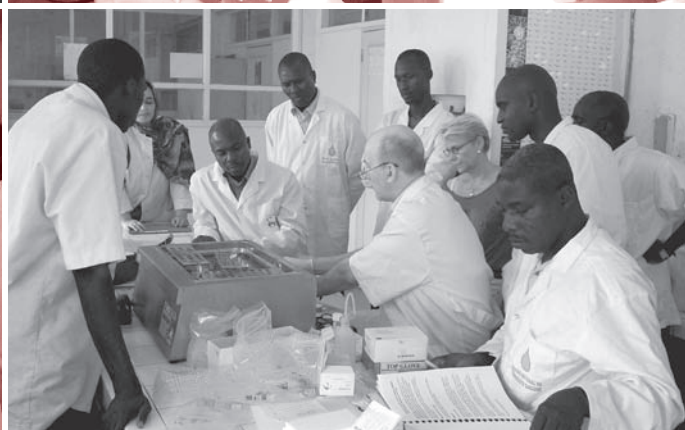


Le diagnostic de l'hémophilie et des autres troubles de coagulation

MANUEL DE LABORATOIRE

Deuxième édition



Steve Kitchen
Angus McCraw
Marión Echenagucia

FÉDÉRATION MONDIALE DE
L'HÉMOFILIE
WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA
FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA
Traitement pour tous



Publié par la Fédération mondiale de l'hémophilie (FMH)

© Fédération mondiale de l'hémophilie, 2010

La FMH encourage la redistribution de ses publications à des fins éducatives par des organismes à but non lucratif qui se consacrent à l'hémophilie et aux troubles de coagulation. Pour obtenir l'autorisation de réimprimer, diffuser ou traduire le présent livret, veuillez contacter le Service des communications à l'adresse ci-dessous.

Cette publication est disponible sur le site Web de la FMH, à www.wfh.org (format PDF). Pour commander d'autres exemplaires imprimés, veuillez communiquer avec nous:

Fédération mondiale de l'hémophilie
1425, boulevard René-Lévesque Ouest, bureau 1010
Montréal (Québec) H3G 1T7
CANADA
Tél. : 514-875-7944

Télec. : 514-875-8916
Courriel : wfh@wfh.org

Le diagnostic de l'hémophilie et des autres troubles de coagulation

MANUEL DE LABORATOIRE

Deuxième édition

Steve Kitchen

Spécialiste en formation
de laboratoire de la FMH
Sheffield Haemophilia
and Thrombosis Centre
Royal Hallamshire
Hospital
Sheffield, U.K.

Angus McCraw

Spécialiste en formation
de laboratoire de la FMH
Katharine Dormandy
Haemophilia Centre and
Thrombosis Unit
The Royal Free Hospital
London, U.K.

Marión Echenagucia

(co-auteure, chapitre 41)
Banco Municipal de
Sangre del D.C.
Universidad Central de
Venezuela
Caracas, Venezuela

au nom du

Comité des sciences de laboratoire de la FMH

Président (2010) : Steve Kitchen, Sheffield, U.K.

Vice-président : Sukesh Nair, Vellore, India

Cette édition a été révisée par les personnes suivantes, qui au moment de sa rédaction étaient membres du Comité des sciences de laboratoire de la Fédération mondiale de l'hémophilie :

Mansoor Ahmed

Norma de Bosch

Ampaiwan Chuansumrit

Marión Echenagucia

Andreas Hillarp

Clarence Lam

Sukesh Nair

Alison Street

Alok Srivastava

Certaines parties ont également été révisées par des membres du Comité de la maladie von Willebrand et des diathèses hémorragiques rares de la Fédération mondiale de l'hémophilie :

Remerciements : Plusieurs des méthodes décrites dans le présent document sont fondées sur des procédures de laboratoire normalisées rédigées par Annette Bowyer du Centre de l'hémophilie de Sheffield, dont la contribution est appréciée avec gratitude.

Les auteurs et la FMH sont particulièrement reconnaissants à Guido Reber pour sa révision de cette traduction.

Mise en garde : Les sources commerciales proposées dans le présent manuel représentent des exemples appropriés au moment de la rédaction. Leur mention ne constitue pas une approbation de la part de la Fédération mondiale de l'hémophilie (FMH), des auteurs, ou du Comité des sciences de laboratoire de la FMH. En outre, celle-ci n'indique pas que d'autres sources ne soient ni fiables ni adéquates, d'une manière ou d'une autre. Les fabricants des matériaux utilisés dans les tests de laboratoire peuvent modifier la composition des réactifs. Ainsi, la fiabilité future de ces sources est inconnue au moment où a été rédigé ce document.

Coordonnées des auteurs

steve.kitchen@sth.nhs.uk

angus.mccraw@nhs.net

Table des matières

1	Équipements de laboratoire.....	1
2	Vérification de la calibration des pipettes et de l'étalonnage des balances....	3
3	La sécurité au laboratoire	5
4	Prélèvement de l'échantillon et variables pré-analytiques	11
5	Contrôle de qualité interne et évaluation externe de la qualité.....	14
6	Technique d'inclinaison manuelle du tube	20
7	Préparation et calibration du plasma normal poolé (PNP)	22
8	Détermination d'un intervalle de référence	24
9	Réactifs.....	28
10	Numération plaquettaire	30
11	Temps de saignement	35
12	Temps de prothrombine (TP)	37
13	Temps de céphaline activée (TCA)	40
14	Tests de mélange pour l'investigation approfondie de TP et de TCA prolongés.....	45
15	Temps de thrombine	49
16	Temps de thrombine en présence de sulfate de protamine pour détecter la présence d'héparine	51
17	Temps de reptilase.....	52
18	Fibrinogène (Dosage de Clauss modifié)	55
19	Élimination de l'héparine du plasma.....	58
20	Dosage du fibrinogène antigène par immunodiffusion radiale.....	60

21	Test de dépistage du facteur XIII.....	62
22	Dosages basés sur le temps de prothrombine (facteurs II, V, VII ou X)	64
23	Dosages de facteurs basés sur le TCA (dosage en un temps des facteurs VIII:C, IX, XI ou XII)	67
24	Dosages du facteur VIII:C de cryoprécipités	70
25	Dosage du facteur VIII:C en deux temps.....	71
25.1	Production du réactif combiné pour le dosage en deux temps du facteur VIII:C	73
26	Dosage chromogénique du facteur VIII:C.....	76
27	Test en un temps pour le dosage de la prékallicréine et du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM)	79
28	Dépistage d'un inhibiteur d'un facteur de coagulation basé sur le TCA ...	81
29	Activité du cofacteur ristocétine/activité du facteur von Willebrand (vWF:RCo or vWF:Act)	83
29.1	Préparation des plaquettes fixées.....	85
30	Antigène du facteur von Willebrand par test ELISA (vWF:Ag).....	87
31	Test de liaison au collagène du facteur von Willebrand (vWF:CB)	90
32	Test de liaison au facteur VIII pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand de type Normandie	93
33	Analyse des multimères du facteur von Willebrand.....	99
34	Mesure quantitative des inhibiteurs du facteur VIII	108
35	Dosage de l'inhibiteur du facteur IX.....	113
36	Test de l'activité du facteur XIII.....	114
37	Anticoagulant lupique et anticorps antiphospholipides.....	117
38	Temps de venin de vipère de Russell dilué (DRVVT).....	120
38.1	Préparation des plaquettes lavées pour le DRVVT	123
39	Test de la fonction plaquettaire.....	124
39.1	Rétraction du caillot	125
39.2	Mesure de l'agrégation plaquettaire	126
40	Lyophilisation du plasma.....	135
41	Évaluation et utilisation des coagulomètres	137
42	Analyse génétique moléculaire.....	144

Tout laboratoire participant au diagnostic et au traitement des diathèses hémorragiques et qui utilise quelques-unes ou toutes les techniques décrites dans le présent manuel nécessite un minimum d'équipement de base. Veuillez prendre note que l'évaluation et l'utilisation de coagulomètres semi-automatiques ou automatiques seront traitées au chapitre 41.

L'ÉQUIPEMENT DE BASE NÉCESSAIRE COMPREND :

- Un réfrigérateur à 4 °C pour l'entreposage des réactifs
Les réactifs doivent être conservés normalement à une température entre 2 à 8 °C, sauf si spécifié différemment par le fabricant. Un appareil ménager de bonne qualité peut convenir
- Un congélateur ≤ -35 °C
Une température inférieure, comme -70 °C, est utile pour l'entreposage prolongé. Les facteurs de coagulation sont stables à cette température pendant au moins six mois (Woodhams et al., 2001). Les congélateurs à -20 °C ne conviennent généralement pas à l'entreposage des plasmas et des réactifs utilisés dans plusieurs des tests d'hémostase. Les congélateurs munis d'un cycle de dégivrage automatique ne conviennent absolument pas.
- Bain(s) d'eau réglable(s) pouvant garantir une température de $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
Les thermoblocs à sec peuvent convenir ou non, selon l'appareil. La température est généralement mieux maintenue dans un bain d'eau.
- Un pH-mètre
- Une source de lumière (par exemple, une lampe de type Anglepoise)
- Chronomètre(s)
- Pipettes automatiques calibrées capables de transférer avec précision un volume d'échantillon et de réactif entre 0 μl et 200 μl et allant jusqu'à 1000 μl
Il est important que leur justesse soit vérifiée (voir le chapitre 2).
- Une pipette calibrée pour la distribution de volumes de liquide allant jusqu'à 5 ml
- Une centrifugeuse capable de tourner à au moins 1700 g
La centrifugation à la température de laboratoire (20 °C à 25 °C) convient pour la plupart des analyses de coagulation. (On recommande pour certaines techniques une centrifugation à 2500 g et à 4 °C).
- Une balance analytique étalonnée ou une balance pouvant mesurer avec justesse les grammes jusqu'à la troisième décimale (milligramme)

Voir le chapitre 2 pour la procédure servant à vérifier la justesse d'une balance.

De l'équipement supplémentaire est nécessaire pour certaines procédures, y compris :

- un lecteur de microplaques pour les tests immunoenzymatiques utilisant un antigène adsorbé (test ELISA)
- un agrégomètre
- équipement indiqué sur la fiche d'une méthode particulière

La climatisation de l'air dans chaque pièce est un avantage dans les pays chauds.

Il devrait y avoir une quantité suffisante de matériel jetable. La réutilisation des tubes à essai et des embouts de pipette après nettoyage devrait être évitée, puisque des résidus peuvent compromettre les résultats, occasionnant ainsi des pertes de réactifs et de temps.

RÉFÉRENCE

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, and Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229–36.

Vérification de la calibration des pipettes et de l'étalonnage des balances

2

Afin de faciliter la gestion de la qualité, l'étalonnage de la balance et la calibration du volume des pipettes doivent être vérifiés tous les trois à six mois. Cessez immédiatement d'utiliser les appareils très mal étalonnés jusqu'à ce qu'ils soient ré-étalonnés. Chaque pipette doit avoir un identifiant unique.

MÉTHODE POUR LA VÉRIFICATION DE LA CALIBRATION DES PIPETTES

1 Les pipettes peuvent être à volume unique, à deux ou trois volumes, ou pour une gamme continue de volumes.

- Les pipettes à un ou deux volumes fixes sont vérifiées à chacun des volumes.
- Les pipettes à trois volumes fixes sont vérifiées pour les volumes maximum et minimum.
- Les pipettes ayant une gamme continue de réglages de volumes : vérifier le réglage maximum ainsi qu'un volume d'environ 25 % du réglage maximum, c'est-à-dire :
 - pipette de 10 ml – 10 ml et 2,5 ml
 - pipette de 5 ml – 5 ml et 1,25 ml
 - pipette de 1 ml – 1 ml (1000 µl) et 0,25 ml (250 µl)
 - pipette de 0,2 ml – 0,2 ml (200 µl) et 0,05 ml (50 µl)
 - pipette de 0,1 ml – 0,1 ml (100 µl) et 0,025 ml (25 µl)
 - pipette de 50 µl – 50 µl et 15 µl

2 Vérifiez la calibration en pesant cinq volumes répétés d'eau distillée (à la température de laboratoire) sur une balance. Chaque mesure de poids est notée en grammes (plus trois décimales). Pour des raisons pratiques, 1,000 ml pèse 1,000 g.

RÉSULTATS

Les résultats de toutes les mesures prises doivent être notés.

Lorsqu'une pipette s'avère imprécise (le volume moyen de la pipette diffère par plus de 10 % du volume attendu), il faut immédiatement cesser de l'utiliser jusqu'à ce

qu'elle soit ré-étalonnée, conformément aux directives du fabricant. De préférence, les pipettes devraient être ajustées avec un écart bien plus faible que 10 %.

Note : Si une pipette est inexacte dans une mesure dépassant les limites suivantes (poids moyen), il faut cesser immédiatement de l'utiliser.

- | | |
|---|--|
| • Pipette de 10 ml
10 ml: 9,000 g - 11,000 g
2,5 ml: 2,250 g - 2,750 g | • Pipette de 0,2 ml
0,2 ml: 0,180 g - 0,220 g
0,05 ml: 0,045 g - 0,055 g |
| • Pipette de 5 ml
5 ml: 4,500 g - 5,500 g
1,25 ml: 1,125 g - 1,375 g | • Pipette de 0,1 ml
0,1 ml: 0,090 g - 0,110 g
0,025 ml: 0,0225 g - 0,0275 g |
| • Pipette de 1 ml
1 ml: 0,900 g - 1,100 g
0,25 ml: 0,225 g - 0,275 g | • Pipette de 50 µl
50 µl: 0,045 g - 0,055 g
15 µl: 0,013 g - 0,0165 g |

MÉTHODE POUR LA VÉRIFICATION DES BALANCES

Afin d'assurer leur exactitude, les poids étalonnés sont pesés tous les six mois, et les résultats sont notés.

- 1 Remettre la balance à zéro.
- 2 Peser un par un les trois poids étalonnés, un à la fois. Noter les poids à trois décimales près (p. ex. 1,003 g).
- 3 Tout poids dont la mesure est hors des limites indiquées (< ou >2 %) ne doit pas être utilisé jusqu'à ce le problème soit réglé.

Les laboratoires dans lesquels on manipule des échantillons chimiques et biologiques sont des lieux potentiellement dangereux.

On remarque au cours des dernières années une croissance de l'appréciation de l'importance des pratiques sécuritaires de travail dans l'industrie, à la fois pour des raisons de santé et écologiques. Cette sensibilisation a fait en sorte qu'on insiste davantage sur des points comme la documentation en matière de sécurité, la formation du personnel et l'évaluation du risque.

Les employeurs sont responsables de fournir les vêtements et l'équipement de protection nécessaires et sont requis de fournir la formation en matière de pratiques de travail sécuritaires.

Si des pratiques de travail sécuritaires sont en place, la probabilité que vous, vos collègues et le public subissent des blessures graves devrait être grandement réduite.

RESPONSABLES DE SÉCURITÉ

Il est important de nommer un ou plusieurs responsables de sécurité pour chaque service. Ces personnes sont responsables de mettre en place et de maintenir les pratiques de sécurité. La sécurité demeure néanmoins sous la responsabilité de tous les membres du personnel dans le laboratoire.

GUIDE DE SÉCURITÉ

Un guide de sécurité exhaustif qui traite de tous les aspects des pratiques de travail sécuritaires pour le service dans son intégralité doit être rédigé.

Tous les membres du personnel doivent lire le guide et signer une déclaration pour indiquer qu'ils l'ont compris.

Les responsables de sécurité doivent conserver des exemplaires du guide. Ceux-ci doivent aussi être rendus disponibles, placés à des endroits facilement accessibles à tous les membres du personnel.

MESURES DE SÉCURITÉ : PRÉCAUTIONS UNIVERSELLES

Selon le système de précautions universelles, tout danger d'infection d'une source quelle qu'elle soit sera évité ou minimisé grâce à de bonnes pratiques de travail.

Tous les échantillons sanguins, les produits sanguins (y compris les kits et les réactifs à base de plasma) et les autres matières d'origine humaine doivent être considérés comme comportant un risque possible d'infection.

Il faut toujours prendre les mesures de protection les plus complètes possible quelle que soit la matière avec laquelle on travaille.

Aucune autre classification du risque ne doit être faite. Tous les fluides et les matières corporelles autres que le sang, qu'ils soient récoltés ou apportés dans l'unité à des fins d'analyse ou autre, doivent être manipulés avec autant de soin que le sang.

Le laboratoire

Le laboratoire doit toujours être gardé propre et bien rangé. Le travail de bureau doit être gardé à l'écart des aires d'analyses de laboratoire. Essayez de ne pas entreposer des articles en vrac dans le laboratoire. Essayez de vous assurer que tous participent à maintenir le laboratoire en ordre.

Vêtements de protection

Tous ceux qui entrent dans le laboratoire, y compris les visiteurs, doivent porter une blouse de laboratoire. Ils doivent immédiatement remplacer la blouse si celle-ci a été contaminée.

Gants jetables

Beaucoup de personnes n'aiment pas se servir de gants, mais chaque échantillon manipulé en laboratoire est potentiellement dangereux. Des gants devraient toujours être portés lorsque l'on manipule des matières toxiques.

Les gants et les blouses n'offrent de toute évidence aucune protection contre les piqûres accidentelles avec des aiguilles, mais ils préviendront, par exemple, que du sérum positif pour le VIH ou une toxine entre en contact avec une coupure ou une éraflure sur votre peau.

Toujours remplacer immédiatement les gants déchirés ou troués.

Lavage des yeux

Plusieurs infections se contractent par voie de contact avec les membranes muqueuses des yeux.

Lavez immédiatement vos yeux avec beaucoup d'eau froide en cas de contact avec une matière potentiellement infectieuse.

Objets pointus et tranchants

Les objets pointus et tranchants, comme les aiguilles et le verre brisé, présentent un grand danger. Utilisez une boîte suffisamment solide pour objets pointus et tranchants.

Il y a eu des cas de travailleurs qui ont contracté une infection à la suite de blessures causées par une piqûre d'aiguille.

Aérosols

Évitez toutes les pratiques à ciel ouvert du laboratoire qui peuvent provoquer des éclaboussures, libérer des gouttelettes ou de la poussière en suspension dans l'air.

Les manipulations qui produisent des aérosols doivent toujours être effectuées dans une hotte fermée adaptée; des lunettes de sécurité doivent être portées.

Tout liquide renversé doit être nettoyé sur-le-champ, en utilisant de l'eau de Javel ou un agent neutralisant si nécessaire.

Substances toxiques et inflammables

Les substances toxiques et inflammables doivent toujours être contenues dans une hotte fermée ou une boîte de sûreté appropriée.

Équipement électrique

Faites particulièrement attention avec tout appareil qui fonctionne avec des liquides, comme les cuves d'électrophorèse et les bains-marie.

Laissez toujours les travaux d'installation, d'entretien et de réparation au personnel compétent.

Effets personnels et comportement

N'apportez jamais d'effets personnels, comme des stylos, des sacs et des peignes dans le laboratoire.

Évitez de toucher votre visage ou vos muqueuses (yeux, nez et bouche) avec vos mains lorsque vous êtes dans le laboratoire. Si cependant vous devez le faire, veillez toujours à laver vos mains préalablement.

La nourriture, les cigarettes et les produits cosmétiques ne doivent jamais être apportés au laboratoire.

Ne faites jamais de pipetage à la bouche.

Lavez toujours vigoureusement vos mains avant de quitter le laboratoire.

Accidents

Tous les accidents doivent être signalés immédiatement et doivent être inscrits dans un journal d'accident tenu par le responsable de la sécurité de l'unité. Ceci est particulièrement important pour les blessures causées par des piqûres d'aiguilles. Dans ces situations, suivez la procédure locale pour consigner et signaler l'accident, ainsi que toute action recommandée ou requise à l'échelle locale.

LE CONTRÔLE DES SUBSTANCES DANGEREUSES POUR LA SANTÉ (COSHH)

Cette loi, utilisée dans les laboratoires au Royaume-Uni, est un guide utile servant à déterminer les risques et les dangers.

Danger et risque

Le danger inhérent à une substance est son potentiel de causer des dommages. Le risque d'une substance est la probabilité qu'elle provoque des dommages à quelqu'un dans des conditions réelles d'utilisation.

Détermination des dangers

La détermination des dangers est une condition préalable essentielle de l'évaluation du risque. Le temps nécessaire pour déterminer les dangers variera en fonction de la substance.

Évaluation du risque

Tenez compte des faits suivants :

- Les dangers
- Les conditions d'utilisation
- Les quantités à utiliser
- Les voies ou les sites d'exposition (inhalation, ingestion, peau ou yeux)

Le résultat de l'évaluation du risque déterminera :

- Les conditions de stockage
- La méthode de manipulation
- La méthode d'élimination
- Les exigences relatives au contrôle et à la surveillance médicale
- La procédure d'urgence

L'évaluation du risque doit être révisée annuellement et mise à jour s'il y a lieu.

Voir les figures 3.1 et 3.2 ci-dessous pour des exemples illustrant comment noter l'information pour l'évaluation du risque en utilisant la méthode COSHH.

L'objet de ce formulaire est de déterminer les dangers et les mesures de contrôle associées à l'équipement utilisé dans une procédure particulière. Seuls les membres du personnel attestés comme compétents peuvent effectuer une procédure et ils ne peuvent l'effectuer qu'après avoir étudié la documentation sur la santé et la sécurité liée à cette analyse particulière.

Figure 3.1. COSHH pour le temps de prothrombine et les tests de facteurs de coagulation basés sur le TCA

N° Réf. Épreuves COSHH 1		
Réf. lab. test en un temps II, V, VII, VIII, IX, X, XI et XII		
Titre de la procédure/l'expérience :		
Substance	Quantité approx.	Danger déterminé
Glyoxaline (imidazole) tampon, contient (voir**)	<5 ml	Nocif si ingéré.
**Imidazole	3,4 g/l	Corrosif : cause des brûlures. Nocif si inhalé, ingéré ou absorbé par la peau. Irrite les yeux.
**Chlorure de sodium	5,85 g/l	Irrite les yeux et les poumons. Éviter le contact avec la peau.
Plasma déficient en un facteur	1 ml	Risque d'infection.
Thromboplastine	2 ml	Risque faible.
Réactif pour la détermination du TCA	2 ml	Risque faible.
Chlorure de calcium 0,025 M	5 ml	Risque faible.
Tampon Owren	<500 ml	Contient du barbitol. Nocif si avalé. Peut causer la sensibilisation par contact cutané ou par inhalation.
Solution 1 de lavage d'analyseur de coagulation	<50 ml	Cause des brûlures : nocif pour les yeux, la peau, etc. Ne pas le mélanger à d'autres désinfectants. Corrosif. Le contact avec des matières combustibles peut provoquer un incendie. Le contact avec l'acide libère des gaz toxiques. Réagit violemment avec les sels d'ammonium; solvant organique – risque d'explosion.
Solution 2 de lavage d'analyseur de coagulation	<50 ml	Contient 0,16 % d'acide chlorhydrique et détergent. Irritant : peut blesser les yeux et la peau.
Plasma ordinaire/témoin/du patient	<1000 µl	Risque d'infection.

