [0-777] pour l'étude de la réponse aux antiplaquettaires.

La majorité des laboratoires (61 %) dispose d'un seul agrégomètre, 26 % en ont 2 et 12 % en ont au moins 3, utilisés dans toutes les indications. Aucun laboratoire ne dispose d'une connexion entre les agrégomètres et le SIL.

Tous ces LBM reçoivent des échantillons prélevés au sein de l'établissement de soins (ES) dans lequel ils sont situés et dans 45 % des cas, les LABM reçoivent également des prélèvements effectués à l'extérieur de l'ES. Le transport des échantillons prélevés dans l'ES du LBM est effectué par un coursier dans tous les établissements sauf un, qui utilise un transport par pneumatique. Ce système pneumatique a été validé, alors que celui-ci est considéré comme non conforme par tous les autres LBM.

Dans les LBM qui possèdent plusieurs agrégomètres, la comparaison entre les analyseurs a été réalisée en utilisant des échantillons de sujets sains (2/3 des cas) ou de patients (1/3 des cas). Cette comparaison a été faite lors de la mise en place de la méthode (détermination des valeurs de référence) et réitérée le cas échéant lors de la validation de lots de réactifs par exemple.

En l'absence de CIQ analytiques, différentes organisations ont été mises en place : l'exploration le même jour de plusieurs patients pour 40 % des laboratoires ; l'utilisation d'une nouvelle aliquote d'agoniste, lorsqu'un déficit de réponse est observé (exploration d'un seul patient) ; l'interprétation des réponses obtenues avec les autres agonistes, dont au moins une positive ; l'étude d'échantillons de sujets sains est réalisée exceptionnellement, lorsqu'un seul patient est étudié ce jour-là et que les profils d'agrégation sont anormaux.

En ce qui concerne l'origine des échantillons provenant de « témoins » : il s'agit de tubes prélevés sur des donneurs de sang dans le cadre d'une convention avec l'Etablissement Français du Sang (EFS), ou d'agents des ES (le plus souvent du laboratoire). La plupart des laboratoires utilisent ces échantillons exclusivement pour la définition des valeurs de

référence, et d'autres pour vérifier les réactifs ou des résultats d'analyse. Le recours aux échantillons de « témoins » est peu fréquent (souvent moins de 1 fois par mois).

Les résultats de répétabilité fournis par 12 LBM accrédités ont été majoritairement obtenus avec des plasmas de « témoins » (avec l'accord d'un Comité de Protection des personnes (CPP) dans plusieurs cas). Tous les laboratoires ont comparé les intensités d'agrégation maximale et selon les agonistes, la latence et/ou la vélocité. Les CV aux concentrations usuelles d'agonistes (5 μ M d'ADP, 0,8 à 3 μ g/mL de collagène, 1 μ M pour l'acide arachidonique, 5 μ M d'épinéphrine) pour l'intensité maximale d'agrégation sont inférieurs à 10 %.

Cinquante pour cent des LBM utilisent le seul EEQ existant (NASCOLA), lequel évalue l'étape post-analytique et propose une interprétation de courbes d'agrégométrie optique en association avec un contexte clinico-biologique. La moitié des utilisateurs juge ce programme perfectible (saisie des résultats, interface, contextes cliniques succinct voire imprécis, réponses discutables, mal adapté au mode de validation biologique des laboratoires). Néanmoins, certains LBM utilisent cet EEQ pour les habilitations/ maintien d'habilitation des biologistes et/ou des techniciens. Douze laboratoires n'utilisent pas d'EEQ soit par méconnaissance de son existence (75 %), soit parce que le bénéfice jugé comme insuffisant (20 %), soit en raison de son coût (5 %).

Les examens sont effectués en majorité par des techniciens mais également par des biologistes (20 %), des internes 10 % et des ingénieurs (< 10 %). Les critères retenus pour l'habilitation technique concernent les connaissances théoriques (60 % des cas), la préparation de PRP (45 %), des essais de répétabilité (35 %), la technique de pipetage (20 %) ; 30 % des laboratoires proposent d'autres critères d'habilitation.