Figure 3.2. COSHH pour le dosage du facteur XIII

Titre de la procédure/l'expérience :		
Substance	Quantité approx.	Danger déterminé
Réactif activateur : trombine bovine; inhibiteur de coagulation (0.01 G GLY-PRO-ARG-ALA-AMIDE); chlorure de calcium; bromure d'hexadiméthrine (40 mG); albumine bovine; tampon bicine (100 M m/l); et 2,5 mg azoture de sodium	Flacon de 5 ml	Contient de l'azoture de sodium : hautement toxique si absorbé par la peau ou ingéré. Peut causer des dommages génétiques héréditaires. Réagit de façon explosive avec certains métaux.
Réactif NADH : 2 mg NADH; albumine bovine et 2,5 mg azoture de sodium	Flacon de 5 ml	Contient de l'azoture de sodium : hautement toxique si absorbé par la peau ou ingéré. Peut causer des dommages génétiques héréditaires. Réagit de façon explosive avec certains métaux.
Réactif de détection : peptide synthétique; ester éthylique de glycine (7 mg); α -cétoglutarate (13,5 mg); albumine bovine; tampon HEPES; et 5 mg azoture de sodium	Flacon de 5 ml	Contient de l'azoture de sodium : hautement toxique si absorbé par la peau ou ingéré. Peut causer des dommages génétiques héréditaires. Réagit de façon explosive avec certains métaux.
Plasma ordinaire/témoin/du patient	<1000 μ l	Risque d'infection.

Prélèvement de l'échantillon et variables pré-analytiques

4

PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Un certain nombre de directives décrivent la procédure à suivre pour le prélèvement et le traitement d'échantillons sanguins en vue d'effectuer des tests d'hémostase (CLSI 2007, 2008a, 2008b).

Dans la mesure du possible, le sang veineux doit être prélevé des veines situées dans le creux du coude, en utilisant un garrot pour faciliter le prélèvement. L'application du garrot doit immédiatement précéder le prélèvement de l'échantillon. L'aiguille ne doit pas être supérieure à 21 gauges pour les adultes et l'échantillon doit être prélevé au moyen d'une seringue ou d'un système de prélèvement sous vide permettant un prélèvement rapide de l'échantillon sanguin. Si le sang est extrait à la seringue, l'aspiration doit être délicate. Pour les nourrissons, une aiguille de 22 ou 23 gauges peut s'avérer nécessaire.

Tout échantillon qui n'a pu être prélevé au moyen d'une prise de sang rapide doit être jeté en raison de l'activation possible de la coagulation. L'aiguille doit être enlevée avant de transférer le sang de la seringue au récipient qui contient l'anticoagulant. Le sang prélevé doit être mélangé à l'anticoagulant sans tarder.

Une fois le sang mélangé à l'anticoagulant, le récipient doit être bouché et mélangé doucement par cinq inversions du récipient. Éviter de remuer vigoureusement. Certains auteurs déconseillent l'utilisation des 5 premiers millilitres du sang prélevé pour les tests d'hémostase.

Dans le cas où un système de prélèvement de sang sous vide est employé, il est important de souligner qu'il est tout de même nécessaire de remuer le contenant en l'inversant doucement cinq fois après l'extraction du sang.

Le sang doit être mélangé à l'anticoagulant au citrate de sodium à raison de 9 parties de sang pour 1 partie d'anticoagulant. La concentration de l'anticoagulant doit être de 0.109 M (soit 3.2% de citrate de sodium dihydraté) bien que la concentration de 0.105 M, utilisée dans certains systèmes de prélèvement sous vide, est également acceptable. La solution anticoagulante peut être conservée à 4 °C pour une durée allant jusqu'à trois mois, mais elle devrait faire l'objet d'un examen avant son utilisation et être jetée s'il y a présence de matières particulières – comme, par exemple, en cas de contamination. Le récipient du prélèvement ne doit pas induire d'activation au contact (c'est-à-dire, être en plastique ou en verre siliconé). Les résultats obtenus peuvent être influencés si le patient présente un hémocrite réduit, ou, plus particulièrement, si l'hémocrite est augmenté. Le volume d'anticoagulant doit être corrigé pour tenir compte du volume plasmatique réduit. La figure 4.1, ci-dessous, est un guide indiquant le volume d'anticoagulant requis pour un échantillon de 5 ml.

Figure 4.1. Volumes de sang et d'anticoagulant requis pour des échantillons présentant un hémocrite anormal.

Hématocrite	Volume d'anticoagulant	Volume de sang
25 %-55 %	0,5 ml	4,5 ml
20%	0,7 ml	4,3 ml
60%	0,4 ml	4,6 ml
70%	0,25 ml	4,75 ml
80%	0,2 ml	4,8 ml

Il est également possible de maintenir le volume d'anticoagulant à 0,5 ml et de varier le volume de sang ajouté en fonction de l'hématocrite. Le volume de sang à ajouter (à 0,5 ml de citrate 0,109 M) est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{60}{100 - \text{hématocrite}} \times 4,5$$

CENTRIFUGATION

Le plasma riche en plaquettes (PRP) destiné aux tests de la fonction plaquettaire est préparé en centrifugeant pendant 10 minutes le sang citraté à 150 g - 200 g, à la température de laboratoire. Le surnageant est décanté et conservé à la température de laboratoire dans un flacon fermé par un bouchon pendant l'utilisation, qui ne doit pas dépasser deux heures.

Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) est utilisé dans la plupart des tests de coagulation. Le prélèvement sanguin doit être centrifugé à un minimum de 1 700 g pendant au moins 10 minutes. La centrifugation peut être faite à la température de laboratoire, pourvu qu'elle ne soit pas supérieure à 25 °C, auquel cas il faudrait utiliser une centrifugeuse thermostatée (4 °C).

Certaines méthodes d'analyse requièrent que le plasma soit centrifugé deux fois. Pour ce faire, le PPP de la première centrifugation est transféré dans un tube en plastique, fermé par un bouchon, et il est centrifugé une deuxième fois. Il faut prendre soin de ne pas décanter la portion inférieure du plasma après la deuxième centrifugation, puisqu'elle pourrait contenir des plaquettes résiduelles de la première centrifugation.

ÉCHANTILLONS DEVANT ÊTRE IMMÉDIATEMENT TESTÉS

Dans la mesure du possible, les échantillons devraient être testés dans les quatre heures qui suivent leur prélèvement. Il faut éviter de les conserver pendant plus longtemps avant de réaliser des tests de dépistage et de dosages de facteurs de coagulation, bien qu'il ait été démontré que la stabilité des échantillons en sang total, conservés à la température du laboratoire, est bonne en ce qui concerne la mesure du temps de prothrombine (Baglin et Luddington, 1997). Les échantillons destinés aux tests de dépistage et aux dosages de facteur VII doivent être gardés à la température de laboratoire pour éviter le risque d'activation par le froid.

ÉCHANTILLONS À RISQUE ÉLEVÉ

Il faut manipuler tous les échantillons de plasma avec prudence en raison du risque de transmission de l'hépatite, du VIH et d'autres virus.

Voir le chapitre 3, « La sécurité dans le laboratoire ».

CONGÉLATION DU PLASMA

Le plasma peut être conservé au congélateur pour des dosages ultérieurs. La conservation à une température inférieure à -70 °C est préférable. Les facteurs de coagulation sont stables à cette température pendant au moins six mois (Woodhams et al. 2001). La conservation à court terme des échantillons à -35 °C convient à la plupart des tests. La conservation à -20 °C est habituellement inadéquate. La double centrifugation (voir Centrifugation ci-dessus) doit être réalisée si les échantillons sont congelés en vue de la recherche d'un anticoagulant de type lupique.

Il est préférable d'éviter la congélation et la décongélation avant d'effectuer des déterminations du temps de céphaline activée, puisqu'elles peuvent influencer les résultats obtenus avec certaines techniques. Tout plasma congelé doit être plongé immédiatement jusqu'au niveau du plasma dans un bain d'eau à 37 °C, décongelé pendant quatre à cinq minutes et mélangé par inversion douce avant de procéder à l'analyse. Il faut éviter la décongélation lente à température plus basse pour éviter la formation de cryoprécipité, ce qui résulte en une diminution de la teneur en FVIII:C, en FvW et en fibrinogène.

RÉFÉRENCES

Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: Approved standard*, 6th ed. 2007; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H3-A6: 27(26).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures and devices for the collection of diagnostic capillary blood specimens: Approved standard*, 6th ed. 2008 (a); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H4-A6: 28(25).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: Approved guideline*, 5th ed. 2008 (b); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H21-A5: 28(5).

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229-36.

Contrôle de qualité interne et évaluation externe de la qualité

L'assurance qualité (AQ) est un terme général qui peut être employé pour décrire l'ensemble des mesures prises pour assurer la fiabilité des analyses et des rapports de laboratoire. Elle comprend le choix du test, le prélèvement d'un échantillon conforme auprès du patient, l'analyse du spécimen et la saisie correcte des résultats dans les délais, l'interprétation des résultats le cas échéant et la communication de ceux-ci aux cliniciens demandeurs.

Le contrôle de qualité interne (CQI) et le contrôle de qualité externe (CQE) sont deux composantes distinctes, mais complémentaires, d'un programme d'assurance qualité d'un laboratoire. Le CQI sert à établir si une série d'analyses montrent des résultats uniformes sur une période donnée. Il est par conséquent employé pour assurer l'uniformité quotidienne du laboratoire. Le CQE sert à déterminer le degré de concordance entre les résultats d'un laboratoire et ceux obtenus par d'autres centres.

Dans des programmes de CQE de grande envergure, l'analyse rétrospective des résultats obtenus par les laboratoires participants permet de déterminer non seulement la faible performance de certains laboratoires, mais aussi celle de réactifs et de méthodes qui donnent des résultats peu fiables ou erronés.

La fonction principale du CQE est de soumettre à des enquêtes de compétence les analyses de chaque laboratoire. Le programme international de CQE de la Fédération Mondiale d'Hémophilie (FMH) comprend des analyses d'une pertinence particulière au diagnostic et à la gestion des diathèses hémorragiques (pour plus de renseignements, communiquez avec la FMH). Les résultats obtenus par ce programme ont été publiés dans les ouvrages suivants :

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Development of a World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme: results of a pilot study. *Haemophilia* 1996; 2: 4-46

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Laboratory performance of haemophilia centres in developing countries: 3 years' experience of the World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme. *Haemophilia* 1998; 4: 739-746.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the WFH EQA programme 2003-2008. *Haemophilia*. 2009; 15:571-7.

COORDONNÉES POUR RENSEIGNEMENTS SUR LE PROGRAMME DE CQE DE LA FMH (2010)

Directeur : M. F. Eric Preston

Directeur scientifique : Dr Steve Kitchen

Rutledge Mews
3 Southbourne Road
Sheffield
S10 2QN

Royaume-Uni

Tél : + 44 -114 - 267 3300

Télec. : + 44 -114 - 267 3309

Site Web : www.ukneqasbc.org

Les programmes de CQE de grande ampleur peuvent donner des renseignements concernant la performance relative des procédures analytiques, y compris le principe de la méthode, les réactifs et les instruments. La participation continue aux programmes de CQE a été associée à des améliorations des performances des laboratoires. Ceci a été remarqué non seulement au niveau de la performance générale, attestée par une réduction de la variation entre les résultats des différents laboratoires, mais également au niveau de chaque laboratoire.

L'évaluation de la performance de chaque laboratoire est une composante essentielle du plan de CQE. Le programme de CQE de la FMH compare les résultats des participants avec ceux obtenus avec les mêmes échantillons lors d'une enquête englobant jusqu'à 700 centres de partout à travers le monde qui participent au programme national du Royaume-Uni pour l'évaluation externe de la qualité (U.K. National External Quality Assessment Scheme, Royaume-Uni NEQAS) pour la coagulation sanguine.

Il existe de nombreuses raisons pour lesquelles un laboratoire peut obtenir des résultats considérés comme insatisfaisants. Bien que la cause de ceci puisse être immédiatement apparente, déterminer les problèmes sous-jacents n'est pas toujours facile. Les programmes de très grande envergure peuvent déterminer les problèmes de performance qui sont dus particulièrement aux différences de réactifs ou aux différences au niveau de la méthodologie.

La confidentialité absolue est une caractéristique importante de tous les programmes de CQE. Dans le programme international de CQE mentionné ci-dessus, les renseignements portant sur les performances de chaque laboratoire individuel ne seront divulgués à personne, sauf au chef de département concerné sur demande écrite.

CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Le contrôle de la qualité interne est utilisé pour établir si une série de techniques et de procédures résultent en performance constante sur une période donnée. L'expression « contrôle de qualité » est couramment employée pour décrire l'ensemble des procédures suivies pour vérifier que les résultats des analyses du laboratoire sont suffisamment fiables pour être diffusées afin de faciliter la prise de décisions cliniques, le contrôle thérapeutique et le diagnostic d'anomalies

hémostatiques. Les procédures du contrôle de qualité doivent être appliquées de façon à assurer un contrôle immédiat et continu de la production de résultats.

La qualité des résultats obtenus en laboratoire est influencée par de nombreux facteurs, incluant :

- La collecte et la manipulation appropriée des échantillons
- Le choix de techniques appropriées et la tenue à jour d'un manuel des procédures opérationnelles normalisées
- L'utilisation de réactifs et de matériels de référence fiables
- Le choix d'une automatisation appropriée et l'entretien adéquat de celle-ci
- La tenue convenable de dossiers
- Le système de communication des résultats

De plus, la qualité des résultats obtenus lors de la pratique habituelle dépend grandement de la sélection, de la formation, de la motivation et d'une dotation appropriée en personnel.

Le contrôle de la qualité interne est notamment utile pour déterminer le degré de précision d'une technique particulière – la précision étant le degré de concordance entre des mesures répétées effectuées sur un même échantillon. Il est important de reconnaître qu'une technique précise n'est pas nécessairement juste, la justesse étant une mesure de la proximité d'une valeur mesurée à la valeur réelle.

MATÉRIELS DE CONTRÔLE DE QUALITÉ

Pour évaluer la précision d'une méthode particulière, il est nécessaire d'effectuer des analyses répétées sur les aliquotes d'un même échantillon. Il est important d'inclure des échantillons de CQI ayant des valeurs normales et pathologiques afin de garantir qu'une méthode est sous contrôle à différents taux de l'analyte, puisque des modifications relativement mineures apportées à un processus analytique peuvent apparaître plus clairement lors du dosage d'un CQI dans le domaine pathologique.

Le matériel de contrôle doit présenter des caractéristiques semblables à celles des échantillons à tester et doit être analysé simultanément. Des matériels de contrôle d'origine humaine auront plus tendance à ressembler étroitement aux échantillons humains. Tous les flacons et les aliquotes du matériel de contrôle devraient être à peu près identiques, de sorte que toute variation apparue dans les résultats de l'analyse ne soit pas une conséquence de la variabilité d'un flacon à un autre.

Les substances de CQ doivent également demeurer stables pendant la période d'utilisation prévue. Pour ce qui est des tests et des analyses d'hémostase, les échantillons de plasma doivent être congelés (préférentiellement à -35 °C ou moins) ou lyophilisés afin d'assurer qu'ils soient suffisamment stables pour être utilisés comme substance de CQ. Pour reconstituer les échantillons lyophilisés, il est important d'utiliser de l'eau distillée ayant un pH entre 6.8 et 7.2, et prévoir au moins cinq minutes pour la reconstitution.

Si une substance de CQ commerciale est utilisée, elle doit être reconstituée conformément aux instructions du fabricant, au moyen d'un système de pipetage précis. Si une substance de CQ congelée est utilisée, elle doit être décongelée rapidement à 37 °C pendant cinq minutes. Il faut tenir compte du risque de transmission de virus à diffusion hématogène lors du choix de substance de CQ. Les substances à risque élevé ne doivent pas être utilisées.

Au moins une substance de CQ doit être incluse dans chaque groupe d'analyse ou de tests de dépistage. Pour les tests de dépistage, il est recommandé d'inclure un CQ normal et de tester les matériels de CQ anormaux une fois par jour ou par poste de travail ou lorsqu'il existe un doute sur le contrôle méthode. Pour un guide de dépannage pour des problèmes avec le contrôle de la qualité interne (CQI) du TP/TCA lors de l'analyse à deux différents niveaux, veuillez consulter la Figure 5.1 ci-dessous.

Figure 5.1. Dépannage CQI

TP CQI niveau 1	TP CQI niveau 2	TCA CQI niveau 1	TCA CQI niveau 2	Conclusion/contrôle
Dehors	Dedans	Dedans	Dedans	TP Substance CQI niveau 1
Dehors	Dehors	Dedans	Inclus	Réactif TP
Dedans	Dedans	Dehors	Dedans	TTPA Substance CQI niveau 1
Dedans	Dedans	Dehors	Dehors	Réactif TTPA
Dehors	Dehors	Dehors	Dehors	Instrument

Un matériel de CQ bas doit être inclus avec les tests utilisés dans le diagnostic et le monitoring des anomalies congénitales associées au saignement.

Dans tous les cas, le matériel de contrôle doit être traité exactement comme un échantillon à analyser, si possible. Puisqu'il y aura nécessairement une certaine variation attribuable aux différences sur les plans biologique, technique et analytique, chaque résultat de CQ doit être consigné et évalué en fonction de l'intervalle considéré comme acceptable, selon la description ci-dessous.

LIMITES DE VARIATION ACCEPTABLES

Les fabricants d'échantillons de CQI fournissent souvent une valeur-cible et un intervalle de valeurs acceptables pour les CQI commerciaux. Dans le cas de tests de dépistage et d'analyses occasionnelles, les résultats obtenus dépendront du réactif et du système de détection du point final de la réaction. L'intervalle cible doit tenir compte de ces effets. Lorsqu'une valeur-cible et un intervalle de valeurs acceptable ne sont pas disponibles pour une technique particulière, il peut être déterminé localement.

Le matériel de CQI est testé de façon répétée (minimum 10 répétitions) sur des jours différents lorsque l'analyse est sous contrôle (basé par exemple sur les résultats se situant à l'intérieur de l'intervalle des valeurs acceptables, obtenus par une autre substance de CQI).

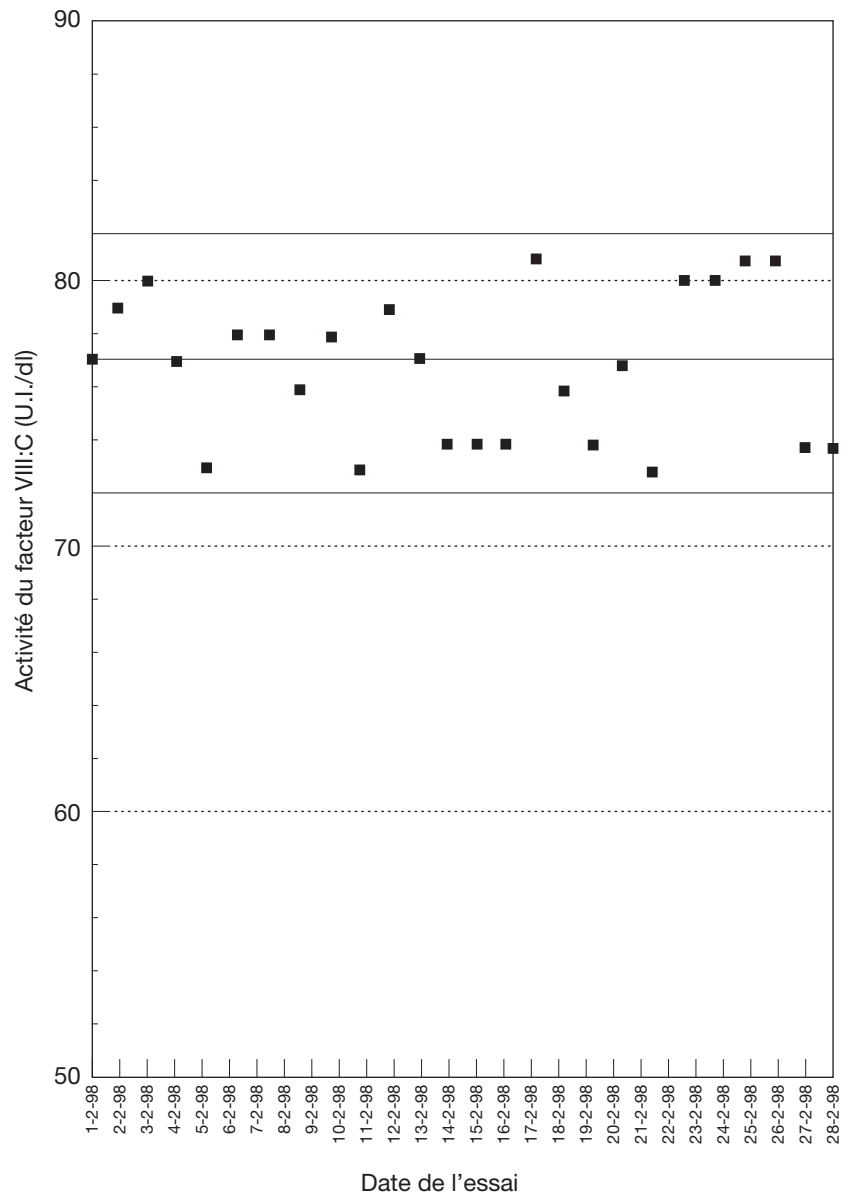
La moyenne et l'écart type de ces résultats sont ensuite calculés. L'écart type est la racine carrée de la somme de d^2 divisée par $n-1$, où d représente la différence entre chaque résultat et la moyenne et n le nombre de déterminations. L'écart type est une mesure de la dispersion des résultats : plus l'écart type est grand, plus les résultats sont dispersés. Un autre paramètre important est le coefficient de variation (CV), qui est l'expression de l'écart type sous forme de pourcentage de la moyenne ($CV = \text{écart type} \div \text{moyenne} \times 100 \%$). Le CV des résultats obtenus sur des jours différents pour le temps de prothrombine et le temps de céphaline activée d'un échantillon de CQ devrait toujours être inférieur à 8 % et si possible inférieur. Pour les analyses comme le FVIII:C et le FIX, des CV inférieurs à 10 % devraient être atteignables pour les tests effectués sur un certain nombre de jours.

Dans la plupart des cas, les résultats obtenus avec un échantillon de CQI présenteront une distribution normale (gaussienne). Il est pratique courante de fixer l'intervalle de référence pour les résultats de CQI à la moyenne ± 2 écarts type, puisque ceci devrait inclure 95 % des valeurs.

Les résultats individuels devraient être notés sur un graphique indiquant l'intervalle cible. Un exemple est présenté à la Figure 5.2, ci-dessous. Toutes les valeurs obtenues ultérieurement qui se situent à l'intérieur de ces limites sont considérées comme acceptables.

Les résultats qui se situent à l'extérieur de cet intervalle indiquent que la substance de CQ s'est détériorée ou a été manipulée incorrectement ou que la méthode n'est pas sous contrôle. Un nouveau test utilisant de la substance de CQ supplémentaire permettra de différencier ces deux possibilités : des résultats supplémentaires qui se situent à l'extérieur des limites confirmeront que l'analyse n'est pas maîtrisée. Une dérive à moyen ou long terme des résultats d'analyse de CQ, comme celle occasionnée par la détérioration ou un changement d'instrument ou de réactif, deviendra apparente à la suite d'un examen minutieux des résultats cumulatifs présentés dans le graphique.

Figure 5.2. Résultats des analyses du FVIII:C dans un échantillon de contrôle de qualité interne analysé à des jours différents



Chaque point représente une analyse différente d'un même matériel. Les lignes pleines représentent la moyenne et deux écarts types de 20 analyses effectuées sur ce matériel; elles constituent les limites des résultats acceptables.

6

Technique d'inclinaison manuelle du tube

Bien que beaucoup d'instruments sont proposés pour les tests de coagulation (voir le chapitre 41 sur l'automatisation) et utilisés partout dans le monde, la technique d'inclinaison manuelle du tube est toujours employée avec succès dans de nombreux centres. Même là où l'automatisation est utilisée, il peut être nécessaire d'effectuer certains tests manuellement en raison de l'incompatibilité occasionnelle entre l'échantillon et l'instrument particulier utilisé. Ceci peut être le cas en présence de concentrations très élevées de lipides plasmatiques, lors de l'analyse d'un échantillon ictérique ou lorsque le mode de formation des caillots dans l'échantillon diffère de façon marquée par rapport aux échantillons normaux, particulièrement lorsque la concentration en fibrinogène est nettement réduite.

Les tests manuels de coagulation sont idéalement effectués dans des tubes de verre. Le format de 75 x 10 mm est pratique. Différents types de verre peuvent être utilisés avec succès, mais ils peuvent influencer le temps de coagulation obtenu, surtout dans les tests de dépistage comme le temps de céphaline activée (TCA). Si la source des tubes à essai change (fabricant ou composition), il faut tenir compte de la possible influence sur les résultats. Ceci peut être fait en comparant les résultats obtenus avec deux types de tubes sur un petit nombre de TCA. Si des différences systématiques existent, un nouvel intervalle de référence doit être fixé. Si possible, éviter la réutilisation de tubes à essai après lavage.

En raison des nombreuses variables et sources possibles de contamination liées aux techniques manuelles, les tests doivent être effectués en double. Dans tous les cas, si les temps de coagulation obtenus lors des tests en double diffèrent de plus de 10 %, le test doit être fait de nouveau.

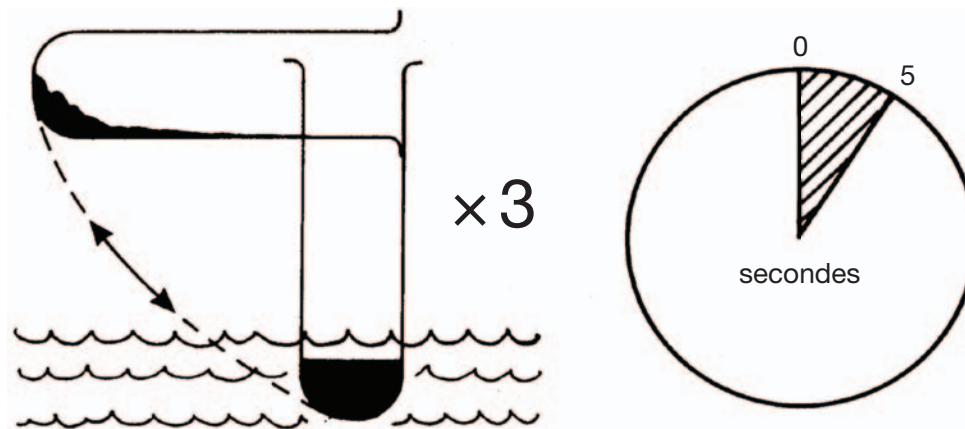
Les précautions suivantes sont importantes pour la technique d'inclinaison manuelle du tube :

- Les réactifs doivent être préchauffés à 37 °C pendant au moins cinq minutes avant leur utilisation.
- Le mélange du réactif et du plasma testé doit être fait aussitôt que la dernière composante du mélange est ajoutée, en remuant rapidement et de façon contrôlée le tube à essai pendant une à deux secondes au chronomètre.
- Le mélange doit ensuite être incliné à 90° à trois reprises toutes les cinq secondes en observant la formation du caillot. Le temps de coagulation est noté. Cette procédure est illustrée dans la Figure 6.1 ci-dessous.

Le tube à essai doit être immergé dans un bain d'eau à 37 °C (+/- 0,5 °C) entre les inclinaisons, de sorte que la base du tube d'essai se situe à environ 3 à 4 cm sous la surface, afin de faciliter le maintien de la température du mélange d'incubation aussi près de 37 °C que possible.

Le mélange doit être examiné attentivement à l'œil, sous une lampe Anglepoise ou une autre source de lumière semblable et le temps de coagulation doit être noté.

Figure 6.1. Technique d'inclinaison manuelle du tube pour les tests de coagulation



Incliner trois fois toutes les cinq secondes

7

Préparation et calibration du plasma normal poolé (PNP)

Figure 7.1. Collecte du plasma normal poolé

Donneurs	Un minimum de 20 personnes normales et en bonne santé qui ne prennent aucun médicament qui interfère avec les facteurs et les réactions de la coagulation. Les femmes prenant des contraceptifs oraux sont admissibles. Un nombre approximativement égal d'hommes et de femmes est souhaitable. La plage d'âge est de 20 à 50 ans.
Anticoagulant	Citrate dihydraté trisodique 0,109 M (3,2 %) tamponné avec de l'acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N-2-éthanesulfonique à 5 g par 100 ml de solution de citrate trisodique.
Collecte	Le sang des donneurs est prélevé entre 9 h et 11 h au moyen de seringues jetables en plastique de 60 ml et d'aiguilles à ailettes de calibre 21.

MÉTHODE DE PRÉPARATION DU PNP

- 1 Prélever 54 ml de sang et le mélanger à 6 ml d'anticoagulant dans des récipients en plastique.
- 2 Entreposer l'échantillon sur de la glace fondante pendant la préparation du pool.
- 3 Centrifuger à 4 °C pendant 15 minutes à 2500 g.
- 4 Pooler le plasma dans un récipient en plastique.
- 5 Aliquoter en portions de 0,5 ml dans des tubes en plastique de 1,5 ml.
- 6 Congeler rapidement avec de la glace sèche si celle-ci est disponible. Dans l'alternative, mettre immédiatement à -70 °C.
- 7 Effectuer la procédure décrite ci-dessus dans un délai de quatre heures.
- 8 Stable à -70 °C pendant plus de six mois.

Un plasma normal poolé (PNP) préparé de cette façon aura des taux situés autour de 1 U/ml ou de 100 U/dl pour les facteurs II, V, VII, IX, X, XI, XII, le kininogène de haut poids moléculaire et la prékallicréine, bien que les niveaux du facteur VIII et du facteur Willebrand varient grandement d'un PNP à l'autre. Ce PNP local doit être étalonné en unités internationales (UI), puisque des normes internationales existent désormais pour les facteurs de coagulation susmentionnés, à l'exception du facteur XII. Le pool peut être utilisé non étalonné avec une puissance présumée de 100 U/dl ou d'1 U/ml pour le facteur XII. Pour l'étalonnage en UI, il est nécessaire soit d'obtenir des préparations de référence étalonnées de l'OMS (qui sont conservées au National Institute for Biological Standards and Control, à South Mimms, Potters Bar, Herts, au Royaume-Uni), soit d'acheter un plasma de référence commercial approprié qui a été étalonné en UI par le fabricant. Il faut tenir compte qu'un pool doit être remplacé chaque 12 à 18 mois, sauf si les résultats obtenus lors des contrôles de la qualité interne démontrent que sa stabilité a été conservée.

MÉTHODE POUR LA CALIBRATION DU PNP LOCAL

- 1 Obtenir un étalon de référence, p. ex. étalon de référence international de l'OMS (minimum deux flacons).
- 2 Durant deux jours différents, utiliser un flacon de l'étalon de référence international et quatre aliquotes du PNP local.
- 3 Lors du premier jour, doser dans l'ordre: étalon de référence international, pool local, pool local, pool local, pool local, étalon de référence international, et répéter cette série en utilisant des dilutions fraîches de chacun de ces plasmas.
- 4 Le deuxième jour, doser dans l'ordre : pool local, pool local, étalon de référence international, étalon de référence international, pool local, pool local, et répéter cette série en utilisant des dilutions fraîches de chacun de ces plasmas.
- 5 Calculer la teneur de chaque aliquote de l'étalon local en le comparant à la moyenne des résultats obtenus avec les deux étalons de référence internationale.

La valeur moyenne des résultats des 4 aliquotes $\times$ 2 dilutions $\times$ 2 jours (n=16) est considérée comme étant celle de l'étalon local.

8

Détermination d'un intervalle de référence

Afin de bien interpréter les résultats d'un test quelconque en laboratoire, il est important d'établir un rapport entre les données obtenues et les résultats qu'obtient le test chez des sujets normaux et en bonne santé. La « bonne santé » n'est pas une condition bien définie et elle est souvent une notion relative. Dans certains cas le groupe idéal devrait être le plus représentatif possible de la population étudiée au niveau de l'âge, du sexe et, dans le cas des facteurs VIII/facteur Willebrand, du système des groupes sanguins ABO.

Toutefois, une sélection aussi précise n'est pas essentielle pour beaucoup de tests de la coagulation. En pratique, la sélection de sujets normaux et en bonne santé pour déterminer un intervalle de référence sera influencée par des considérations d'ordre pratique. On peut utiliser avec succès des membres du personnel hospitalier qui ne prennent pas de médicaments, des donneurs de sang en bonne santé ou les partenaires asymptomatiques des patients adultes étudiés. Il y a un certain nombre d'éléments qu'il est important de considérer en ce qui concerne l'intervalle de référence. Ceux-ci sont indiqués ci-dessous.

L'état des sujets normaux au moment du prélèvement sanguin peut influencer les résultats obtenus. Certaines variables pré-analytiques ont récemment fait l'objet d'une révision dans une directive de l'ISTH qui portait sur les problèmes de santé des femmes (Blomback et al., 2007). Celle-ci comprend un examen des données ayant trait aux effets du stress physique (par exemple une multiplication par 2,5 du facteur VIII/facteur von Willebrand pouvant persister pendant jusqu'à 10 heures), du stress mental (augmentation du facteur VIII et du facteur von Willebrand après épisode de stress mental aigu), des hormones, des variations du rythme circadien, de la posture et de l'alimentation. Quelques recommandations générales ont été faites, lesquelles ne se limitent pas à l'étude des patients de sexe féminin. Les voici :

- S'abstenir de faire de l'exercice physique intense dans les 24 heures précédant la prise de sang.
- Promouvoir un environnement où le stress mental et physique est moindre.
- S'abstenir de manger des aliments gras et de fumer le matin de la prise de sang.
- Obtenir les prélèvements tôt le matin (entre 7 et 9 h), après que le sujet soit resté assis et détendu pendant 20 à 30 minutes.

Un intervalle de référence doit toujours être établi à l'échelle locale. La documentation et l'information du fabricant ne doivent être utilisées qu'à titre indicatif.

Les échantillons des donneurs doivent être prélevés, traités et analysés en utilisant des techniques aussi proches que possible que celles utilisées pour les échantillons provenant de patients.

Pour les tests de dépistage particuliers (TP, TCA), il faut tenir compte de la possibilité qu'un nouveau lot de réactif provenant d'un même fabricant ait un intervalle de référence différent que celui du lot précédent. Les données des CQI dans la période de changements de lots devraient être examinées attentivement. Des changements dans les valeurs de CQI indiquent le besoin d'un nouvel intervalle de référence.

En ce qui concerne les tests, la documentation et l'information du fabricant ne doivent être utilisées qu'à titre indicatif. Les techniques d'analyse qui conviennent le mieux sont celles pour lesquelles l'intervalle de référence établi à l'échelle locale ressemble grandement aux intervalles indiqués dans la documentation.

Les intervalles de référence de certains tests de coagulation ne sont pas les mêmes chez les nouveaux nés (prématurés ou nés à terme) et les enfants que chez les adultes (Andrew et al., 1987, 1990, 1992).

Les intervalles de référence, particulièrement ceux des tests de dépistage, doivent être utilisés uniquement comme une aide aux renseignements cliniques. Certains patients ayant des antécédents personnels et familiaux ont besoin d'une investigation plus approfondie malgré la présence de résultats normaux au test de dépistage. D'autres patients qui obtiennent des résultats anormaux aux tests de dépistage n'ont pas à être étudiés davantage lorsque la cause de l'anomalie est apparente. Les limites de l'intervalle de référence peuvent par conséquent ne pas correspondre à une décision ou aux limites de d'intervention.

Il existe des raisons statistiques expliquant pourquoi au moins 120 sujets normaux sont exigés pour établir un intervalle de référence valide complet, mais pour des raisons pratiques, une approximation étroite peut être obtenue en testant un nombre beaucoup plus restreint de sujets. Cette approche est considérée comme acceptable à des fins cliniques par un nombre de spécialistes dans le domaine (CLSI, 2008). Le nombre de sujets normaux sélectionnés pour analyse ne doit pas être inférieur à 30 pour les tests d'hémostase relatifs à l'investigation des diathèses hémorragiques.

En établissant des intervalles de référence, les échantillons recueillis des sujets normaux doivent être prélevés, traités et analysés à l'échelle locale en utilisant des techniques identiques à celles employées pour l'analyse des échantillons des patients. Si la pratique courante est de conserver les échantillons congelés pour les analyser en batch, il faudrait alors procéder ainsi pour les échantillons des normaux. Si les échantillons des patients sont traités après un délai de plusieurs heures durant lequel les échantillons sont transportés au laboratoire, alors un délai similaire doit être appliqué entre le prélèvement et l'analyse des échantillons des sujets normaux utilisés pour établir les intervalles de référence. La documentation et l'information du fabricant du réactif ne doivent être utilisées qu'à titre indicatif.

Pour chaque test, les résultats obtenus sur échantillons provenant des sujets normaux et en bonne santé sont utilisés pour calculer un intervalle de référence.

Les résultats de la plupart des tests ayant trait à l'investigation des diathèses hémorragiques ont une distribution normale ou gaussienne. Il s'avère utile de confirmer ceci en examinant à l'œil les données en format graphique, comme illustré à la Figure 8.1. Les valeurs qui se trouvent inopinément loin de la plupart des autres valeurs de référence sont probablement des valeurs aberrantes. Il est acceptable d'exclure celles-ci des calculs.

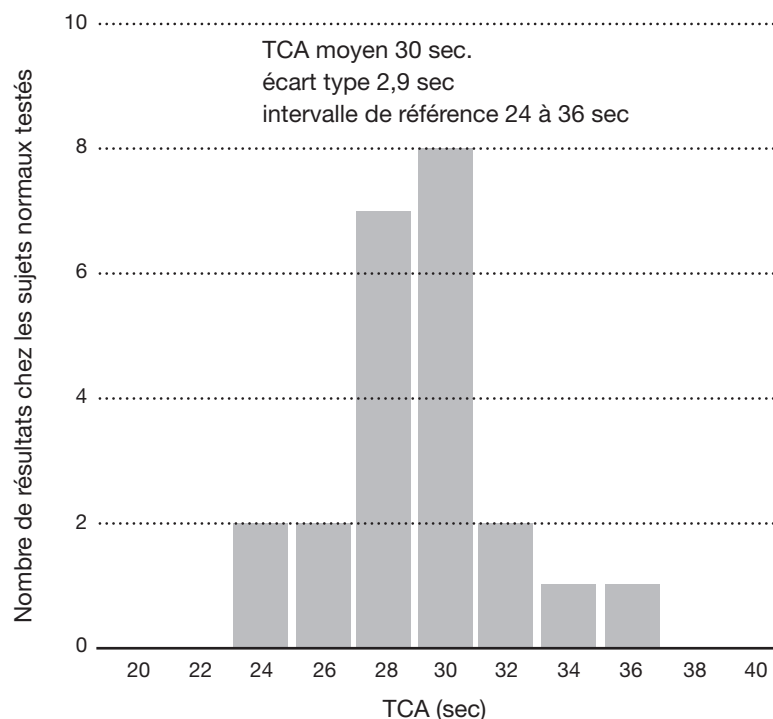
La convention selon laquelle l'intervalle de référence ou normal doit inclure les 95 % des données centrales est fréquemment appliquée. Si la distribution diffère de façon marquée de celle illustrée à la Figure 8.1 (par exemple, si elle est asymétrique), des échantillons normaux supplémentaires peuvent être nécessaires. Il est pratique d'exclure les 2,5 % des valeurs se situant aux extrémités, laissant ainsi les 95 % des valeurs centrales.

Si la distribution est normale, il est approprié de calculer la moyenne et l'écart type des valeurs (comme décrits au chapitre 5), et d'utiliser la moyenne plus ou moins deux écarts types pour établir respectivement les limites supérieure et inférieure de l'intervalle de référence.

Dans tous les cas, l'intervalle de référence doit être utilisé seulement comme guide et aide à l'interprétation clinique.

Pour une discussion exhaustive sur la détermination d'intervalles de référence, voir CLSI (2000).

Figure 8.1. Distribution des résultats du TCA chez des sujets normaux et en bonne santé



Note : Les données indiquent une distribution normale, distribuée également des deux côtés de la valeur moyenne.

RÉFÉRENCES

Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:95–104.

Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70:165–72.

Andrew M, Vegh P, Johnston, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80:1998–2005.

Blomback M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R on behalf of the ISTH SSC on Women's Health Issues. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *Thromb Haemost* 2007; 5:855–858.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: Approved guideline*, 2nd ed. 2000; Clinical and Laboratory Standards Institute Document C28-A2.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-stage prothrombin time (PT) test and activate partial thromboplastin time (APTT) test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

9

Réactifs

CHLORURE DE CALCIUM

Par exemple, les produits chimiques BDH. Solution molaire.

Solution 25 mM : diluer 25 ml de solution à 1 M à 1 litre dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée.

TAMPON BARBITURIQUE D'OWREN DE PH 7,35

5,875 g diéthylbarbiturate de sodium (barbitone sodique)

7,335 g chlorure de sodium

1 Mettre dans une fiole jaugée et dissoudre dans approximativement 780 ml d'eau.

2 Ajouter 215 ml d'acide chlorhydrique 0,1 M.

3 Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

4 Vérifier le pH et l'ajuster à 7,35 au besoin.

SOLUTION TAMPON SALIN D'OWREN

200 ml de tampon barbiturique Owren

800 ml de solution physiologique salée (0,9 g% chlorure de sodium)

TAMPON IMIDAZOLE

2,72 g imidazole

4,68 g chlorure de sodium

1 Mettre dans une fiole jaugée et dissoudre dans approximativement 650 ml d'eau distillée.

2 Ajouter 148,8 ml d'HCl 0,1 M, et ajuster le pH à 7,3.

3 Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée, au besoin.

RÉACTIFS POUR TESTS DE DÉPISTAGE

Dans les premiers stades de l'investigation et du diagnostic des diathèses hémorragiques, le choix et l'application de réactifs appropriés pour les tests de dépistage, surtout pour le temps de prothrombine (TP) et le temps de céphaline activée (TCA), sont d'une grande importance. Dans le monde, beaucoup de réactifs différents sont disponibles sur le marché. Quand un large éventail est proposé, le choix effectué doit tenir compte des variations sur le plan de la sensibilité. Dans le dépistage des troubles du saignement par le TP et le TCA, les sources de renseignements suivantes, qui ont trait à la performance probable d'un réactif donné, peuvent être considérées :

- Données comparatives ayant trait aux autres réactifs issues des programmes de contrôle de qualités externes (CQE), comme le programme international de CQE de la FMH (voir le chapitre 5)
- Données publiées
- Tester à l'échelle locale des plasmas des patients ayant des anomalies connues
- Les fiches techniques des fabricants

La production locale de réactifs de TP et de TCA peut sembler attrayante sur le plan financier, mais elle peut être la source de problèmes de standardisation et doit par conséquent être évitée.

Il faut aussi remarquer que certains fabricants proposent plusieurs réactifs. De plus, la composition des réactifs portant le même nom peut être modifiée de temps à autre. Ceci signifie qu'il est impossible de recommander l'usage d'une source particulière de matériel.

10 Numération plaquettaire

PRINCIPE

Le sang est mélangé à un diluant qui cause l'hémolyse des globules rouges. Un hémocytomètre est rempli avec du liquide pour dilution et les plaquettes sont comptées au microscope, préférablement à l'aide d'un microscope à contraste de phase, si possible.

MATÉRIEL/ÉQUIPEMENT

- Hématimètre mince à fond plat (hémocytomètre à contraste de phase avec quadrillage de Neubauer)
- Microscope à contraste de phase muni d'un condenseur de phase à distance de travail élevée, si disponible; sinon, un microscope optique ordinaire)
- Pipette de 20 μ l
- Pipette graduée de 2 ml
- Tube de 12 $\times$ 75 mm
- Agitateur mécanique

RÉACTIF

Liquide pour dilution : 1 % oxalate d'ammonium dans de l'eau distillée
Conserver au réfrigérateur et toujours filtrer juste avant l'usage.