L'habilitation des biologistes repose le plus souvent sur la participation aux EEQ post-analytiques (65 %), la participation aux visioconférences du CRPP (42 %), des lectures de courbes en aveugle (30 %), la discussion de cas cliniques (40 %). Vingt pourcent des LBM utilisent divers autres critères.

Un tiers des LBM était accrédité pour un ou plusieurs examens utilisant l'agrégométrie optique au moment de l'enquête ; un second tiers était en attente d'expertise par le COFRAC. Les points forts rapportés par les auditeurs du COFRAC concernent le plus souvent le personnel (qualité de la formation, gestion des habilitations, maintien des compétences, étude de variabilité inter-opérateurs), la maîtrise des phases pré-analytique (transport, revue de prescription) et analytiques (local dédié, analyse des risques, expertise). Les difficultés rencontrées par les laboratoires pour mettre en place l'accréditation, sont liées au manque de

temps, au caractère défini comme non prioritaire de l'accréditation de ces examens ou à l'absence de CIQ et d'EEQ analytiques. Les écarts relevés lors des audits portent sur les choix de la portée d'accréditation A ou B, ou la métrologie, malheureusement le questionnaire ne comportait pas d'information sur la portée demandée. Les axes d'amélioration concernent la formalisation des documents.

ANNEXE 2 – Exemple de SH Form 43 en agrégométrie optique. NA : non applicable

Réf NE-PBPS-QUAL-DE-019-02

FICHE TYPE DE VÉRIFICATION (PORTÉE A) / VALIDATION (PORTÉE B) D'UNE MÉTHODE DE BIOLOGIE MÉDICALE

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : Agrégométrie optique
Processus simple ; Processus complexe (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
		Modalités de vérification/validation ¹ :
Sous-processus 1	Éléments à vérifier (argumentation)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Répétabilité 2. Fidélité intermédiaire 3. Variabilité inter-opérateurs (lecture conjointe des courbes) 4. Justesse 5. Exactitude 6. Sensibilité et spécificité analytique 7. Incertitudes (revue périodique de l'analyse de risque) 8. Etendue de mesure 9. Comparaison de méthodes 10. Interférences 11. Contamination 12. Robustesse et fiabilité des réactifs 13. Intervalle de référence

¹ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.
L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

Argumentaire (le cas échéant) : le choix de la portée flexible B se justifie par le fait que différents réactifs agonistes de fabricants différents peuvent être utilisés.

SOUS-PROCESSUS 1 : titre
Portée A ; Portée B (à justifier)

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Agrégométrie optique objectivée par l'agrégation maximale, et/ou la vélocité, et ou l'aire sous la courbe, et dans certains cas le temps de latence
Principe de la Méthode :	<p>- Méthode photo-optique de Born</p> <p>- Lorsqu'un agoniste ou activateur des plaquettes est ajouté à un plasma riche en plaquettes (PRP) sous agitation, les plaquettes s'activent, changent de forme et agrègent.</p> <p>L'agrégomètre, mesure in vitro l'amplitude de l'agrégation par l'augmentation de la transmission lumineuse due au regroupement des plaquettes activées et donc à la diminution de la densité optique du plasma</p>
Type d'échantillon primaire :	Sang à partir duquel est préparé le plasma pauvre en plaquettes (PPP) et le plasma riche en plaquettes (PRP)
Type de récipient, additifs :	Tubes contenant du citrate trisodique 0,109 M (9 vol de sang pour 1 vol de citrate)
Prétraitement de l'échantillon :	<p>-Stabilisation du prélèvement 15 min après la ponction</p> <p>- Préparation du PRP et du PPP : sang total centrifugé 10 minutes à 200 g et récupération du PRP ; puis seconde centrifugation à 2 500 g pendant 10 min et récupération du PPP.</p> <p>- Stabilisation du PRP 15 min avant de démarrer les tests</p> <p>- préciser ce qui est prévu en présence de macroplaquettes</p>
Unités :	<p><u>Mode qualitatif :</u></p> <p>Interprétation qualitative des tracés par agoniste (agrégation diminuée, retardée, etc...) avec conclusion générale d'interprétation du profil d'agrégation (agrégation normale, perturbée...)</p> <p><u>Mode quantitatif :</u> Pourcentages pour l'agrégation maximale, secondes pour la latence, Unités arbitraires pour l(AUC</p>
Critères d'interprétation² :	Mode qualitatif : interprétation globale des tracés obtenus avec le panel d'agonistes (aux différentes concentrations, le cas échéant). Intégration dans l'interprétation des résultats de l'hémogramme. Conclusion globale adaptée au contexte

² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

	clinique. Mode quantitatif : Interprétation en fonction de l'intervalle de référence selon les paramètres quantitatifs retenus pour chaque agoniste et en référence aux tracés d'agrégation. Interprétation selon le contexte clinique et les traitements.
Marquage CE (Oui/Non) :	(Oui/Non)
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Non existant
Equipement (instrument, analyseur, etc.) :	A renseigner
Référence du réactif :	A renseigner pour chaque agoniste avec version notice fournisseur si existante
Matériau d'étalonnage (références) :	NA ou Plasma pauvre en plaquettes (PPP) autologue pour chaque patient
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Etablissement du 0 et du 100 % avec respectivement le PRP et le PPP du patient pour chaque patient

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	identité de l'opérateur
Procédure de validation/mode opératoire :	référence et version de la procédure utilisée
Procédure de gestion de la portée flexible :	référence et version de la procédure utilisée
Période d'étude :	Préciser Du : xx/xx/xx au xx/Xx/xx Préciser si reprise des résultats antérieurs
Date de 1^{ère} utilisation :	préciser xx/xx/xx (mise en route de l'automate)

MAITRISE DES RISQUES				
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
SM	Points critiques	Echelle de criticité ³	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Identité	à renseigner	Formation et information du personnel	Procédure d'identitovigilance du laboratoire
	Préparation du patient	à renseigner	Information des patients et préleveurs	Instructions de prélèvement

³ A adapter selon les échelles utilisées par le laboratoire : impact sur les résultats 1 faible ; 2 : modéré ; 3 élevé. Une échelle combinant Fréquence, Gravité et Détectabilité peut également être utilisée

MAITRISE DES RISQUES				
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité³	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Type de contenants	à renseigner	Formation des préleveurs	Instructions de prélèvement Critères d'acceptation/de refus
	Nature et volume de l'échantillon	à renseigner	Contrôle à réception	
	Délai et température avant traitement analytique	à renseigner	Gestion logistique (navettes, enceintes de transport)	
	Prétraitement : centrifugation, ...	à renseigner	Conditions de centrifugation, ...	Critères de centrifugation
	Interférences	à renseigner	Formation des préleveurs Contrôle à réception	Instruction de formation du personnel
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (t°, ...)	à renseigner	Métrie/suivi des enceintes	Instructions de conservation Enregistrements métrologiques
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)	à renseigner		
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	à renseigner	Conditions environnementales (Statiques et/ou dynamiques dans le temps) Lecture à la lumière du jour	Exigences / manuel d'utilisation du fournisseur Enregistrements des conditions environnementales
	Surveillance des dérives	à renseigner	Périodicité des maintenances Maîtrise des équipements (suivi métrologique, raccordement, ...)	Enregistrements des maintenances Traçabilité métrologique
	Contamination	à renseigner	Respect des conditions opératoires du fournisseur	Bibliographie et/ou enregistrement de l'essai sur site
	Informatique embarquée	à renseigner	Sécurisation de la saisie manuelle des résultats Intégrité des données sur le serveur de résultat	Double saisie ou vérification de saisie Enregistrements des jeux d'essai