SPÉCIMEN

Si l'échantillon sanguin provient d'une piqûre au doigt, la ponction doit être propre et le sang doit s'écouler librement. Essuyer la première goutte de sang. Si l'échantillon sanguin provient de sang veineux, il doit être recueilli dans une seringue en plastique (ou en verre siliconé) sèche munie d'une aiguille courte de calibre 21 minimum. L'aiguille doit être retirée avant de mettre le sang dans un récipient en plastique contenant l'EDTA. Le sang et l'anticoagulant doivent être mélangés ensemble immédiatement et doucement, afin d'éviter la formation de mousse.

MÉTHODE

- 1 Pipetter 0,38 ml de liquide de dilution dans un tube à essai.
- 2 Remplir la pipette de 20 μ l jusqu'à la marque et essuyer l'extérieur de la pipette.

- 3 Expulser le contenu de la pipette dans le liquide de dilution et nettoyer la pipette en tirant et en expulsant le sang dans le tube à quelques reprises. Agiter pendant au moins 10 minutes à la main ou, préférablement, au moyen d'un agitateur mécanique.
- 4 Remplir l'hémocytomètre, comme décrit ci-dessous.
- 5 Placer la chambre dans une boîte de Pétri pendant 10 à 20 minutes pour permettre aux plaquettes de se déposer. Poser un morceau de coton trempé ou de papier filtre mouillé au fond du récipient afin d'éviter l'évaporation.
- 6 À l'aide d'un microscope, compter les plaquettes situées dans les grands carrés de 1 mm (= 0,1 µl). Compter les plaquettes dans autant de carrés qu'il faut pour en compter au moins 100. Les plaquettes ont une apparence ronde ou ovale et leur structure granulaire interne et leur lustre violacé leur permettent d'être distingués des débris. Des images parasites des globules rouges qui ont été lysés par l'oxalate d'ammonium peuvent être vues dans l'arrière-plan. Si le contraste de phase n'est pas disponible, un microscope optique ordinaire peut être utilisé, pourvu que le condenseur soit baissé de sorte que la lumière soit de faible intensité.
- 7 Calculer le nombre de plaquettes par litre de sang, conformément à la formule indiquée ci-dessous.

L'HÉMOCYTOTMÈTRE

La chambre de comptage de l'hémocytomètre, avec quadrillage Neubauer ou quadrillage Neubauer amélioré, est construite de sorte que la distance entre la paroi inférieure du couvre-objet et la surface de la chambre est de 0,1 mm. La surface de la chambre contient deux aires spécialement quadrillées avec les dimensions indiquées à la Figure 10.1. L'aire de 1 mm² au centre comporte des frontières doubles ou triples. La partie centrale contient 25 carrés dans le quadrillage Neubauer amélioré et 16 carrés dans le quadrillage Neubauer. Chaque carré a une aire de 0,04 mm² (0,2 × 0,2 mm). Ces carrés sont, à leur tour, divisés en plus petits carrés mesurant chacun 0,0025 mm² (0,05 × 0,05 mm). Les quadrants à l'extérieur de la partie quadrillée sont chacun de 1 mm² et sont divisés en 16 carrés.

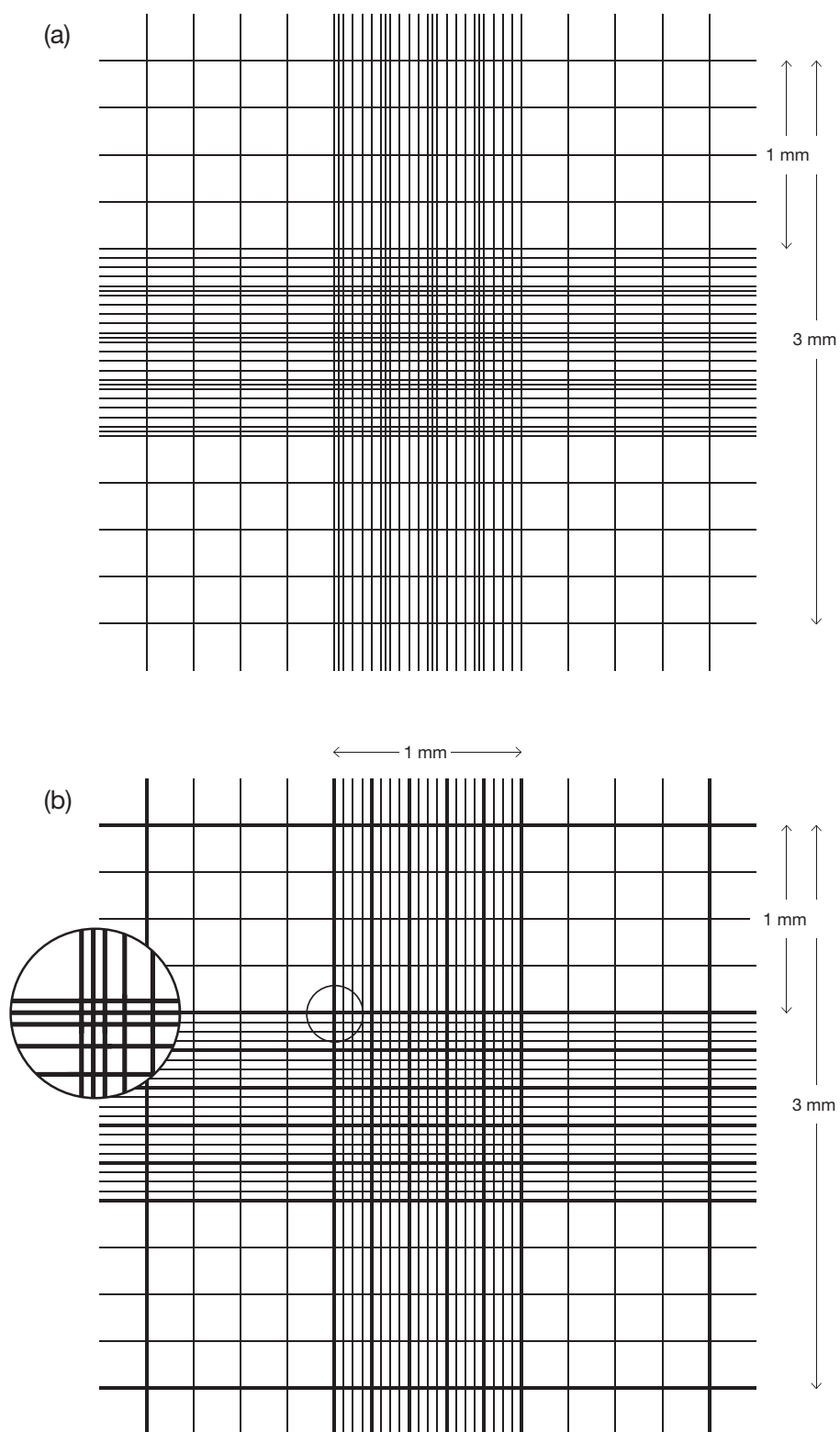
CALCULS

La formule servant à calculer la numération cellulaire est :

$$\text{Numération (cellules/l)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

- Où
- N = nombre total des cellules comptées
 - D = dilution
 - A = aire totale comptée (en mm²)
 - 10 = facteur servant à calculer le volume en ml à partir de l'aire (in mm²) et la profondeur de la chambre (0,1 mm)
 - 10⁶ = facteur de conversion de numération/µl à numération/l

Figure 10.1. Chambre de comptage de l'hémocytomètre (a) Neubauer et (b) Neubauer amélioré



SOURCES D'ERREUR DANS LA NUMÉRATION CELLULAIRE

Lorsque du sang capillaire est utilisé, une goutte coulant librement doit être obtenue.

Lorsque du sang anticoagulé est utilisé, le spécimen doit être mélangé avec soin en inversant le tube de sang au moins 20 fois avant d'en prélever un échantillon. Ne pas agiter le tube, puisque l'agitation crée de la mousse, ce qui rend un pipetage précis impossible. Incliner le tube bien mélangé à un angle de 45° ou un peu plus et pipetter du rebord du tube, en suivant la même procédure que celle utilisée pour le sang capillaire.

Les pipettes pour échantillons sanguins doivent être propres et sèches.

La pipette doit être remplie rapidement et le sang doit être prélevé de façon précise en utilisant un dispositif de succion fixé à la pipette, la remplissant jusqu'à la marque désirée. Si la ligne est légèrement dépassée, l'excédent de sang peut être expulsé en touchant le bout de la pipette avec un morceau de papier filtre ou un mouchoir. Si la ligne est dépassée, une nouvelle pipette doit être utilisée.

Il ne doit pas y avoir de bulles d'air dans la colonne de sang.

Tout sang se trouvant sur l'extérieur de la pipette doit être essuyé (en prenant soin de ne pas extraire de sang du bout de la pipette) avant de l'introduire dans le liquide de dilution.

Une fois le contenu de la pipette versé dans le diluant, le liquide de dilution doit ensuite être aspiré de façon régulière dans la pipette et ce à plusieurs reprises, afin d'assurer que tout le sang est expulsé dans le liquide.

Le tube qui contient le sang dilué doit être agité doucement pendant au moins deux minutes à la main ou, préférablement, par un agitateur mécanique. Une fois le tube agité, la chambre est remplie immédiatement au moyen d'une pipette Pasteur ou d'un tube capillaire.

La chambre est remplie par action capillaire, avec l'écoulement du liquide de la pipette ou du capillaire réglé de sorte qu'il remplisse la chambre rapidement et sans heurts. Elle doit être remplie complètement, mais le liquide ne doit pas déborder jusqu'aux cavités. Laisser les cellules se déposer dans l'aire de la numération pendant 10 à 20 minutes et procéder au dénombrement.

La chambre de l'hémocytomètre et le couvre-objet doivent être propres et secs avant d'être utilisés. Des empreintes digitales ou un film huileux peuvent causer des erreurs importantes.

Un nombre suffisant de cellules doivent être comptées pour réduire l'erreur due à la distribution aléatoire des cellules. En pratique, au moins 100 cellules doivent être comptées. En guise de vérification additionnelle concernant la distribution correcte des cellules dans la chambre, le nombre de cellules comptées dans chaque aire (p. ex. dans les grands carrés) ne devrait pas différer par plus de 10 %.

CONTRÔLES

Deux dilutions doivent être effectuées et la moyenne des deux dénombrements doit être calculée; les deux dénombrements ne doivent pas différer par plus de 10 %.

SOURCES D'ERREUR DANS LA NUMÉRATION PLAQUETTAIRE

Le sang obtenu par une prise sang veineux est préférable au sang capillaire, puisque les plaquettes adhèrent à la blessure et les dilutions successives obtenues d'une piqûre au doigt ne sont pas toujours reproductibles.

Les erreurs générales du pipetage et de l'hémocytométrie sont décrites ci-dessus. De plus, une attention particulière doit être portée pour garantir la propreté irréprochable de la chambre de comptage, car des saletés et des débris peuvent être comptés comme des plaquettes. Lavez la chambre avec de l'eau savonneuse et rincez-la avec de l'eau distillée. Laissez-la sécher et essuyez-la avec un chiffon non pelucheux. Assurez-vous que le couvre-objet est propre avant de vous en servir.

La présence d'amas de plaquettes empêche tout dénombrement fiable. Si l'échantillon contient des amas, un nouvel échantillon doit être prélevé.

Le diluant à l'oxalate d'ammonium doit être conservé au réfrigérateur et doit être jeté s'il y a des signes de contamination bactérienne.

Le spécimen doit être soumis au comptage dans un délai de trois heures suivant la prise de sang.

PRINCIPE

Le temps de saignement est le temps nécessaire à l'arrêt du saignement après une incision cutanée normalisée (d'une profondeur et d'une longueur déterminées).

Une prolongation du temps de saignement survient chez des patients atteints de thrombocytopénie, de la maladie de von Willebrand, de la maladie de Glanzmann, du syndrome de Bernard-Soulier, de la maladie du pool vide et d'autres désordres plaquettaires. Le fibrinogène est requis et un rôle pour le facteur V est suggéré. Le temps de saignement peut par conséquent être prolongé chez les patients déficients en fibrinogène ou en facteur V. Une prolongation du temps de saignement est observée également chez certains patients atteints de maladie rénales, de dysprotéinémies et de troubles vasculaires.

MATÉRIAUX/ÉQUIPEMENT

- Sphygmomanomètre
- Tampon de désinfection
- Dispositif pour la détermination du temps de saignement
- Papier-filtre de 1 mm d'épaisseur
- Chronomètre

MÉTHODE

- 1 Le brassard du sphygmomanomètre est placé autour du bras et gonflé à 40 mm de mercure. Cette pression est maintenue tout au long du test.
- 2 Nettoyer la surface dorsale de l'avant-bras et placer le dispositif pour la détermination du temps de saignement fermement contre la peau, sans exercer de pression. Appuyer sur la détente et enclencher le chronomètre.
- 3 Les veines superficielles, les cicatrices et les ecchymoses devraient être évitées.
- 4 A des intervalles de 30 secondes, absorber le sang qui s'écoule avec du papier filtre. Approcher le papier filtre près des incisions sans en toucher les bords.
- 5 Noter le temps écoulé entre la ponction et la cessation du saignement.

INTERPRÉTATION

L'intervalle de référence chez les adultes peut aller jusqu'à huit minutes, mais peut varier selon la méthode utilisée.

NOTES

- Au moment où a été rédigé le présent document, il existait deux dispositifs à usage unique sur le marché servant à déterminer le temps de saignement. Un intervalle de référence doit être établi localement quelque soit le dispositif utilisé.
- L'incision doit être faite parallèlement à la longueur du bras. Les incisions perpendiculaires saignent plus longtemps.
- Si le résultat est anormal il faut répéter le test.
- Il n'est pas nécessaire d'aller jusqu'à l'arrêt du saignement si le saignement dure plus de 20 minutes.
- L'effet de médicaments qui interfèrent avec la fonction plaquettaire doit être pris en considération. Par exemple, les médicaments qui contiennent de l'aspirine peuvent prolonger le temps de saignement. Donc, lorsque possible, ces médicaments ne devraient pas être pris durant les sept jours précédant le test.
- Il est possible qu'une cicatrice perdure à l'endroit où les incisions ont été faites. Le patient doit en être mis au courant de cette possibilité avant de faire l'incision.

RÉFÉRENCE

Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52:210-211.

PRINCIPE

Ce test reflète l'efficacité globale du système extrinsèque. Il est sensible aux variations des taux de facteurs V, VII et X, et, dans une moindre mesure, au facteur II (prothrombine). Il ne convient pas non plus à la détection de variations mineures du fibrinogène, mais peut être anormal si le niveau de fibrinogène est très faible ou s'il y a présence d'un inhibiteur. La sensibilité du test dépend du réactif et la technique utilisés et il est important d'établir localement un intervalle de référence.

La voie mesurée par le temps de prothrombine est illustrée à la Figure 12.1 ci-dessous. Le réactif pour mesurer le temps de prothrombine, communément nommé thromboplastine, contient du facteur tissulaire et des phospholipides.

De nombreux réactifs appropriés sont proposés sur le marché. Le chapitre 9 contient des notes portant sur la sélection du réactif.

RÉACTIFS

- Thromboplastine (peut contenir du chlorure de calcium)
- 25 mM chlorure de calcium (uniquement nécessaire si le réactif de thromboplastine ne contient pas de calcium)

MÉTHODE : MANUELLE

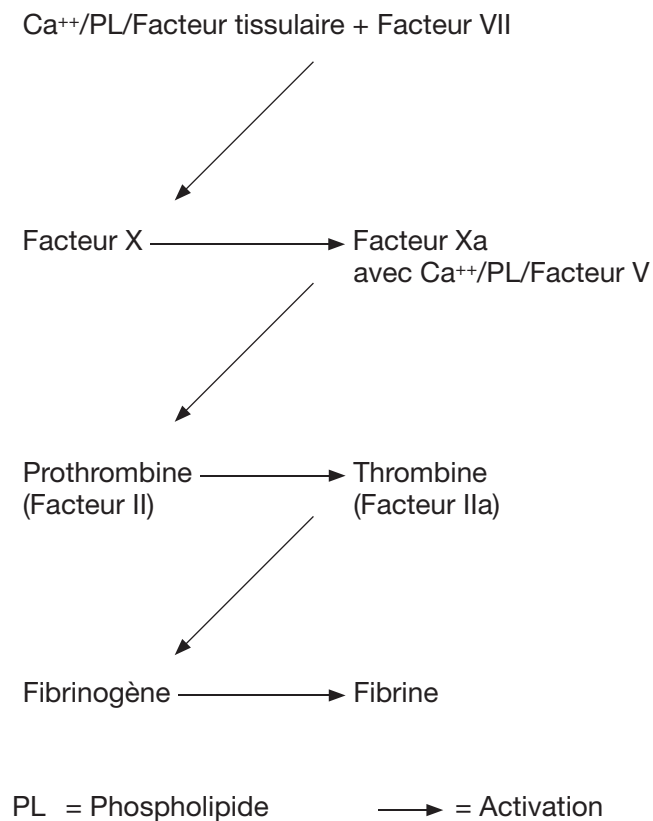
- 1 Ajouter aux deux premiers tubes 0,1 ml de plasma normal et chauffer à 37 °C pendant 2 minutes.
- 2 Ajouter 0,2 ml de réactif de thromboplastine (s'il y a du calcium dans le réactif préchauffé (à 37 °C).
- 3 Déclencher le chronomètre, mélanger et noter les temps de coagulation.
- 4 Répéter pour chaque échantillon à tester.
- 5 Noter le temps de coagulation du patient en secondes.

Pour la technique manuelle, effectuer tous les tests en double. Les temps de coagulation effectués en double ne devraient pas différer de plus de 10 %. Pour les tests automatisés dont le coefficient de variation inter-essai est inférieur à 5 %, les tests effectués en simple sont généralement acceptables, pourvu que les temps de coagulation prolongés soient vérifiés.

NOTES

- Si le réactif de thromboplastine ne contient pas de calcium, le déroulement des essais est : 0,1 ml plasma, 0,1 ml thromboplastine et coagulation avec 0,1 ml de chlorure de calcium 25 mM préchauffé.
- L'activation du facteur IX par le facteur tissulaire : facteur VII se produit *in vivo*. Dans les conditions de la plupart des tests de TP, le facteur X est si fortement activé que le test n'est pas sensible à la déficience en facteurs IX ou VIII.
- La thromboplastine et le chlorure de calcium doit être préchauffés pendant 5 à 30 minutes avant d'être utilisés.
- Les différents coagulomètres utilisés influencent généralement les temps de coagulation, en fonction de la méthode de détection du point final et le temps nécessaire à cette détection. Ceci souligne davantage l'importance d'établir des intervalles de référence dans le laboratoire pour la méthode utilisée localement.
- En présence de déficiences légères en facteurs II, V, VII ou X, le degré de prolongation peut être minime. En cas de déficience du facteur II, le TP peut se situer dans l'intervalle de référence.
- La présence d'anticoagulants lupiques ou d'anticorps antiphospholipides peut avoir un effet sur certains réactifs de TP et certains types d'anticorps rares peuvent prolonger le TP sans prolonger le TCA. Les réactifs contenant des concentrations relativement faibles en phospholipides sont plus susceptibles d'être affectés, particulièrement certains réactifs qui sont fabriqués en modifiant, à l'aide d'un lipide, le facteur tissulaire recombinant.
- La présence de facteur VII activé peut raccourcir le TP, soit lors d'une thérapie avec le facteur VIIa recombinant ou lorsque le facteur VII endogène a été activé. Cet effet dépend du facteur tissulaire utilisé dans le réactif. Les réactifs contenant du facteur tissulaire bovin sont particulièrement sensibles à cet effet (Kitchen et al., 1992). Les échantillons sanguins ne doivent pas être stockés entre 2 et 8 °C avant la détermination du TP, puisque il peut se produire une activation du facteur VII par le froid.
- Le sang total servant à la détermination du TP peut être stable pendant au moins 24 heures, en fonction des réactifs utilisés (Baglin et Luddington, 1997).
- Les TP déterminés par des réactifs contenant du facteur tissulaire humain peuvent différer de ceux obtenus avec des réactifs contenant du facteur tissulaire d'autres espèces, comme le lapin. Dans de tels cas, le résultat obtenu avec le réactif au facteur tissulaire humain peut être plus révélateur d'un risque de saignement.
- Pour une discussion exhaustive des questions relatives à la détermination du TP, voir CLSI (2008).

Figure 12.1. Voie mesurée par le test du temps de prothrombine



RÉFÉRENCES

Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68:301-5.

13 Temps de céphaline activée (TCA)

PRINCIPE

Il s'agit ici d'un test global de la voie intrinsèque dont le nom anglais est *activated partial thromboplastin time* (aPTT). C'est le test de dépistage le plus utile pour détecter les déficiences en facteurs VIII, IX, XI et XII pour autant que le temps de prothrombine soit dans l'intervalle de référence.

Le TCA sera également prolongé en présence de toute déficience de facteurs de la voie commune (déficiences en facteurs V, X, II et, dans une moindre mesure, en fibrinogène) et en présence d'inhibiteurs. La présence de certains anticoagulants à vue thérapeutique, comme l'héparine, prolonge aussi le TCA. En présence d'un TCA prolongé, il est important de pouvoir exclure la présence de ce type de d'anticoagulant dans l'échantillon.

Le TCA est prolongé en présence de déficiences en prékallicréine ou en kininogène de haut poids moléculaire, pour autant que le réactif utilisé ne contienne pas de l'acide ellagique comme activateur. Si le réactif contient de l'acide ellagique comme activateur le TCA sera normal même en l'absence totale de ces facteurs.

La voie intrinsèque, mesurée par le TCA, est illustrée dans la Figure 13.2.

RÉACTIFS

- Réactif pour la détermination du TCA (céphaloplastine)
- Chlorure de calcium 25 mM

MÉTHODE

- 1 Mettre le tube contenant le chlorure de calcium dans un bain à 37 °C pendant cinq minutes avant usage.
- 2 Mettre deux tubes en verre dans le bain à 37°C et pipetter 0,1 ml de céphaloplastine.
- 3 Pipetter 0,1 ml de plasma témoin dans le premier tube.
- 4 Déclencher le chronomètre et mélanger.
- 5 Ajouter 0,1 ml de plasma dans le deuxième tube et mélanger.