MAITRISE DES RISQUES				
(Le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
5M	Points critiques	Echelle de criticité³	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
			Archivage des données	
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	à renseigner	Métrieologie des enceintes (cartographie et suivi des températures)	Fiches fournisseur Traçabilité métrologique
	Gestion des stocks	à renseigner	Qualification des nouveaux lots de réactifs Gestion des stocks	Procédure de gestion des stocks (y compris acceptation à chaque livraison)
	Reconstitution des réactifs, étalons, contrôles	à renseigner	Métrieologie des pipettes Respect du mode opératoire de reconstitution et gestion des stocks (y compris acceptation)	Traçabilité métrologique Instructions de reconstitution
	Agrégomètre de prêt en cas de « maintenance » ou de panne automate	à renseigner	Vérification de l'agrégomètre de prêt	comparaison avec patient étudié le jour même pour quelques agonistes.
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, ...)	à renseigner	Choix des agonistes Choix des concentrations utilisées Connaissance des interférences	Fiches techniques fournisseur de réactifs Données Bibliographiques
	Causes d'incertitude de mesure			
Main d'œuvre (Personnel)	Compétence et maintien de compétence du personnel	à renseigner	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation Disponibilité du personnel pour assurer le respect de la procédure (par exemple tests à lecture subjective)	Enregistrements des compétences du personnel Traçabilité de l'occupation des postes de travail

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : préciser si patients du jour (numéro d'identification) ou témoin sain (numéro d'identification)

REPETABILITE							
Applicable ; non applicable (à justifier)							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁴)	Conclusion ⁵
préciser l'agoniste, la concentration testée et l'unité (agrégation maximale, vélocité, latence, AUC)	Min 5					15%	

CONCORDANCE DES CANAUX							
Applicable ; non applicable (à justifier)							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁴)	Conclusion ⁵
préciser l'agoniste, la concentration testée et l'unité (agrégation maximale, vélocité, latence, AUC)	Cf nombre de canaux de l'agrégomètre					15% Ou concordance des résultats	

Argumentaire de la conclusion :

FIDELITE INTERMEDIAIRE							
Applicable ; non applicable (à justifier)							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁴)	Conclusion ⁵
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)							

Argumentaire de la conclusion : NA : il n'existe pas de CIQ pour l'arégométrie optique. De plus, l'examen devant être effectué sur un échantillon frais, il n'est pas possible de déterminer la fidélité intermédiaire

VARIABILITE INTER-OPERATEURS	
Applicable ; non applicable	
Opérateur évalué 1	Etude conjointe des courbes par les biologistes
Opérateur évalué 2	
...	

Argumentaire de la conclusion : L'étude de la variabilité inter-opérateur est difficile à mettre en œuvre car l'agrégomètre ne peut être utilisé par plusieurs techniciens simultanément et la stabilité du PRP est limitée dans le temps. De plus la préparation de l'échantillon et le recueil du PRP sont des étapes critiques garanties par l'habilitation du personnel. Il n'existe pas d'échantillons contrôle permettant d'évaluer toutes ces étapes. Cette étude nécessiterait de prélever une quantité importante de sang chez les sujets témoins normaux ce qui pose des problèmes règlementaires.

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)								
Applicable ; non applicable (à justifier)								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite⁴	Conclusion⁵
Echantillon CIQ niveau 1								
Echantillon CIQ niveau 2								

Argumentaire de la conclusion : NA car pas de CIQ pour l'arégométrie optique

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)							
Contrôles quantitatifs ; Contrôles qualitatifs							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite⁴	Conclusion⁵
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

Argumentaire de la conclusion : si adhésion à un EEQ post-analytique, décrire l'organisation interne pour l'analyse de cet EEQ : participants (nombre et qualité :tech biol, ingénieur, internes...) ...

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE	
(étude expérimentale indispensable en portée B)	
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)	
Applicable ; non applicable (à justifier)	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP
Faux positifs	
Vrais négatifs	

Faux négatifs	
----------------------	--

Justification : Une étude expérimentale, visant à vérifier la sensibilité et la spécificité au laboratoire n'est pas envisageable étant la faible prévalence des pathologies concernées et l'absence d'échantillons contrôles. La prescription de cet examen est toujours accompagnée de renseignements cliniques et thérapeutiques. Les résultats doivent être confrontés à la symptomatologie hémorragique, et aux autres données cliniques, et aux autres examens réalisés pour l'exploration de l'hémostase primaire comme la mesure du facteur Willebrand, les temps d'occlusion plaquettaire mesurés par le PFA100 ou PFA-200, l'étude des glycoprotéines plaquettaire par cytométrie en flux, l'étude des granules denses...

En cas d'anomalie en réponse à 1 ou plusieurs agonistes, un contrôle est réalisé sur un autre prélèvement éventuellement associé à des examens complémentaires (36).