-
- 6 Une fois écoulé le temps d'incubation recommandé*, ajouter successivement 0,1 ml de chlorure de calcium dans chaque tube et déclencher à nouveau le chronomètre. Mélanger. Noter le temps nécessaire à la formation du caillot.
-

Pour la technique manuelle, effectuer tous les tests en double. Les temps de coagulation des deux tubes ne devraient pas varier de plus de 10 %. Pour les tests automatisés comportant un coefficient de variation inter-essai de moins de 5 %, il est généralement accepté qu'il n'est pas nécessaire de réaliser les dosages en double.

* Les recommandations du fabricant de la céphaloplastine devraient être respectées. Le temps d'incubation varie en général de deux à cinq minutes. Il est important que la période d'incubation soit chronométrée avec précision, parce que des écarts auront une influence sur les temps de coagulation. Les incubations plus longues raccourciront le temps de coagulation pour une céphaloplastine donnée.

INTERPRÉTATION

L'intervalle de référence doit être établi localement.

Un TCA prolongé avec un TP normal suggère la possibilité d'une déficience en facteurs VIII, IX, XI, XII, de kininogène de haut poids moléculaire, de prékallikréine ou la présence d'un inhibiteur. En cas TCA prolongé, il est recommandé de refaire le test avec un mélange composé de parts égales de plasma normal et du plasma du patient (désigné comme solution 50:50 ci-dessous). Si le TCA du mélange corrige plus de 50 % de la différence entre le temps de coagulation du plasma du patient et le plasma normal, il faut suspecter une déficience en facteur(s) dans le plasma du patient. Une correction plus faible suggère la présence d'un inhibiteur dirigé contre l'un des facteurs de la voie intrinsèque ou d'un inhibiteur de type non spécifique, comme l'anticoagulant de type lupique (voir le chapitre 25).

Figure 13.1. Un exemple d'interprétation du TCA

Échantillon	Résultat
TCA témoin	35 secondes
Test	60 secondes
Mélange 50:50	42 secondes (il s'agit d'une bonne correction, donc il existe probablement une déficience en facteur(s))
Mélange 50:50	52 secondes (il s'agit d'une correction faible, il y a donc probablement présence d'un inhibiteur)

NOTES

- Beaucoup de céphaloplastines sont disponibles sur le marché. Celles-ci contiennent des composants présentant des degrés de sensibilité variés. Des indications concernant la sélection d'une céphaloplastine se trouvent au chapitre 9.
- Comme pour le TP, les temps de coagulation du TCA peuvent être influencés par l'utilisation d'un coagulomètre.
- Des niveaux élevés d'un facteur de coagulation peuvent compenser des niveaux plus bas d'autres facteurs. Par exemple, un facteur VIII très élevé lors d'une réaction de phase aiguë peut entraîner un TCA normal en présence d'une réduction en facteurs IX et XI, ce qui pourrait être cliniquement important. Si un patient présente des antécédents personnels ou familiaux caractéristiques, suggérant l'existence d'une diathèse hémorragique, une recherche plus approfondie, comprenant des dosages de facteurs de coagulation particuliers, peut être justifiée en présence d'un TCA normal, surtout si son résultat se situe dans la partie supérieure de l'intervalle de référence.
- La concentration en phospholipides varie considérablement d'un réactif à l'autre. Il s'agit de l'une des raisons pour lesquelles la sensibilité des réactifs à la présence d'anticoagulants lupiques varie de façon marquée. Si une céphaloplastine sensible à l'anticoagulant de type lupique est utilisée lors du TCA initial, il s'avère utile d'effectuer un deuxième TCA en utilisant une céphaloplastine telle que l'Actin FS (Siemens, Marburg, Allemagne), qui contient une concentration très élevée de phospholipides (Kitchen et al. 1999). Si la prolongation observée avec le premier réactif est causée par l'anticoagulant de type lupique, alors le deuxième TCA sera presque toujours normal, puisque très peu d'anticoagulants de type lupique prolongent le TCA lorsque l'Actin FS est utilisée.

INVESTIGATIONS PORTANT SUR UN TCA PROLONGÉ ISOLÉ

L'ordre logique des étapes à suivre pour investiguer des patients qui présentent un temps de prothrombine normal et un TCA prolongé est le suivant :

- 1 Mesurer le temps de thrombine (voir le chapitre 15). Si celui-ci est normal, passer aux étapes 2 et 3. Si le temps de thrombine est prolongé, répéter le test en présence de sulfate de protamine (voir le chapitre 16). Si le temps de thrombine est corrigé et normalisé, ceci suggère la présence d'héparine et il ne sera pas nécessaire d'effectuer les tests approfondis indiqués ci-dessous. Si l'on suspecte que le patient ne prend pas d'héparine sous quelque forme que ce soit, un nouvel échantillon devrait être demandé.
- 2 Déterminer le TCA sur un mélange formé de parts égales de plasma normal et de plasma du patient (voir le chapitre 14) (50 % de chaque). Un mélange à 50 % qui ne parvient pas à corriger et normaliser le TCA indique la présence d'un inhibiteur.

3 Déterminer le TCA avec une deuxième céphaloplastine contenant une concentration en phospholipides élevée, telle que l'Actin FS (Siemens). Si le TCA initial est nettement prolongé (par au moins trois secondes au-dessus de la limite supérieure de l'intervalle de référence utilisé) et que le TCA avec l'Actin FS est normal, un anticoagulant de type lupique est probablement la cause de l'allongement du TCA initial. Ceci peut être confirmé ultérieurement au moyen de tests spécifiques comme le temps de venin de la vipère de Russell dilué (Diluted Russel Viper Venom Time, DRVVT; voir le chapitre 38), bien que ceci ne soit généralement pas nécessaire sauf si une demande de recherche d'anticoagulant de type lupique a été formulée dans le cadre d'une investigation de diathèse thrombotique. Une autre cause possible, mais très rare, d'un TCA normal avec l'Actin FS et un TCA prolongé avec une céphaloplastine ayant de la silice ou du kaolin comme activateur, est la déficience en prékallikréine. A l'instar des anticoagulants lupiques, cela ne prédispose pas à un risque de saignement. Dès lors, la confirmation peut ne pas être requise.

4 Lorsque le TCA initial est nettement prolongé (par trois secondes ou plus) et que le TCA avec l'Actin FS est normal, il n'est pas nécessaire de procéder à des dosages de facteurs.

5 Si les deux TCA sont prolongés, effectuer le dosage des facteurs VIII:C, IX et XI si nécessaire (voir le chapitre 23). Un dosage de FXII peut être effectué si nécessaire, puisqu'il s'agit d'une déficience relativement courante et que la mise en évidence de celle-ci peut alors expliquer la prolongation du TCA. Il n'est pas nécessaire d'exclure la présence d'une diathèse hémorragique, puisqu'une déficience en facteur XII n'est pas associée à un risque accru de saignement.

6 Les céphaloplastines comme l'Actin FS, qui contient de l'acide ellagique comme activateur, donnent des résultats normaux et ce même en présence d'importantes déficiences en prékallikréine.

Au besoin, les étapes 1 à 3 peuvent être exécutées simultanément pour gagner du temps.

NOTES

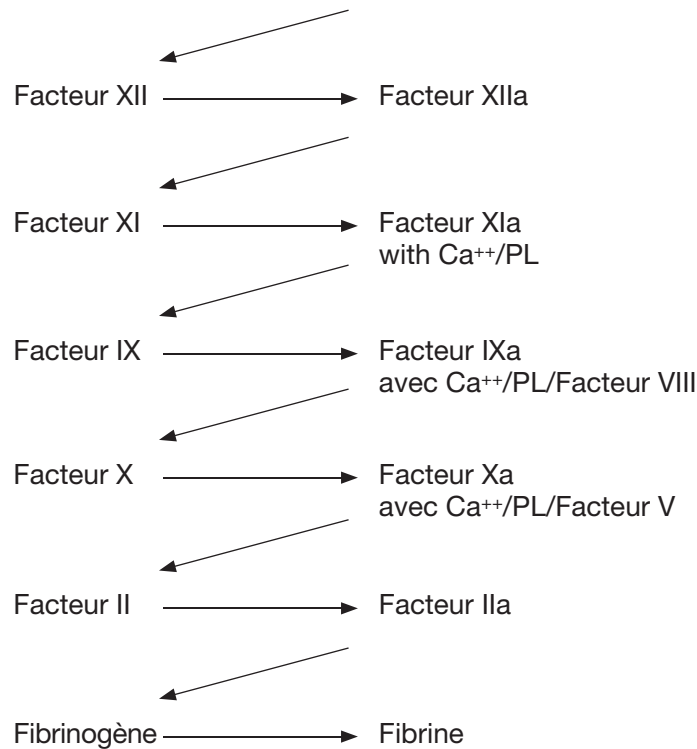
- Un TCA normal avec l'Actin FS, combiné à un TCA initial prolongé (Synthasil/IL), exclue généralement la présence d'une déficience du facteur VIII, IX ou XI et, dans ce cas, il n'est pas nécessaire d'effectuer des dosages de facteurs.
- Quelle que soit la céphaloplastine utilisée, une légère diminution des facteurs IX ou XI (30-50 U/dl) accompagnée d'une élévation importante du facteur VIII résulte en un TCA normal.
- Le TCA mesuré avec l'Actin FS est généralement normal lorsque le taux de facteur XII est diminué (20 U/dl à 50 U/dl) alors que le TCA obtenu avec une céphaloplastine dont l'activateur est à base de kaolin ou de silice est légèrement prolongé. Cette déficience n'a aucun retentissement clinique.

- Des anticoagulants de type lupique très puissants prolongent le TCA réalisé avec l'Actin FS.
- Les anticorps dirigés contre le facteur VIII (ou IX ou XI) prolongent le TCA, quelle que soit la céphaloplastine utilisée.

Pour une discussion complète des questions relatives à la détermination du TCA, voir CLSI (2008).

Figure 13.2. Voie mesurée par le TCA

Activation par contact impliquant la la prékallicréine, le kininogène de haut poids moléculaire et une surface à charge négative



PL = Phospholipide —→ = Activation

RÉFÉRENCES

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of 7 APTT reagents in relation to heparin sensitivity *Br J Haematol* 1999; 106:801-8.

Tests de mélange pour l'investigation approfondie de TP et de TCA prolongés

14

PRINCIPE

Les échantillons qui montrent des résultats anormaux aux tests de dépistage (p. ex. TP/TCA) peuvent être investigués davantage afin de définir l'anomalie en effectuant des tests de mélange. Avant tout, il est important de démontrer que le défaut présent dans le plasma de ces patients peut être corrigé avec du plasma normal afin d'exclure la présence d'un inhibiteur. La correction de l'anomalie par l'ajout de l'un des réactifs décrits ci-dessous indique que le réactif ajouté doit contenir la substance dont l'échantillon testé est déficient.

Les tests de dépistage anormaux sont répétés sur des mélanges à volumes égaux (ci-après nommé 50:50) d'additif et de plasma à tester.

Les agents suivants peuvent être utilisés dans les tests de mélange :

- Plasma normal
- Plasma vieilli
- Plasma adsorbé
- Plasma déficient en facteur VIII
- Plasma déficient en facteur IX

PLASMA VIEILLI

- 1 Du sang veineux normal (9 volumes) est ajouté à un volume de 0,1 M d'oxalate de sodium.
- 2 Le sang est centrifugé pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes, décanté dans des conditions stériles et incubé à 37 °C pendant deux à trois jours.
- 3 Le temps de prothrombine à la fin de cette période doit être supérieur à 90 secondes avec des thromboplastines sensibles.
- 4 Le plasma est par la suite aliquoté dans des récipients en plastique et stocké à une température de -35 °C (ou inférieure).

Le plasma vieilli est déficient en facteurs V et VIII.

PLASMA ADSORBÉ

- 1 Un gel d'hydroxyde d'aluminium est préparé en mélangeant 1 g de gel humide à 4 ml d'eau distillée pour donner une suspension homogène.
- 2 Le plasma citraté pauvre en plaquettes est recueilli auprès de cinq donneurs normaux et poolé.
- 3 Un dixième du volume de l'hydroxyde d'aluminium est ajouté au plasma préchauffé, mélangé et incubé pendant trois minutes à 37 °C.
- 4 Le mélange est ensuite immédiatement centrifugé (1700 g, trois minutes, température du laboratoire) pour faire sédimenter le gel.
- 5 Décanner le plasma surnageant dans des tubes en plastique. Il peut être conservé à -35 °C pendant plusieurs semaines.

Le plasma adsorbé est déficient en facteurs II, VII, IX et X (les facteurs qui dépendent de la vitamine K). Son temps de prothrombine devrait atteindre >60 secondes avec un réactif sensible.

Note : Il faut faire preuve de prudence dans le minutage du temps d'adsorption, puisqu'une sur-adsorption aura comme conséquence la perte d'autres facteurs de coagulation.

PLASMA DÉFICIENT EN FACTEURS VIII/IX

Le plasma des patients atteints de graves déficiences isolées (<1 UI/dl) du facteur VIII ou IX est très utile pour les tests par mélange. Le cas échéant, il est préférable d'utiliser ce plasma au lieu du plasma vieilli ou adsorbé. Le plasma sélectionné à cette fin doit avoir un TP normal, ce qui confirme la probabilité que les autres facteurs de coagulation synthétisés dans le foie soient à des taux normaux.

De tels plasmas peuvent être lyophilisés pour la conservation à long terme ou ils peuvent être conservés à l'état de plasma à une température de -35 °C (ou inférieure) pendant au moins trois mois.

En utilisant un mélange composé à 50:50 d'additif et de plasma du patient, une anomalie peut être caractérisée.

Dans des situations où il existe une prolongation isolée du TCA, le plasma déficient en facteur VIII est préférable au plasma vieilli. De même, le plasma déficient en facteur IX est préférable au plasma adsorbé.

NOTES

- L'hydroxyde d'aluminium est vendu par BDH, Poole, BH15 ITD, Angleterre.
- Les plasmas contenant des inhibiteurs non spécifiques qui ont un effet sur le TCA (comme l'anticoagulant lupique) ne présentent typiquement pas de correction; cependant les plasmas qui contiennent des inhibiteurs à titre très faible ou faible peuvent être corrigés partiellement par du plasma normal.

- Les inhibiteurs spécifiques du facteur VIII peuvent être associés à l'absence de correction immédiate du TCA par ajout de plasma normal. Dans d'autres cas, il y a une correction immédiate par ajout de plasma normal, suivi d'un allongement du TCA dans le mélange au cours du temps. Un mélange composé de plasma à tester et de plasma normal peut être testé après une heure à 37 °C et des déterminations de TCA peuvent être effectuées sur du plasma normal et du plasma à tester qui ont été incubés séparément pendant la même période de temps.
- Les inhibiteurs spécifiques des autres facteurs de coagulation sont particulièrement rares, mais ils peuvent exister. Il est impossible de faire des généralisations au sujet de leur comportement dans les expériences de mélange, à l'exception du fait que les inhibiteurs du facteur IX agissent typiquement rapidement.
- La Figure 14.2 illustre quelques exemples de TCA chez des sujets atteints d'hémophilie A acquise. Cette figure montre l'effet obtenu sur le TCA lorsque du plasma normal poolé est ajouté à 20 % et à 50 % à des plasmas ayant différents titres d'anticorps antifacteur VIII. La limite supérieure de l'intervalle de référence de la méthode de TCA utilisée est de 37 secondes. Ceci illustre qu'en présence d'anticorps antifacteur VIII, il peut y avoir, dans certains cas, une correction complète dans un mélange 50:50 de plasma de patient et de plasma normal poolé. Si ces mélanges sont incubés à 37 °C, il y a une prolongation progressive du TCA, puisque l'anticorps antifacteur VIII inhibe le facteur VIII.

Figure 14.1. Résultats du test par mélange en présence de déficiences de facteur individuelles

Déficiences du plasma testé	TCA	Vieilli ou déficient en facteur VIII	Adsorbé ou déficient en facteur IX	Plasma normal
Facteur VIII	anormal	non corr	corr	corr
Facteur IX	anormal	corr	non corr	corr
Facteur XI/XII	anormal	corr	corr	corr
Inhibiteur	anormal	non corr	non corr	non corr

Déficiences du plasma testé	TP	TCA	Plasma vieilli	Plasma adsorbé	Plasma normal
Facteur II	anormal	anormal	corr	non corr	corr
Facteur V	anormal	anormal	non corr	corr	corr
Facteur VII	anormal	norm	corr	non corr	corr
Facteur X	anormal	anormal	corr	non corr	corr

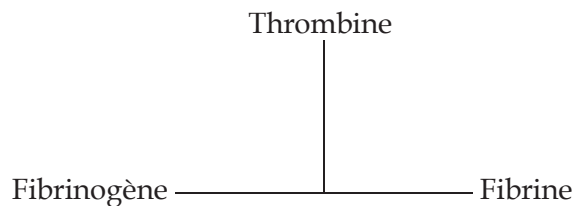
non corr = aucune correction; corr = correction

Figure 14.2. Tests par mélange dans l'hémophilie A acquise

Titre Bethesda (U/ml)	TCA (secondes)	TCA + 20 % de plasma normal (secondes)	TCA+ 50 % plasma normal (secondes)
1.0	210	137	77
1.1	83	52	38
2.0	82	43	34
6.6	107	51	37
8.4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

PRINCIPE

Le temps de thrombine reflète la réaction entre la thrombine et le fibrinogène.



Il est prolongé lorsque le niveau de fibrinogène est bas (inférieur à 1,0 g/l); en présence d'héparine ou de substances analogues à l'héparine; en présence d'autres inhibiteurs, comme les produits de dégradation du fibrinogène (ou de la fibrine, les PDF); et lorsque le fibrinogène est qualitativement anormal (dysfibrinogénémie), incluant à la fois les anomalies congénitales et acquises, secondaires à une atteinte hépatique.

RÉACTIF

Solution de thrombine, qui provoque la coagulation de plasma normal en 15 secondes environ.

Les solutions plus concentrées donnent des temps de coagulation plus courts, ce qui peut résulter en un résultat normal en présence d'anomalies légères.

MÉTHODE : MANUELLE

- 1 Pipetter 0,2 ml de plasma dans un tube en verre.
- 2 Chauffer à 37 °C.
- 3 Ajouter 0,2 ml de thrombine.
- 4 Enclencher le chronomètre. Chronométrer le temps de coagulation.
- 5 Un intervalle de référence doit être établi localement.
- 6 Tester en double.

NOTES

- La concentration en thrombine à utiliser doit être celle qui donne un temps de coagulation d'environ 15 secondes avec du plasma normal poolé (contrôle). Si de la thrombine concentrée est utilisée, la diluer à environ 10-15 U/ml dans une solution saline ou davantage, au besoin, jusqu'à ce que un temps de coagulation approprié soit atteint pour le contrôle.
- La solution de thrombine reconstituée peut être stockée à une température de -35 °C (ou inférieure) et diluée avant d'être utilisée.
- La thrombine diluée se détériore à température de laboratoire.
- Du plasma poolé (servant de contrôle) doit être inclus avec chaque série de tests.

Temps de thrombine en présence de sulfate de protamine pour détecter la présence d'héparine

16

La présence d'héparine non-fractionnée ou d'une certaine quantité d'héparine de bas poids moléculaire peut causer une prolongation du temps de thrombine.

Les plus grandes chaînes d'héparine, qui prolongent le temps de thrombine, peuvent être neutralisées par adjonction de sulfate de protamine (SP). Le sulfate de protamine est disponible dans la pharmacie des hôpitaux, parce qu'il est employé comme agent thérapeutique pour neutraliser l'effet de l'héparine chez les patients.

La concentration du SP dans les préparations thérapeutiques est habituellement beaucoup plus élevée que nécessaire pour les tests de laboratoire. Par conséquent, le cas échéant, le médicament doit être dilué dans une solution saline de façon à atteindre une concentration de 40 mg% pour faire la solution de travail. La solution de travail de thrombine + SP est préparée en mélangeant neuf parts de réactif de thrombine à une part de SP 40 mg%. Celle-ci est ensuite utilisée à la place de la solution de thrombine décrite au chapitre 15. Un contrôle normal doit être testé. Si le temps de thrombine d'un échantillon est prolongé, mais se corrige à moins de deux secondes du résultat du contrôle, la présence de l'héparine est confirmée.

17 Temps de reptilase

PRINCIPE

La reptilase est un venin obtenu du serpent *Bothrops atrox*. Il contient un enzyme qui ressemble à la thrombine et qui agit directement sur le fibrinogène et le convertit en fibrine. Il n'est pas inhibé par les antithrombines et il est donc actif en présence d'héparine. Par conséquent, il peut être utilisé pour évaluer le taux de conversion de fibrinogène à fibrine en présence de l'héparine.

Il est utile de vérifier si un temps de thrombine prolongé est causé ou non par la présence d'héparine dans l'échantillon. Si le temps de thrombine est prolongé et le temps de reptilase est normal, la cause la plus probable sera la présence de l'héparine. En présence de dysfibrinogénémie, le temps de reptilase peut être plus sensible (c.-à-d. plus long) que le temps de thrombine.

RÉACTIFS

- Reptilase (Sigma Aldrich, Code V5375) dissout à une concentration de 25 mg dans 15 ml de tampon d'Owren. Ce venin à l'état brut est dangereux et il faut faire attention de ne pas inhaler la poudre. Le technicien doit porter des gants et un masque lorsqu'il manipule le venin brut. La solution originale doit être conservée congelée à -70 °C dans des aliquotes de 0,5 ml. Elle est stable pendant au moins deux ans dans ces conditions.

Afin de préparer du réactif prêt à l'emploi, décongeler et diluer une part de la solution originale dans 10 parts de tampon d'Owren. Aliquoter et recongeler à -70 °C pour usage ultérieur. Ce réactif prêt à l'emploi est stable pendant au moins trois mois dans ces conditions.

Les aliquotes congelés prêts à l'emploi doivent être décongelés dans un bain-marie à 37 °C pendant au moins trois minutes. Cette solution est ensuite stable pendant au moins 12 heures à la température du laboratoire (de 20 °C à 25 °C).

- Plasma normal : le plasma normal poolé est préparé selon la description donnée au chapitre 7. Décongeler dans un bain-marie à 37 °C pendant environ trois minutes.

MÉTHODE

Effectuer tous les tests en double.

- 1 Mettre un nombre suffisant de tubes de coagulation 75 x 10 mm dans un bain-marie à 37 °C (deux par patient et deux pour le contrôle).

- 2 Pipetter 0,3 ml de plasma (contrôle ou patient) dans les tubes de coagulation préchauffés.
- 3 Chauffer pendant une à deux minutes.
- 4 Ajouter 0,1 ml de la solution de reptilase et enclencher le chronomètre.
- 5 Incliner à trois reprises pour mélanger et incliner trois autres fois toutes les cinq secondes jusqu'à la formation du caillot.
- 6 Noter le temps de coagulation.
- 7 Le temps du contrôle doit être entre 15 à 18 secondes (s'il est plus court, ajuster en diluant davantage le réactif de reptilase avec du tampon d'Owren).
- 8 Si aucune coagulation ne se produit, noter le résultat comme >90 secondes.

INTERVALLE DE RÉFÉRENCE

Le temps du patient doit se situer à trois secondes près du temps du contrôle. Le temps du patient et le temps du contrôle doivent être rendus.

INTERPRÉTATION

Figure 17.1. Interprétation du temps de thrombine prolongé

Temps de thrombine	Temps de reptilase	Cause	Commentaires
Prolongé	Également prolongé	Hypo- ou afibrinogénémie	Mesurer le fibrinogène
Prolongé	Fortement prolongé	Dysfibrinogénémie	Congénital ou acquis
Prolongé	Normal	Héparine	
Prolongé	Légèrement prolongé	Héparine et une certaine hypo- ou dysfibrinogénémie	De rares cas de dysfibrinogénémie peut donner ce résultat
Prolongé	Également prolongé	Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)	Mesurer les D-dimères

NOTE

Des réactifs commerciaux de reptilase sont proposés par plusieurs fabricants sous forme de concentré prêt à l'emploi. L'avantage de ceux-ci est qu'ils éliminent le



besoin de manipuler le venin brut, qui comporte des risques pour la santé et la sécurité. Si vous utilisez l'un de ceux-ci, suivez les directives du fabricant quant à l'emploi. L'intervalle de référence peut différer de celui décrit ci-dessus, mais l'interprétation des résultats correspond à celle indiquée à la Figure 17.1. Comme la reptilase est un réactif coûteux, la méthode de neutralisation de la protamine/ temps de thrombine (chapitre 16) peut être utilisée pour confirmer la présence d'héparine dans l'échantillon à tester.

PRINCIPE

Des dilutions d'un plasma normal standard dont le contenu en fibrinogène est connu sont préparées avec une solution tampon imidazole. Mesurer le temps de coagulation après adjonction de thrombine et tracer un graphique.

Le temps de coagulation est proportionnel à la concentration en fibrinogène et la dilution 1/10 est considérée comme représentant la valeur de la préparation standard. Le plasma à tester est dilué à 1/10, et le résultat est lu à partir de la courbe étalon.

RÉACTIFS

- Plasma normal ou de référence dont la concentration en fibrinogène est connue
- Thrombine 30 U/ml-100 U/ml (la concentration peut varier selon la source)
- Tampon imidazole (glyoxaline) ou tampon d'Owren pH 7,35

MÉTHODE

- 1 Préparer des dilutions de 1/5, 1/10, 1/15, et 1/20 de plasma normal dans du tampon imidazole.
- 2 Pipetter en double des volumes de 0,2 ml de chaque dilution dans des tubes de coagulation en verre.
- 3 Chauffer à 37 °C pendant deux minutes.
- 4 Ajouter 0,2 ml de thrombine (30 U/ml-100 U/ml) et chronométrer le temps de formation du caillot.
- 5 Pour les techniques manuelles, faire les essais en double. Ceci n'est pas nécessaire pour la plupart des coagulomètres lorsque le test est automatisé.
- 6 Dessiner la courbe du temps de coagulation moyen de chaque dilution en fonction des concentrations de fibrinogène sur du papier logarithmique, en se servant de la dilution de 1/10 comme valeur de référence.
- 7 Diluer le plasma à tester à 1/10, déterminer le temps de coagulation et lire la valeur sur le graphique.

L'intervalle de référence doit être établi localement, mais celui-ci se situe généralement entre 1,5 g/l à 3,5 g/l.

Dans la plupart des techniques de type Clauss, la relation qui existe entre le temps de coagulation et la concentration de fibrinogène est linéaire sur un intervalle limité du temps de coagulation, qui se situe typiquement entre 10 et 25 secondes.

- Une dilution 1/10 peut être utilisée pour les plasmas normaux.
- Pour les concentrations plus faibles (par exemple 0,75 g/l – 1,5 g/l), le plasma doit être dilué à 1/5 (la valeur en fibrinogène lue sur le graphique doit être divisée par 2).
- Pour les niveaux <0.75 g/l, le plasma à tester doit être dilué à 1/2 (la valeur en fibrinogène lue sur le graphique doit être divisée par 5)
- Pour les niveaux plus élevés (>4 g/l), le plasma à tester doit être dilué à 1/20 (la valeur en fibrinogène lue sur le graphique doit être multipliée par 2).

Le test n'est pas influencé par les taux d'héparine utilisés dans le traitement des maladies thrombo-emboliques veineuses. Les taux très élevés utilisés pour la circulation extracorporelle peuvent cependant prolonger le temps de coagulation, ce qui cause une sous-estimation du taux de fibrinogène, sauf si le réactif contient des agents neutralisant l'héparine.

DONNÉES D'ÉTALONNAGE TYPIQUES

(Note : Une courbe d'étalonnage doit être établie avec les réactifs utilisés localement.)

Plasma normal : 2,1 g/l fibrinogène

Figure 18.1. Exemple d'un étalonnage du fibrinogène

Dilution de l'étalon	Concentration de fibrinogène (g/l)	Temps de coagulation (secondes)
1/5	4,2	8,5
1/10	2,1	14
1/15	1,4	19,5
1/20	1,05	24,5

Exemples :

Plasma à tester 1 : dilué à raison de 1 partie pour 10, temps de coagulation de 15 secondes.

fibrinogène = 1,9 g/l (lu sur le graphique de l'étalonnage)

Plasma à tester 2 : dilué à raison de 1 partie pour 5, temps de coagulation de 16 secondes.

fibrinogène = 1,8 g/l lu sur le graphique de l'étalonnage × 2
(puisque dilution au 1/5 au lieu de 1/10)
= 0,9 g/l

Un certain nombre d'analyseurs de coagulation peuvent estimer le taux de fibrinogène lors de la détermination du temps de prothrombine. Ceci est possible puisque la pente de la diffusion ou de la transmission de la lumière lors de la formation du caillot est proportionnelle à la concentration initiale de fibrinogène. On appelle couramment ces méthodes « fibrinogène dérivé du temps de prothrombine ».

La plupart des méthodes de fibrinogène dérivé du temps de prothrombine comportent des limites. En particulier, les résultats obtenus sont souvent beaucoup plus élevés que ceux obtenus par un dosage de Clauss lorsque les taux de fibrinogène sont très faibles (<1,5 g/l) ou très élevés (plus de 5 g/l). Les résultats sont généralement normaux en présence de dysfibrinogénémie. Pour des informations plus détaillées, voir Mackie et al. (2003).

Il existe des méthodes Clauss pour la détermination de fibrinogène sur du plasma non dilué, mais les résultats ne sont pas les mêmes que ceux obtenus avec le test de Clauss sur du plasma dilué (Jennings et al. 2009).

RÉFÉRENCES

- Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: data from the UK National External Quality Assessment scheme. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20:388-90.
- Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121: 396-404.

19 Élimination de l'héparine du plasma

PRINCIPE

L'héparinase 1 (le composant actif de l'Hepzyme^{MD}) est spécifique de l'héparine, dont il découpe les molécules en plusieurs endroits, ce qui produit des oligosaccharides qui ont perdu leurs propriétés antithrombotiques. L'Hepzyme^{MD} est une héparinase 1 bactérienne purifiée, produite dans la *Flavobacterium heparinum*. Il peut éliminer jusqu'à 2 UI d'héparine par ml présent dans le plasma. L'Hepzyme^{MD} peut être utilisé afin de neutraliser l'effet de l'héparine dans un échantillon, de sorte que la coagulation de base peut être évaluée. Il est surtout utilisé dans des cas de contamination à l'héparine.

RÉACTIF

L'Hepzyme^{MD}, un flacon contenant une préparation sèche d'héparinase 1 avec des stabilisateurs.

Fabricant : Siemens

Conservation : 4 °C

Stabilité : voir la date de péremption du fabricant. Chaque flacon ne peut être utilisé que pour un seul patient.

MÉTHODE

- 1 Ajouter 1,0 ml de plasma citraté pauvre en plaquettes dans un flacon d'Hepzyme^{MD}.
- 2 Remettre le bouchon et inverser doucement de 5 à 10 reprises.
- 3 Laisser à la température du laboratoire pendant 15 minutes.
- 4 Transférer dans un tube de 2 ml et attendre un instant que les bulles disparaissent.
- 5 Faire le test demandé.

Un temps de thrombine doit être réalisé afin de vérifier que toute l'héparine a été éliminée avec succès.

Les tests doivent être effectués aussitôt que possible (p. ex., conformément aux directives pour cette procédure).

INTERPRÉTATION

Cet enzyme n'élimine aucun facteur de coagulation (contrairement à certaines autres techniques d'élimination de l'héparine), donc tout raccourcissement conséquent du temps de coagulation du TCA, du temps thrombine ou du TP après le traitement à l'Hepzyme^{MD} indique que de l'héparine était présente. L'héparine non fractionnée et l'héparine de bas poids moléculaire sont toutes deux dégradées par cette enzyme.

INTRODUCTION

On soupçonne une dysfibrinogénémie (déficience en fibrinogène de type II) lorsque le résultat du dosage du fibrinogène par la méthode de Clauss est significativement inférieur aux résultats du fibrinogène dérivé du temps de prothrombine ou du fibrinogène antigène.

Le dosage selon Clauss détermine le taux de fibrinogène en mesurant le temps nécessaire à la formation de fibrine après l'addition d'une forte concentration de thrombine, alors que le dosage dérivé mesure la densité optique/la diffraction de la lumière à travers un caillot de fibrine formé une fois la coagulation terminée.

Le dosage du fibrinogène antigène met en évidence une dysfibrinogénémie lorsque le taux de fibrinogène, mesuré avec la méthode de Clauss, est diminué alors que le taux d'antigène est normal.

L'afibrinogénémie peut être associée à un saignement dû à une déficience de la coagulation plasmatique et des troubles de la fonction plaquettaire. Une multitude de déficiences sont à l'origine de dysfibrinogénémie, laquelle peut être caractérisée par une anomalie de la libération des fibrinopeptides A/B et/ou une anomalie de la polymérisation des monomères de fibrine. Les déficiences de type II peuvent être asymptomatiques, mais certains variants ont été associés à des prédispositions au saignement ou à la thrombose. Le saignement ou la propension aux thromboses d'un patient peuvent être sans rapport avec la dysfibrinogénémie, qui peut être due au hasard.

ÉQUIPEMENT

Plaque d'immunodiffusion radiale de fibrinogène NOR-Partigen.

Fabricant : Siemens

Chaque plaque comporte 12 puits.

RÉACTIFS

- Un plasma étalon avec une concentration en fibrinogène connue et dont la calibration contre un étalon international de fibrinogène de l'OMS est traçable.
- Le plasma à tester : le plasma citraté est habituellement testé non dilué, ou dilué dans une solution saline pour atteindre un taux d'environ 2,5 g/l si l'on s'attend à ce que le taux excédera 5 g/l. Les résultats de moins de 0,5 g/l sont notés comme <0,5 g/l (limite inférieure de la sensibilité).

MÉTHODE

- 1 Laisser la plaque d'immunodiffusion radiale atteindre la température du laboratoire, enlever le couvercle et laisser ouvert pendant 5 minutes afin de permettre à l'excédent d'humidité de s'évaporer.
- 2 Le plasma est testé non dilué et dilué à 75 %, 50 % et 25 % en solution saline.
- 3 Ajouter *exactement* 5 µl des dilutions du plasma étalon, du contrôle et du patient dans les puits (il est préférable d'effectuer cette procédure en double). Une pipette exacte est essentielle étant donné les petits volumes requis.
- 4 Aussitôt que les échantillons ont diffusé dans le gel (pas plus de cinq minutes après l'application), remettre le couvercle et mettre la plaque à plat dans un bac d'eau à la température de laboratoire pendant approximativement 48 heures.
- 5 Les résultats peuvent être lus après 18 heures, pour autant qu'aucun diamètre n'excède 5,5 mm. Les résultats finaux doivent être lus après deux jours, sauf si un diamètre excède 8 mm, dans tel cas la plaque est laissée un jour de plus afin de permettre à la diffusion de s'achever. Un diamètre >9,3 mm indique que le taux de fibrinogène est supérieur à la limite de sensibilité du dosage, dans tel cas l'échantillon doit être dilué dans une solution saline et testé de nouveau.
- 6 Mesurer les diamètres des précipités au moyen du dispositif de lecture des plaques Siemens (offert avec les plaques). Mesurer à 0,5 mm près et lire dans deux directions (diamètres perpendiculaires).
- 7 Tracer la courbe de calibration sur du papier pour graphique linéaire: diamètre² en fonction de la concentration
- 8 Déterminer le taux du contrôle et celui des patients sur cette courbe.
- 9 Rendre les résultats en g/l si le taux du contrôle est dans l'intervalle-cible.

21 Test de dépistage du facteur XIII

PRINCIPE

La thrombine et le calcium sont nécessaires pour activer le facteur XIII afin qu'il puisse stabiliser la fibrine par des liaisons covalentes. Malgré l'usage de plasma citraté, la quantité d'ions calcium résiduelle est suffisante pour l'activation du facteur XIII par cette méthode.

Un plasma EDTA normal est utilisé en guise de contrôle. Les ions calcium sont totalement chélatés par l'EDTA et par conséquent le facteur XIII ne peut pas être activé par la thrombine. L'adjonction d'acide acétique 2 % ou d'urée 5 M provoque la lyse des caillots non stabilisés. Il suffit d'un taux de FXIII ≥ 10 U/dl pour qu'un caillot devienne insoluble. Le test est généralement plus sensible si l'acide acétique est utilisé (au lieu de l'urée) parce que la dissolution du caillot aura lieu à des taux plus élevés de facteur XIII en présence d'acide acétique (Jennings et al. 2003).

MATÉRIEL/RÉACTIFS

- Tubes en verre 75 × 10 mm
- Solution saline 0,9 %
- Thrombine 30 U/ml
- Plasma EDTA normal
- Acide acétique 2 %

MÉTHODE

- 1 Ajouter 0,2 ml de plasma citraté à tester à 0,2 ml de solution saline à 0,9 % dans un tube en verre. Pour le contrôle positif, répéter avec 0,2 ml de plasma EDTA. Pour le contrôle négatif, répéter avec 0,2 ml de plasma citraté normal.
- 2 Ajouter 0,1 ml de thrombine 30 U/ml. Mélanger.
- 3 Laisser agir pendant 30 minutes à 37 °C.
- 4 Donner des chiquenaudes aux tubes afin de décoller les caillots de leurs parois.
- 5 Ajouter 5 ml d'acide acétique 2 % et boucher le tube. Laisser reposer pendant 12 heures à la température de laboratoire.

RÉSULTATS

- Le plasma EDTA ne doit pas contenir de caillot visible.
- Le plasma normal citraté devrait comporter un caillot intact visible.
- Si le caillot n'est pas visible, le sujet a une déficience du facteur XIII.

INTERVALLE DE RÉFÉRENCE

Les sujets normaux ont un caillot encore visible après 12 heures dans l'acide acétique 2 %.

NOTES

- L'urée 5 M peut être employée au lieu de l'acide acétique 2 %. Le temps d'incubation pour la dissolution du caillot est alors 18 heures. Cette méthode est moins sensible que celle employant l'acide acétique (décrite ci-dessus).
- La coagulation par le calcium et la lyse par l'urée produisent des résultats anormaux uniquement lorsque les taux de facteur XIII sont inférieurs à 5 U/dl. A titre de comparaison, la coagulation par la thrombine à 30 U/l suivie de la lyse par acide acétique à 2 % produit des résultats anormaux à des taux inférieurs à 10 U/dl (Jennings et al. 2003).
- Les patients dont les taux de facteur XIII sont supérieurs à 5 U/dl peuvent parfois saigner (voir Bolton-Maggs et al. 2004 pour revue).

RÉFÉRENCES

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Problems relating to the diagnosis of FXIII deficiency. *Thromb Haemost* 2003; 1: 2603-8.

22

Dosages basés sur le temps de prothrombine (facteurs II, V, VII ou X)

PRINCIPE

Les dosages des facteurs II, V, VII et X peuvent être effectués par un test en un temps basé sur le temps de prothrombine. Le dosage consiste essentiellement en une comparaison entre la capacité des dilutions d'un plasma étalon ou de référence et celle du plasma à tester à corriger le temps de prothrombine d'un plasma totalement déficient dans le facteur que l'on veut mesurer. Dans un dosage du facteur V, par exemple (description ci-dessous), le plasma-réactif est déficient en facteur V mais contient des quantités normales des facteurs II, VII, X et de fibrinogène. Les facteurs de coagulation II, VII et X peuvent être dosés de la même façon que dans l'exemple décrit ci-dessous mais en utilisant le plasma déficient approprié. Il faut utiliser un plasma de référence approprié dont la concentration en facteur que l'on doit doser est connue.

RÉACTIFS

- Plasma déficient en facteur V
La déficience en facteur V peut être d'origine congénitale ou artificielle (plasma vieilli).
- Solution saline en tampon d'Owren
Solution saline en tampon d'Owren ou tampon imidazole (voir le chapitre 9).
- Plasma citraté pauvre en plaquettes : plasma à tester et plasma étalon
Pour le plasma étalon, utiliser un pool de plasma normal de 20 donneurs (conservé à -70 °C ou à une température inférieure) ou un plasma de référence ou un étalon commercial.
- Thomboplastine/calcium (comme utilisé dans les test de TP)

MÉTHODE

- 1 Préparer des dilutions dans des tubes en plastique pour le plasma à tester et le plasma étalon, comme illustré à la figure 22.1 ci-dessous.

Note : Bien mélanger la dilution 1/10 avant de l'utiliser dans la préparation de la dilution 1/20. Bien mélanger la dilution 1/20 avant l'utiliser dans la préparation de la dilution 1/40. Les dilutions de plasma doivent être testées immédiatement après leur préparation. Si la température du laboratoire dépasse 25 °C, il peut être nécessaire de garder les dilutions sur de la glace fondante avant de les analyser.

Figure 22.1. Préparation des dilutions de plasmas à tester et du calibrateur

Dilution	Plasma (ml)	Solution saline tampon d'Owren (ml)
1/5	0,1	0,4
1/10	0,1	0,9
1/20	0,5 (1/10)	0,5
1/40	0,5 (1/20)	0,5

2 Doser chaque dilution de plasma de référence ou étalon comme suit :

- i. Pipetter 0,1 ml de chaque dilution dans un tube en verre de 75 × 10 mm.
- ii. Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en facteur V.
- iii. Chauffer à 37 °C pendant 2 minutes.
- iv. Ajouter 0,2 ml de thromboplastine/calcium préchauffée.
- v. Enclencher le chronomètre et mélanger.

Note : Si le réactif de thromboplastine ne contient pas de calcium, ajouter 0,1 ml de thromboplastine à un mélange composé de la dilution et de plasma déficient. Après un délai de 1 à 2 minutes pour chauffer à 37 °C, le mélange est coagulé avec 0,1 ml de calcium préchauffé (à 37 °C).

3 Noter le temps de coagulation.

4 Répéter avec les dilutions de plasma à tester.

Pour les plasmas à tester, doser des dilutions de 1/10, 1/20 et 1/40 si l'on prévoit qu'ils seront normaux. Pour les plasmas à tester que l'on prévoit avoir des taux réduits, tester des dilutions de 1/5, 1/10 et 1/20.

Un échantillon « tampon » doit aussi être dosé comme suit :

- 0,1 ml solution tampon d'Owren
- 0,1 ml plasma déficient en facteur V
- 0,2 ml réactif à la thromboplastine/calcium

Le temps de coagulation de l'échantillon « tampon » reflète la qualité du plasma déficient dont le taux doit être inférieur à moins de 1 %.

RÉSULTATS

Tracer la courbe des temps de coagulation des plasmas contrôle et des plasmas à tester en fonction des concentrations du facteur V sur du papier logarithmique de 3 cycles × 2 cycles. Un exemple d'un tel graphique (pour un dosage du facteur VIII) se trouve au chapitre 23. Une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution de 1/10, donc une dilution de 1/5 équivaut à 200 %, etc. Dans

l'alternative, tracer la courbe de la concentration sur une échelle logarithmique et le temps de coagulation sur une échelle linéaire.

Le taux en facteur V dans le plasma du patient, par rapport au plasma normal ou au plasma de référence étalon, est extrapolé à partir des graphiques. Un exemple de ceci est illustré dans le chapitre portant sur les dosages basés sur le TCA (Figure 23.1). Le temps de coagulation qui équivaut à 100 % (l'endroit où la courbe de calibration traverse le 100 % d'activité) est lu sur la courbe étalon (donc, la concentration de plasma étalon qui donne ce temps de coagulation). Ceci donne la concentration du plasma à tester exprimé comme un pourcentage du plasma étalon. Ce pourcentage est multiplié par la concentration en facteur de coagulation dans le plasma étalon (exprimé en UI/dl) pour donner la concentration dans le plasma à tester (exprimé en UI/dl).

NOTES

- Les intervalles de référence pour chacun de ces facteurs de coagulation doivent être déterminés localement. Cependant, leurs limites inférieures seront souvent de 50-70 UI/dl pour les facteurs V, VII et X. La limite inférieure de l'intervalle de référence du facteur II est plus élevée. Dans une étude portant sur des sujets normaux ayant des antécédents familiaux de déficit en facteur II ainsi que sur d'autres sujets normaux sans rapport avec ceux-ci, les taux de facteur II étaient compris dans un intervalle de 84-130 UI/dl (Girolami et al. 1998). Un autre centre a rapporté un intervalle de référence de 84-132 UI/dl (Bolton Maggs et al. 2004).
- Les personnes ayant des taux abaissés en facteur V devraient être soumises à un dosage du facteur VIII afin d'exclure une déficience combinée en facteurs V et VIII.
- Dans certains cas de déficit en facteur VII, il peut y avoir une différence entre les taux de facteur VII:C obtenus en fonction de la source de la thromboplastine utilisée. L'emploi de thromboplastine d'origine humaine est par conséquent conseillé puisque les résultats auront plus tendance à refléter l'activité *in vivo*. Voir Bolton-Maggs et al. (2004) pour une revue de ce sujet. Dans certains rares cas, le résultat peut être très bas si de la thromboplastine de lapin est utilisée, mais normal si le dosage est effectué avec de la thromboplastine d'origine humaine. Ceci explique peut être pourquoi un déficit important en facteur VII ne s'accompagne pas de diathèse hémorragique.