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :		
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ; calcul		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	Formule utilisée	Référence
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	Niveau 1 en valeur absolue $\pm U$ Niveau 1 en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	Niveau 2 en valeur absolue $\pm U$ Niveau 2 en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	Niveau xxx en valeur absolue $\pm U$ Niveau xxx en valeur absolue $\pm U\%$	Exigences en fidélité, justesse et incertitude

En l'absence de CIQ externalisé ou d'EEQ quantitatifs, ces calculs sont impossibles

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)	
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A)	
Applicable ; non applicable	
Limite de détection :	LD trouvée ou référence bibliographique

Argumentaire de la conclusion : non applicable à cet examen

COMPARAISON DE METHODES :	
Applicable ; non applicable (à justifier)	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	Références méthodes
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	Appareils en miroir : préciser les références des appareils comparés
Nombre de mesures :	minimum = nombre total de canaux
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	Préciser les valeurs minimum et maximum de l'étendue des mesures
Méthode d'exploitation des résultats :	Biais et/ou concordance dans l'interprétation des

	résultats
Equation de la droite de régression :	$Y = ax + b$
Diagramme des différences et/ou des rapports :	Indiquer le nombre de déviants après les avoir vérifiés et documentés

Argumentaire de la conclusion : applicable si plusieurs agrégomètres utilisés pour la même indication. Les critères de comparaison (biais ou concordance) doivent être clairement définis

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable ; non applicable (à justifier)		
Limite de détection :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite de quantification :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)
Limite supérieure de linéarité :	Etude bibliographique (sources et valeurs)	Etude expérimentale (valeurs)

Argumentaire de la conclusion : NA. L'étendue de mesure est définie préalablement pour chaque patient entre 0% et 100%. Il n'est pas possible de définir une limite de détection. Les 0% et 100% sont établis avec respectivement le PRP et le PPP du patient. Le résultat est un résultat fonctionnel dont l'interprétation ne requiert pas une analyse au % près.

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable ; non applicable (à justifier)	
Hémolyse	Le relargage de nucléotides purinergiques dont l'ADP peut activer et désensibiliser les plaquettes et elle peut générer une interférence dans la lecture optique. Les prélèvements hémolysés sont à rejeter ou à interpréter avec précaution
Turbidité	Eviter les repas gras car l'opalescence des échantillons peut interférer sur la lecture optique. Prélèvement à rejeter ou à interpréter avec précaution. Etalonnage avec le PPP du patient. En cas de turbidité ou de bilirubinémie trop importante, étalonnage impossible à effectuer : l'examen ne pourra être réalisé
Bilirubine, ictère	Il n'existe pas de bibliographie sur l'impact de la bilirubine sur l'agrégométrie optique. Ajustement du 100% d'agrégation par l'utilisation du PPP du patient, ce qui permet de s'affranchir de l'effet matrice propre au patient.
Médicaments	Médicaments à action antiplaquettaire. Interrogatoire pour rechercher la prise de ces médicaments avant le prélèvement (37)
Effort physique	L'adrénaline produite lors d'un effort peut provoquer une activation des plaquettes. Repos du patient avant le prélèvement sanguin

Argumentaire de la conclusion :

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ; non applicable (à justifier)	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...) :	Préciser les données fournisseur ou essai de surcharge
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	Préciser les données fournisseur ou essai sur site

Argumentaire de la conclusion : sur l'agrégomètre, utilisation de cuvettes réactionnelles en verre à usage unique et embouts de pipettes jetables pour chaque patient et pour chaque réactif évitant la contamination inter-échantillon. Changement de l'embout de pipette entre chaque réactif évitant la contamination entre réactifs.

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ; non applicable (à justifier)	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	Voir fiches techniques et fiches de stress de chaque réactif
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	A défaut, détailler les essais réalisés localement

Argumentaire de la conclusion :

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable (si méthode quantitative); non applicable	
Valeurs de référence	Préciser les données fournisseur ou essai sur site

Argumentaire de la conclusion :

DECLARATION d'APTITUDE
Conclusion : méthode conforme utilisée à partir du .././.... Autorisée par : Signature