RÉFÉRENCES

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

Girolami A, Scarano L, Saggiorato G, Girolami B, Bertomoro A, Marchiori A. Congenital deficiencies and abnormalities of prothrombin. *Blood Coagul Fibrinol* 1998; 9: 557-569.

Dosages de facteurs basés sur le TCA (dosage en un temps des facteurs VIII:C, IX, XI ou XII)

23

PRINCIPE

Le dosage en un temps du facteur VIII est décrit dans le présent chapitre. Le dosage est basé sur la comparaison entre la capacité des dilutions d'un plasma étalon et du plasma à tester de corriger le TCA d'un plasma totalement déficient en FVIII, mais contenant tous les autres facteurs nécessaires à une coagulation normale. Pour les facteurs IX, XI et XII, le dosage est essentiellement le même et il est effectué en substituant du plasma déficient en facteur VIII par un plasma déficient dans le facteur que l'on veut doser. Dans tous les cas, il faut un plasma étalon, dont la concentration en facteur que l'on veut doser est connue.

RÉACTIFS

- Plasma citraté pauvre en plaquettes : plasma à tester et plasma étalon
Le plasma étalon utilisé doit être soit un pool de plasmas préparé localement et conservé à une température de -70 °C ou moins, ou un plasma étalon commercial. Dans l'un ou l'autre cas, ce plasma de référence doit être étalonné contre un étalon international pour le facteur VIII. Il n'est pas acceptable de présumer que le pool de plasmas normaux contient 100 U/dl de facteur VIII:C.
- Plasma déficient en facteur VIII
Ce type de plasma est disponible sur le marché ou peut être recueilli d'un donneur dont le taux de facteur VIII est inférieur à 1 U/dl, qui n'a pas d'anticorps anti-facteur VIII, qui n'a reçu aucun traitement substitutif depuis deux semaines et dont les tests de la fonction rénale sont normaux. Une fonction rénale anormale peut entraîner une réduction des autres facteurs de coagulation, ce qui nuit à la spécificité du dosage.
Ce plasma peut être conservé en aliquotes à -37 °C. Il est préférable d'utiliser du plasma déficient en facteur VIII produit par déplétion immunologique du facteur VIII d'un plasma normal au moyen d'un anticorps monoclonal. Ce type de produit est disponible sur le marché et a l'avantage de la sécurité virologique, en comparaison aux plasmas d'hémophiles qui ont été traités par des produits issus du plasma. Toutefois, tous les plasmas immuno-dépétés n'ont pas <1 U/dl de facteur c'est pourquoi une vérification du taux résiduel est nécessaire. Certains spécialistes soutiennent que la présence d'une concentration normale en facteur von Willebrand dans le plasma déficient en facteur VIII peut être un avantage et ceci a été prouvé en ce qui concerne les dosages de facteur VIII effectués lors des mesures des taux d'inhibiteurs du facteur VIII.
- Réactif TCA
- Solution saline tampon d'Owren (STO ou tampon imidazole; voir le chapitre 9)
- CaCl₂ 25 mM

MÉTHODE

- 1 Préparer des dilutions 1/10 du plasma étalon et du plasma à tester dans une solution tampon saline dans des tubes en plastique (commencer par une dilution à 1/5 si vous prévoyez que le plasma à tester aura une très faible teneur en facteur VIII).
- 2 En utilisant des volumes de 0,2 ml, préparer dilutions géométriques dans de la solution tampon saline d'Owren de plasma étalon et de plasma à tester allant de 1/10 à 1/40 dans des tubes en plastique (bien mélanger chaque dilution avant de faire le transfert vers le tube suivant). Les dilutions de plasmas doivent être testées immédiatement après leur préparation. Si la température du laboratoire dépasse 25 °C, il peut être nécessaire de conserver les dilutions sur de la glace fondante avant de faire le test.
- 3 Pipetter 0,1 ml de chaque dilution du plasma étalon dans un tube en verre de 75 × 10 mm.
- 4 Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en facteur VIII et transférer le tube dans un bain-marie à 37 °C.
- 5 Ajouter 0,1 ml de réactif de TCA et incuber pendant 5 minutes.
- 6 Une fois les 5 minutes écoulées, ajouter 0,1 ml CaCl_2 et noter le temps de coagulation.

Un échantillon « tampon » doit aussi être préparé comme suit :

- 0,1 ml solution saline tampon d'Owren
- 0,1 ml plasma déficient en facteur VIII
- 0,1 ml réactif de TCA
- Incuber 5 minutes
- 0,1 ml CaCl_2

Le temps de coagulation de l'échantillon « tampon » doit être supérieur au temps de coagulation correspondant à un taux de 1 % d'activité en facteur VIII de l'étalon selon le graphique de l'étalonnage. Si le temps obtenu lui est inférieur, ceci indique que le plasma déficient (appelé aussi plasma-réactif) n'est pas entièrement déficient en facteur VIII et n'est par conséquent pas un plasma-réactif qui convient.

RÉSULTATS

La courbe de calibration doit être tracée comme indiqué au chapitre 22 sur du papier log/log ou du papier log/linéaire.

La valeur du 100 % est arbitrairement assignée à la dilution à 1/10, la valeur du 50 % à la dilution de 1/20 et la valeur du 25 % à celle de 1/40.

Les droites entre les dilutions de l'étalon et les dilutions du plasma à tester devraient être parallèles.

Lire la concentration de l'échantillon à tester comme indiqué à la figure 22.1 (chapitre 22). Dans cet exemple, la concentration en facteur VIII dans l'échantillon à tester est de 7 % de celle de l'étalon. Si l'étalon a une concentration de 85 UI/dl, l'échantillon à l'essai aura une concentration de $85 \text{ UI/dl} \times 7 \% = 6 \text{ UI/dl}$.

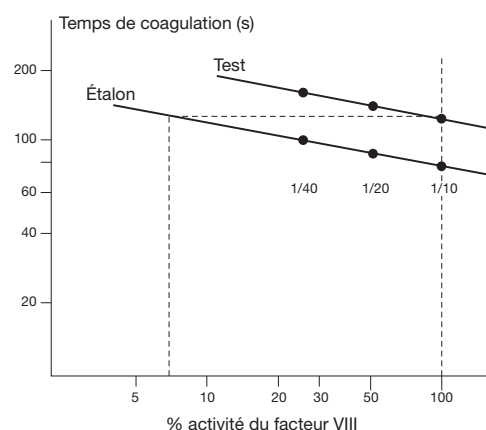
Si les droites ne sont pas parallèles, le dosage doit être effectué à nouveau.

Des droites non parallèles peuvent résulter d'erreurs techniques. Si une erreur technique est exclue, elles peuvent être dues à la présence d'un inhibiteur qui peut agir spécifiquement contre le facteur VIII, ou qui peut être de « type lupique », donnant une image convergente. Des droites divergentes sont typiques d'un échantillon activé.

NOTES

- Si la concentration en facteur VIII (IX, XI ou XII) du plasma à tester est proche de zéro (à savoir le temps de coagulation de toutes les dilutions sont semblables à celui de l'échantillon « tampon »), des droites non parallèles peuvent être obtenues.
- L'intervalle de référence doit être établi localement, mais celui-ci aura le plus souvent une limite inférieure entre 50-65 UI/dl pour les facteurs IX ou XI.
- En ce qui concerne le facteur XI, l'unité internationale n'a été établie que récemment. Au moment où le présent document a été rédigé, il existait peu de données sur les taux normaux de facteur XI en UI. Les publications antérieures à l'établissement de l'UI ont indiqué que la limite inférieure de l'intervalle de référence pour le facteur XI se situe entre 63 et 80 U/dl (voir revue de Bolton-Maggs et al. 2004).

Figure 23.1. Graphique du dosage du facteur VIII



RÉFÉRENCE

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

Le protocole de dosage décrit au chapitre 23 est applicable à des échantillons contenant des taux normaux ou presque normaux de facteur VIII:C. Si le taux est plus grand que 150 UI/dl, le protocole doit être modifié pour obtenir un résultat fiable.

Les taux en facteur VIII:C des cryoprécipités varient d'un don à l'autre, mais se situent généralement dans un intervalle de 200 à 1000 UI/dl. A ces taux, l'échantillon à doser doit être prédilué afin de réduire la concentration avant d'effectuer le dosage. Pour la plupart des unités de cryoprécipités, une prédilution de 1:5 ou de 1:10 est suffisante pour que le taux en facteur VIII soit suffisamment bas pour pouvoir utiliser le protocole décrit au chapitre 23 (l'échantillon prédilué sera ensuite redilué au 1/5, 1/10, 1/20 dans la solution tampon du dosage, comme décrit).

Si le cryoprécipité n'est pas prédilué à la bonne concentration, il est peu probable d'obtenir une droite qui passe par les dilutions de l'échantillon à tester et que cette droite soit parallèle à la courbe d'étalonnage. Un tel dosage ne serait donc pas valide et le résultat ne serait pas correct.

La prédilution du cryoprécipité doit être effectuée immédiatement avant le dosage du facteur VIII:C. Pour la prédilution certains centres utilisent la solution tampon employée dans le dosage du facteur VIII:C (p. ex. tampon d'Owren ou imidazole/glyoxide), tandis que d'autres utilisent du plasma déficient en facteur VIII:C. Les prédilutions effectuées avec du plasma déficient en facteur VIII sont probablement plus stables que celles préparées avec une solution tampon. Le plasma déficient est par conséquent le diluant de premier choix.

La précision inter-laboratoires des dosages de facteur VIII des cryoprécipités est similaire à celle obtenue avec des échantillons de plasma (Jennings et al. 2009).

RÉFÉRENCE

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the World Federation of Hemophilia EQA programme 2003–2008. *Haemophilia* 2009; 15: 571–7.

PRINCIPE

Ce test a été décrit pour la première fois en 1955 en tant que modification du test de dilution de la thromboplastine. Le dosage en deux temps est basé sur le principe que la quantité de facteur VIII présent dans l'organisme est le facteur limitant de vitesse lors de la coagulation d'un mélange contenant du facteur X, du facteur IX activé, des phospholipides, du calcium et du facteur V en excès. L'adsorption de plasma sur de l'hydroxyde d'aluminium élimine les facteurs activés et les facteurs qui dépendent de la vitamine K. Ceci est nécessaire pour éliminer la prothrombine, de sorte qu'il n'y en ait pas dans le mélange initial d'incubation. Si cette étape n'était pas réalisée, le mélange contiendrait tous les composants nécessaires à la formation de la fibrine et il coagulerait.

Des dilutions du plasma adsorbé et du plasma à tester sont incubées avec le réactif combiné lors de la première étape. Ceci génère du facteur Xa. La source de prothrombine et de fibrinogène provient d'un plasma pool qui est ajouté lors de la deuxième étape ce qui permet la formation d'un caillot. Le temps de coagulation va dépendre de la quantité initiale de facteur VIII:C.

RÉACTIFS

- Réactif combiné (voir « Production du réactif combiné », ci-dessous)
- Tampon véronal d'Owren
- Plasma normal poolé (substrat plasmatique) : conservé congelé
- Plasma étalon ou plasma de référence
- Contrôle de qualité interne (CQI)
- CaCl_2 0,0125 M (par exemple dilution 1/2 de CaCl_2 0,025 M, comme utilisé dans l'épreuve du TCA)
- Suspension d'hydroxyde d'aluminium (p. ex. Code du catalogue SIGMA : A8222) : conservé à la température du laboratoire

ÉCHANTILLON À TESTER

Plasma citraté, qui peut être conservé congelé avant l'analyse si nécessaire.

MÉTHODE

- 1 Reconstituer le plasma étalon avec de l'eau distillée, 10 minutes avant utilisation, et le réactif combiné au moins 15 minutes avant utilisation avec 3 ml de CaCl_2 0,0125 M.

- 2 Préparer le plasma de CQI et le substrat plasmatique. Si ces plasmas sont congelés, les décongeler pendant 5 minutes à 37 °C.
- 3 Étiqueter une quantité suffisante de tubes en plastique pour le plasma étalon et le plasma de CQI.
- 4 Mettre 0,45 ml de plasma étalon, de plasma de CQI et de plasma du patient dans les tubes en plastique.
- 5 Homogénéiser la suspension d'hydroxyde d'aluminium, ajouter 50 µl à chaque tube et bien mélanger.
- 6 Pour des petites quantités de plasma, utiliser 0,225 ml de plasma et 25 µl d'hydroxyde d'aluminium.
- 7 Incuber pendant 3 minutes à 37 °C et centrifuger à 5000 g pendant 2 minutes dans une centrifugeuse appropriée.
- 8 Transférer le surnageant immédiatement dans des récipients en plastique ou dans des récipients compatibles avec l'analyseur employé. Veiller à ne pas resuspendre l'hydroxyde d'aluminium sédimenté.

Note : Les étapes qui suivent sont basées sur l'emploi d'un analyseur de type Sysmex CA series. Les analyses peuvent être effectuées sur des instruments provenant de la gamme d'autres fabricants. L'un des coauteurs du présent manuel est parvenu à réaliser des analyses sur des analyseurs d'Instrumentation Laboratory et il est probable que la méthode soit compatible avec d'autres types d'analyseurs. Par conséquent, cette méthode particulière est indiquée à titre d'exemple.

- 9 Charger dans l'analyseur le réactif combiné, la solution tampon et le plasma pool /substrat plasmatique.
- 10 Les plasmas adsorbés sont analysés dans l'ordre suivant : étalon, CQI, plasma du patient et, finalement, un deuxième étalon. Les échantillons comportant des concentrations normales en facteur VIII sont généralement analysés en utilisant trois dilutions différentes allant de 1/50 à 1/400.

Il est possible que des dilutions de 1/10, 1/20 et 1/50 soient nécessaires en cas de taux faibles de facteur VIII (<0,05 UI/dl). Pour des taux élevés (>1,5 UI/dl), des dilutions de 1/800 à 1/3200 peuvent être nécessaires. Sinon, la courbe dose-réponse du patient risque de ne pas être parallèle à la courbe étalon.

RÉSULTATS

L'expression de la courbe des résultats et le calcul de l'activité du facteur VIII se font comme décrit dans le chapitre décrivant le test en un temps (chapitre 23).

25.1 Production du réactif combiné pour le dosage en deux temps du facteur VIII:C

Obtenir suffisamment de facteur V et de phospholipides pour préparer une solution 5:1:1 avec du sérum vieilli dilué (à savoir 5 parts de sérum pour une part de facteur V et une part de phospholipides). Par exemple, 240 ml de sérum dilué, 48 ml de facteur V et 48 ml de phospholipides (ou 180 ml:36 ml:36 ml).

RÉACTIFS

- Sérum vieilli
 1. 10 ml de sang d'au moins 6 donneurs normaux sont prélevés dans des tubes en verre ordinaires, sans additifs.
 2. Incuber pendant 4 heures à 37 °C et pendant une nuit à 4 °C.
 3. Faire tourner à 3000 t/m pendant 10 minutes.
 4. Séparer le plasma surnageant et le transférer dans un récipient en verre non siliconé (peut être conservé congelé).
- Facteur V bovin (Diagnostic Reagents Ltd., Thame, Oxfordshire, Angleterre)
Reconstituer chaque flacon avec 1 ml de tampon imidazole.
- Phospholipides (Bell and Alton, Diagnostic Reagents Ltd., Oxford, Angleterre)
Reconstituer chaque flacon avec 1 ml de tampon imidazole (à une concentration de 5x).
- Tampon imidazole
- HEPES forme acide (Sigma H3375)

MÉTHODE

- 1 Diluer le sérum vieilli à 1/10 avec du tampon imidazole.
- 2 Activer le sérum dilué pendant une heure en ajoutant une petite bille de verre (ballotini) par ml, recouvrir de parafilm et placer sur un agitateur rotatif pendant une heure. (Note : 100 billes ont un poids de 3,7 g).

Note : effectuer les étapes 3 à 8 aussi rapidement que possible.

- 3 Reconstituer le plasma contenant le facteur V dans 1 ml de tampon imidazole.
- 4 Reconstituer les phospholipides dans 1 ml de tampon imidazole.
- 5 Mélanger le sérum activé dilué, le facteur V et les phospholipides à un rapport de 5:1:1.
- 6 Bien mélanger et ajouter la poudre d'HEPES pour donner une concentration de 1 % afin de stabiliser le pH à 7,0 (p. ex. s'il y a 300 ml de fluide, ajouter 3 g d'HEPES).

-
- 7 Aliquoter en portions de 0,5 ml.
 - 8 Celles-ci peuvent être lyophilisées (voir le chapitre 40 qui décrit la lyophilisation).
 - 9 Évaluer le nouveau réactif pour déterminer les conditions optimales, comme décrit ci-dessous.
-

DÉTERMINATION DES CONDITIONS POUR L'OBTENTION DU PLATEAU DE GÉNÉRATION DU FACTEUR Xa

Les valeurs optimales concernant la dilution de l'échantillon, le temps d'incubation, le volume total du test, le volume de CaCl_2 0,0125 M utilisé pour la reconstitution, le temps de reconstitution et la stabilité du réactif reconstitué doivent être systématiquement évalués afin d'obtenir un plateau de génération du facteur Xa.

L'ordre et l'ampleur des éventuels ajustements à apporter décrits ci-dessous ne sont pas immuables. Ils sont sujets à des modifications qui vont dépendre du lot. Un bon point de départ est d'utiliser les mêmes conditions que celles du lot en vigueur et d'en changer les paramètres un par un.

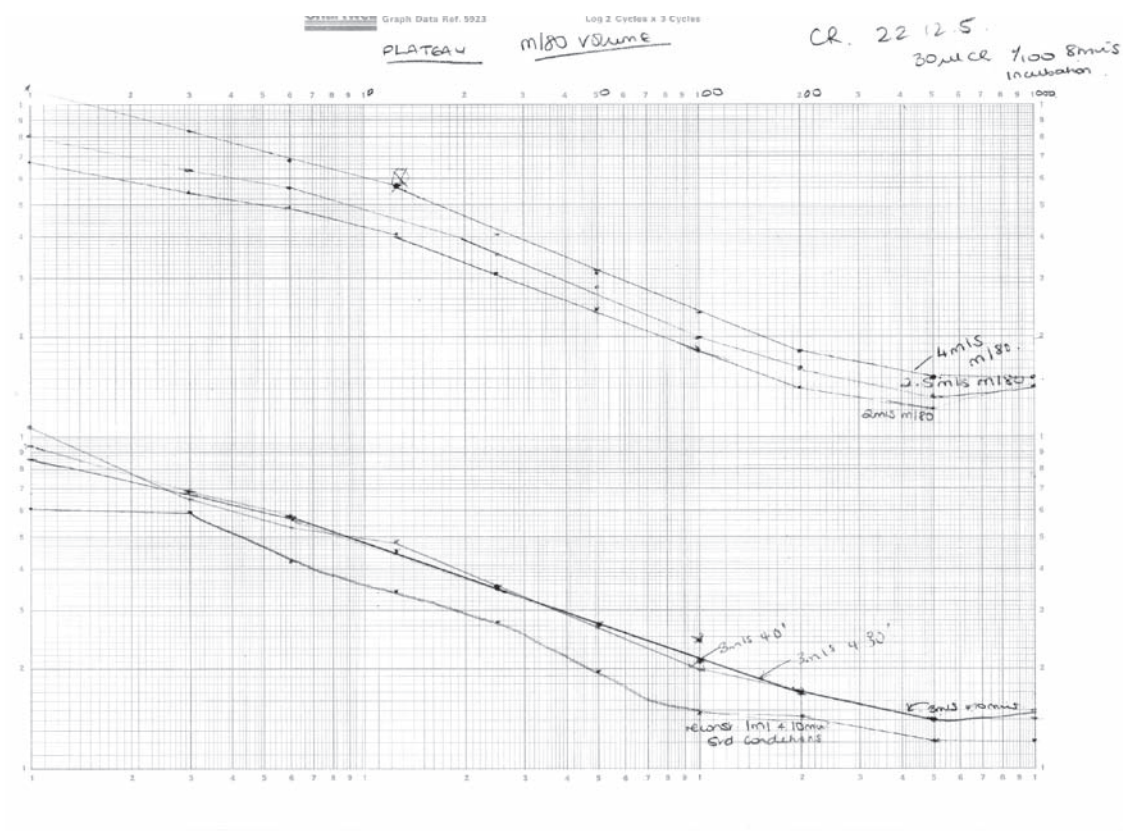
- Volume de reconstitution avec CaCl_2 0,0125 M : 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml, 3 ml, 3,5 ml.
- Temps de reconstitution avant utilisation/stabilité après la reconstitution : immédiatement avant utilisation, 5 minutes, 10 minutes, 30 minutes, 60 minutes, 120 minutes.
- Temps d'incubation : 5 minutes, 6 minutes, 7 minutes, 8 minutes, 9 minutes, 10 minutes.
- Dilution de l'échantillon : 1/20, 1/50, 1/80, 1/100.
- Volume de réactif combiné dans le test : 20 µl, 30 µl, 40 µl, 50 µl, etc.

Pour chaque série d'analyses, tracer la courbe des résultats sur du papier log-log, conformément à l'exemple illustré à la Figure 25.1. Choisir les dilutions et les conditions qui ont le plus grand nombre de points sur la partie linéaire de la courbe. Les conditions idéales ont des temps de coagulation d'environ 20 à 30 secondes pour la première dilution.

NOTES

- Le plasma normal/le substrat plasmatique est poolé à partir de plasma résiduel de tests de dépistage de coagulation qui se sont avérés normaux ou à partir de sujets normaux et en bonne santé.
- Les plasmas utilisés doivent avoir un TP et un TCA normaux.
- Le plasma normal poolé peut être conservé en aliquotes de 3 ml ou de 5 ml dans des flacons en plastique à -80 °C pendant au moins six mois.

Figure 25.1. Exemple de plateau de génération du facteur Xa



26 Dosage chromogénique du facteur VIII:C

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, le test de dosage du facteur VIII:C le plus couramment effectué dans le monde entier est le test en un temps décrit au chapitre 23.

Le test en un temps comporte des limites, dont l'interférence de l'anticoagulant de type lupique. Plus grave, une hémophilie A légère ne peut pas être exclue par un taux normal en facteur VIII:C si mesuré par le test en un temps. Plusieurs équipes rapportent qu'un sous-groupe de patients atteints d'hémophilie A légère présente des différences d'activité du facteur VIII quand il est mesuré par différents types de tests (Parquet-Gernez et al. 1998, Duncan et al. 1994, Keeling et al. 1999). Plus de 20 % des patients atteints d'hémophilie A légère présentent ces différences, définies comme donnant des taux en FVIII:C variant du simple au double suivant le type de test utilisé (Parquet-Gernez et al. 1998).

Dans certains cas, le résultat du test en un temps peut être cinq fois plus élevé que celui obtenu avec le test en deux temps ou avec le test chromogénique (Parquet-Gernez et al. 1998). Le plus souvent, le résultat du test en un temps est plus de deux fois plus élevé que celui obtenu avec le test en deux temps ou avec le test chromogénique. Chez plus des trois quarts de ces patients, tous les résultats sont au-dessous de la limite inférieure de l'intervalle de référence, de sorte qu'un diagnostic peut être établi avec fiabilité, quelle que soit de la méthode d'analyse utilisée.

Toutefois, pour une petite proportion de patients, les résultats obtenus avec le test en un temps sont dans l'intervalle de référence mais avec des taux diminués avec le test en deux temps ou avec le test chromogénique (Keeling et al. 1999, Mazurier et al. 1997). Ces patients ont des antécédents de saignements compatibles avec les taux plus bas obtenus avec le test en deux temps ou avec le test chromogénique.

Dans de nombreux cas, le défaut génétique a été identifié, de sorte qu'il n'existe aucun doute que ces personnes sont effectivement hémophiles (Rudzi et al. 1996, Mazurier et al. 1997). Selon la littérature, environ 5 % à 10 % des patients atteints d'hémophilie A légère génétiquement confirmée obtiennent des résultats normaux au test en un temps. Puisque l'activité du facteur VIII est normale avec le test en un temps basé sur le TCA, il n'est pas surprenant que le TCA soit également normal chez ces patients. Ceci signifie que les patients dont les antécédents cliniques sont compatibles avec l'hémophilie A devraient subir un test en deux temps (voir le chapitre 25) ou un test chromogénique, et ce, même si le TCA et le test en un temps sont normaux.

De nombreux fabricants vendent des trousse commerciales pour le dosage chromogénique du facteur VIII. Beaucoup de ces trousse conviennent pour le diagnostic de l'hémophilie A lorsque l'activité du facteur FVIII:C est normale avec le test en un temps. Des exemples de résultats chez de patients de ce type sont montrés dans la Figure 26.1 ci-dessous. Le test chromogénique employé était une trousse commerciale provenant de Siemens/Dade Behring, mais le fait qu'elle ait été choisie ne signifie pas qu'elle est supérieure à d'autres trousse, qui auraient pu être utilisées avec succès dans ce contexte.

Figure 26.1. Exemples de patients atteints d'hémophilie A légère génétiquement confirmée et des différences avec différents types de tests

Cas	Dosage en un temps (UI/dl)	Dosage en deux temps (UI/dl)	Dosage chromogénique (UI/dl)
A	101	34	13
B	88	15	28
C	63	30	40
D	55	24	40
E	58	21	33
F	72	21	36
G	84	19	45

Certains patients avec hémophilie A légère ont une activité diminuée selon avec le test en un temps mais des résultats normaux avec le test en deux temps ou chromogénique (Mumford et al. 2002, Lyall H et al. 2008). Dans beaucoup de ces cas (mais pas dans tous), le phénotype clinique est en corrélation avec le résultat obtenu avec le test de coagulation en deux temps ou avec le test chromogénique dans la mesure où il n'y a aucun antécédent personnel ou familial de saignement et pas de besoin en thérapie de substitution en facteur VIII (Lyall H et al. 2008).

Au vu de ces résultats, il est souhaitable que tous les centres d'hémophilie aient à disposition un test chromogénique ou de coagulant en deux temps. Ces tests doivent être effectués sur des sujets dont le TCA et l'activité du facteur VIII dosée en un temps sont normaux en présence d'antécédents personnels ou familiaux qui correspondent à une hémophilie légère.

Un test chromogénique modifié (version modifiée du test Coamatic, Instrumentation Laboratory Ltd.) a été décrit. Il convient pour les tests où le taux de facteur VIII est très bas (Yatuv et al. 2006). Il a été rapporté que cette méthode permet de mesurer avec justesse et précision le facteur VIII dans un intervalle de 0,1-2 UI/dl (0,1-2 % de facteur VIII ou 0,001-0,02 UI/ml).

PRINCIPE DE L'ANALYSE

Dans de nombreux tests chromogènes (à l'exception de certains), tout le facteur VIII présent dans l'échantillon est activé par de la thrombine. Le facteur VIII activé accélère alors la conversion de facteur X en facteur Xa en présence de facteur IX activé, de phospholipides et d'ions calcium. L'activité du facteur Xa est mesurée par l'hydrolyse d'un substrat spécifique au facteur Xa contenant de la p-nitroanaline. La vitesse initiale de la libération de p-nitroanaline (couleur jaune) mesurée à 405 nm est proportionnelle à l'activité du facteur Xa et donc à l'activité du facteur VIII dans l'échantillon. Pour une revue sur ce sujet, voir Lundblad et al. (2000).

RÉFÉRENCES

- Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, Lloyd JV. Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII assay methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol* 1994; 87: 846-848.
- Keeling DM, Sukhu K, Kemball-Cook G, Waseem N, Bagnall R, and Lloyd JV. Diagnostic importance of the two stage FVIII:C assay demonstrated by a case of mild hemophilia associated with His1954 → Leu substitution in the FVIII A3 domain. *Br J Haematol* 1999; 105: 1123-6.
- Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG, White GC. Issues with the assay of FVIII activity in plasma and FVIII concentrates. *Thromb Haemost* 2000; 84:942-8.
- Lyall H, Hill M, Westby J, Grimley C, Dolan G. Tyr346 → Cys mutation results in factor VII:C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype: Is this mild haemophilia A? *Haemophilia* 2008; 14:78-80.
- Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Parquet-Gerneux A. Mutations in the FVIII gene in seven families with mild haemophilia A. *Br J Haematol* 1997; 96:426-7.
- Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJD, Manning RA, Kemball-Cook G. A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of FVIII in an individual with FVIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol* 2002; 118:589-594.
- Parquet-Gerneux A, Mazurier C, Goudemand M. Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs: Characterisation of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thromb Haemost* 1998; 59:202-206.
- Rudzi Z, Duncan EM, Casey GJ, Neuman M, Favaloro RJ, Lloyd JV. Mutations in a subgroup of patients with mild haemophilia A and familial discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII:C methods. *Br J Haematol* 1996; 94:400-406.
- Yatuv R, Dayan I, Baru M. A modified chromogenic assay for the measurement of very low levels of FVIII activity (FVIII:C). *Haemophilia* 2006; 12:253-257.

Test en un temps pour le dosage de la prékallicréine et du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM)

27

PRINCIPE

Le KHPM (facteur Fitzgerald) et la prékallicréine (facteur Fletcher) sont des facteurs de coagulation qui participent à la voie intrinsèque. Une réduction de l'un ou de l'autre facteur cause un TCA très prolongé avec la plupart des réactifs utilisés pour la détermination du TCA en fonction de l'activateur employé. En l'absence complète de KHPM ou de prékallicréine (<1 U/dl), le TCA est normalement >200 secondes et il est plus long que le TCA obtenu avec le même type de test en présence de déficiences complètes des facteurs VIII ou IX. Les réactifs pour la détermination de TCA qui utilisent de l'acide éllagique comme activateur (par exemple l'Actin FS) donneront des résultats complètement normaux en présence de l'une ou l'autre déficience. Par conséquent, ce type de réactif ne doit pas être utilisé dans le dosage en un temps de ces facteurs.

La courbe dose-réponse du dosage en un temps de ces facteurs est plus pentue pour certains réactifs que pour d'autres. La méthode indiquée ci-dessous décrit l'utilisation d'un réactif particulier pour lequel la courbe dose-réponse est spécialement pentue, ce qui se traduit par des résultats plus justes et plus précis.

RÉACTIFS

- Réactif Dapttin pour la détermination du TTPA (Technoclone, Vienne, Autriche)
Conserver à 2 °C–8 °C, conformément aux directives du fabricant
- CaCl_2 25 mM
Conserver à 2 °C–8 °C
- Tampon véronal d'Owren
Conserver à 2 °C–8 °C
- Plasma déficient en prékallicréine (facteur Fletcher)
Exemple : lyophilisé (Technoclone, Vienne, Autriche)
Conserver à 2 °C–8 °C
- Plasma déficient en KHPM (facteur Fitzgerald)
Exemple : lyophilisé (Technoclone, Vienne, Autriche)
Conserver à 2 °C–8 °C
- Plasma de référence (par exemple, plasma normal poolé, voir le chapitre 7)
Échantillon pour le contrôle de qualité interne

MÉTHODE

- 1 Le protocole du dosage est conçu comme pour le test en un temps du facteur VIII décrit au chapitre 23 (à savoir 3 dilutions du plasma étalon, 3 dilutions du plasma à tester).
 - 2 Les dilutions sont préparées avec du tampon d'Owren.
 - 3 Les dilutions qui conviennent le mieux au dosage sont généralement plus élevées que celles utilisées dans les tests en un temps pour les facteurs VIII et IX décrits précédemment.
 - 4 L'analyse et l'établissement de la courbe d'étalonnage, ainsi que le calcul des résultats des tests sont similaires aux descriptions figurant dans le chapitre portant sur les tests en un temps pour le facteur VIII (chapitre 23).
-

Selon la littérature, les intervalles de référence sont :

KHPM : 0,70–1,20 U/ml (70–120 U/dl)

Prékallicréine : 0,70–1,20 U/ml

Au moment où le présent document a été rédigé, il n'y avait aucun étalon international pour le KHPM ou la prékallicréine.

Dépistage d'un inhibiteur d'un facteur de coagulation basé sur le TCA

28

PRINCIPE

Les inhibiteurs de coagulation qui ont un effet sur le TCA peuvent agir immédiatement ou avec un délai. Du plasma normal ajouté à un plasma à tester qui contient un inhibiteur à action immédiate ne corrige peu ou pas le temps de coagulation. Par contre, pour être détectés, les inhibiteurs qui agissent après un temps de latence doivent être incubés avec du plasma normal pendant un certain laps de temps.

Le plasma normal et le plasma à tester sont incubés à 37 °C pendant 1 à 2 heures, séparément et mélangés 50:50. Le TCA du plasma normal, du plasma à tester et du mélange incubé est alors mesuré. Un mélange composé de parts égales de plasma à tester et de plasma normal ayant été incubés séparément (mélange immédiat) est préparé et un TCA est réalisé immédiatement. Le degré de correction du TCA de chaque mélange est comparé.

Une correction faible dans le mélange préparé après l'incubation séparée des plasmas suggère la présence d'un inhibiteur à action immédiate. Une correction faible dans le mélange incubé suggère la présence d'un inhibiteur à action progressive dans le temps.

RÉACTIFS

- Plasma normal : pool de 20 donneurs
- Plasma à tester
- Réactifs pour la détermination du TCA

MÉTHODE

- 1 Préparer trois tubes en plastique : A, B et C.
- 2 Mettre 0,5 ml de plasma normal dans le tube A, 0,5 ml de plasma à tester dans le tube B et 0,2 ml chacun des plasmas normal et à tester dans le tube C.
- 3 Incuber pendant 1 à 2 heures à 37 °C.
- 4 Préparer dans un autre tube un mélange 50:50 à partir des contenus des tubes A et B. Ceci est le tube D, qui sert de mélange immédiat.
- 5 Déterminer le TCA en double pour les tubes A, C, D et B (dans cet ordre).

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

Figure 28.1. Exemple d'un dépistage d'inhibiteur d'un facteur de coagulation basé sur le TCA

Échantillon	1	2	3
A : Plasma normal	40	40	40
B : Plasma à tester	90	90	90
C : Test + normal (incubés après avoir été mélangés ensemble)	45	70	70
D : Test + normal (incubés séparément avant d'être mélangés)	45	48	70

Échantillon 1 : plasma ayant une déficience intrinsèque, mais aucun inhibiteur

Échantillon 2 : plasma ayant un inhibiteur à action progressive

Échantillon 3 : plasma ayant un inhibiteur à action immédiate

Activité du cofacteur ristocétine/activité du facteur von Willebrand (vWF:RCo or vWF:Act)

29

INTRODUCTION

La mesure du cofacteur ristocétine est essentielle pour poser le diagnostic de la maladie de von Willebrand. Bien que l'agrégation plaquettaire induite par la ristocétine (dans du plasma riche en plaquettes) puisse être observée lors d'un test d'agrégation plaquettaire, le test n'est pas suffisamment sensible. De plus, une diminution de l'agrégation peut être causée par des troubles autres que la maladie de von Willebrand. Le test vWF:RCo est particulièrement utile pour la détection des types 2A, 2B et 2M de la maladie de von Willebrand, lorsque le vWF:Ag est normal ou presque, tandis que le vWF:RCo est nettement diminué.

TEST DU COFACTEUR DE LA RISTOCÉTINE

La méthode décrite ci-dessous combine une méthode pour le test macroscopique et la technique de fixation plaquettaire d'Evans et Austen.

RÉACTIFS

- Plasma de référence
- Plaquettes lavées et fixées
Des plaquettes humaines normales fixées au formaldéhyde selon la méthode d'Evans et Austen (1977) sont préparées à partir de concentrés de plaquettes comme ceux employés dans le traitement de patients atteints de désordres plaquettaires. Voir « Préparation des plaquettes fixées », page 85.
- Ristocétine (Ristocetin A SO₄ Macrofarm Ltd., Third Floor, 27 Cockspur Street, Trafalgar Square, London SW1Y 5BN)
100 mg de poudre est dilué dans 3,3 ml de solution saline et aliquoté en quantités de 0,1 ml dans des tubes en plastiques à bouchon et conservés à -70 °C. Cette solution stock a donc une concentration de 30 mg/ml. La concentration finale nécessaire dans le tube de test est 1,0 mg/ml. Comme ce test comporte une dilution de 1 à 4, une solution de 4,0 mg/ml est nécessaire. Pour obtenir 4,0 mg/ml, ajouter 0,65 ml de solution saline à 0,1 ml de la solution stock à 30 mg/ml (le temps du blanc-réactif, à savoir 0,2 ml plaquette + 0,1 ml ristocétine + 0,1 tampon devrait être >60 secondes.)
- Solution tampon saline-citrate-albumine 6 g%
Utiliser une solution citrate/saline (une part de citrate trisodique 0,11 M:5 parts de sérum physiologique ordinaire) et ajouter 1,2 g d'albumine bovine à 20 ml du mélange.

MÉTHODE

1 Au moyen de la solution tampon saline-citrate à l'albumine, diluer le plasma normal et le plasma à tester comme suit :

- Plasma étalon : 1/2, 1/4, 1/8
 - Plasma à tester : 1/2, 1/4, 1/8
-

2 Tester chaque dilution à la température de la pièce comme suit :

i. Dans un tube de coagulation en verre, mettre :

- 0,2 ml de plaquettes fixées et lavées (à un taux de $800 \times 10^9/1$ dans une solution de suspension de plaquettes)
- 0,1 ml de plasma dilué

ii. Bien mélanger en évitant autant que possible la formation de bulles.

Ajouter 0,1 ml de ristocétine (4,0 mg/ml, ce qui donne une concentration finale de 1,0 mg/ml).

iii. Enclencher le chronomètre. Incliner le tube vivement dans un sens et dans l'autre au dessus d'un arrière-fond sombre et en éclairant le tube avec une lampe.

iv. Noter le temps requis pour la formation d'un large agrégat visible.

Tester chaque dilution en double et en triple si la différence entre les résultats des doubles divergent de >10 %.

CALCUL

Tracer la courbe du temps d'agglutination des dilutions de plasma normal en fonction de la dilution/concentration sur du papier log-log à deux cycles. Tracer la courbe des temps obtenus avec les dilutions du plasma à tester. Les graphiques devraient montrer des droites parallèles.

La concentration en cofacteur ristocétine dans le plasma à tester est établie à partir de l'étalon et doit être corrigée pour tenir compte de la dilution et de la valeur de l'étalon d'une manière similaire à celle décrite dans la section expliquant la démarche pour le test en un temps du facteur VIII (chapitre 23).

L'intervalle de référence doit être établi localement, mais il se situe généralement entre de 50-150 UI/dl.

29.1 Préparation des plaquettes fixées

Figure 29.1. Réactifs pour la préparation des plaquettes fixées

Solution EDTA 0,2 %	2 g EDTA disodique, 8,5 g NaCl, eau distillée à 1 litre, pH 6,4.
Solution de fixation	20 ml x 40 % solution aqueuse de formaldéhyde (ou 22,2 ml 36 % formaldéhyde). 0,2 g EDTA de disodique, 8,5 g NaCl, 0,4 hydrogénophosphate disodique, 1,1 g dihydrogénophosphate de sodium dihydrate, eau distillée à 1 litre, pH 6,4.
Solution de lavage	1 part de solution de citrate trisodique (3,8 %) 5 parts de solution saline, pH 6,4.
Solution de suspension	Comme la solution de lavage, mais avec pH 7,4.
Solution de conservation	0,2 g EDTA disodique, 8,5 g NaCl, 0,10 g azoture de sodium, eau distillée à 1 litre, pH 6,4.

MÉTHODE

- 1 Recueillir des plaquettes aussi fraîches que possible dans du citrate-phosphate dextrose (tel qu'utilisé dans le prélèvement des produits sanguins) ou prélever le sang dans du citrate 0,109 M et préparer le plasma riche en plaquettes (PRP).
- 2 Laisser le PRP dans un récipient en plastique fermé à la température de laboratoire pendant une heure et ensuite à 37 °C pendant une heure. Mélanger neuf parts de PRP avec une part de solution d'EDTA. Laisser reposer pendant deux minutes à la température de laboratoire.
- 3 Ajouter un volume égal de solution de fixation à 4 °C et laisser à 4 °C pendant une nuit entière.
- 4 Centrifuger à 280 g pendant 20 minutes. Jeter le surnageant et égoutter la pastille de plaquettes.
- 5 Ajouter une quantité de solution de lavage équivalant à 2 % du volume de PRP de départ et resuspendre les plaquettes.
- 6 Diluer jusqu'à 25 % du volume de PRP de départ et laisser à 4 °C pendant une heure.
- 7 Centrifuger à 280 g pendant 20 minutes, vider le surnageant et resuspendre à nouveau dans la solution de suspension pour usage immédiat, ou conserver à 4 °C dans la solution de conservation pour usage ultérieur.
- 8 Resuspendre à nouveau à une concentration d'environ $800 \times 10^9/l$.



Les plaquettes se stabiliseront lors de la conservation pour former un sédiment dispersé. Avant de commencer un test, enlever la solution de conservation se trouvant au-dessus des plaquettes et la remplacer par un volume égal de solution de suspension. Les plaquettes seront alors stables pendant au moins deux mois.

RÉFÉRENCE

Evans RJ, Austen DE. Assay of ristocetin cofactor using fixed platelets and a platelet counting technique. *Brit J Haemato* 1997; 37: 289-94.

Antigène du facteur von Willebrand par test ELISA (vWF:Ag)

30

PRINCIPE

Un anticorps polyclonal dirigé contre le facteur von Willebrand (vWF) humain est fixé à la surface plastique des puits d'une microplaque. Des dilutions de plasma à tester et de plasma étalon sont ajoutées et incubées, période pendant laquelle le vWF est fixé par l'anticorps. Un deuxième anticorps couplé à un enzyme est ajouté, qui à son tour se fixe sur le vWF. Les anticorps fixés et ensuite le vWF présent sont quantifiés par adjonction d'un substrat chromogénique de l'enzyme suivi d'un développement de la couleur.

TAMPONS

- Tampon carbonate 0,05 M pH 9,6
Pour 1 litre : 1,59 g carbonate de sodium
2,93 g hydrogénocarbonate de sodium
0,20 g azoture de sodium
- Solution saline dans un tampon phosphate 0,01 M pH 7,2
Pour 1 litre : 0,345 g dihydrogénophosphate de sodium
2,680 g hydrogénophosphate disodique $12H_2O$.
8,474 g chlorure de sodium
PBS Tween 20 1 ml/l
PBS Tween 20 0,5 ml/l
- Tampon citrate-phosphate 0,1 M pH 5,0
Pour 1 litre : 7,30 g acide citrique
23,87 g hydrogénophosphate de disodique $12H_2O$

SOLUTION DE SUBSTRAT

80 mg 1,2 dichlorure d'orthophénylène diamine dissout dans 15 ml de tampon de citrate-phosphate et 10 µl de peroxyde d'hydrogène à 20%.

Note : Il faut refaire cette solution à chaque fois.

AUTRE ÉQUIPEMENT

- Anticorps anti-vWF
Exemple : vWF antihumain de lapin de DAKO a/s (Production Svej, DK-2600, Glastrup, Danemark)
- Anticorps anti-vWF conjugué à l'enzyme peroxydase (également de DAKO)

Note : Des anticorps d'autres sources peuvent être utilisés avec autant de succès. La dilution d'anticorps suggérée ci-dessous peut varier selon la source et le numéro de lot de l'anticorps utilisé.

- Microplaques jetables et lecteur de microplaques
- Solution d'acide sulfurique 10 %

MÉTHODE

- 1 Ajouter 100 µl d'anticorps dilué au 1/1000 dans du tampon carbonate dans chaque puits qui sera utilisé. Incuber la microplaque pendant une heure dans un bac d'eau à la température de laboratoire.
- 2 Laver les puits avec 0,5 ml/l de PBS Tween. Inverser les microplaques et ensuite tapoter doucement sur du papier absorbant. Répéter le lavage quatre fois.
- 3 Faire des dilutions du plasma étalon (1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/80, 1/160, 1/320) et du plasma à tester (si résultats normaux attendus : 1/20, 1/40, 1/80, 1/160; si résultats abaissés attendus : 1/5) dans 1 ml/l PBS Tween.
- 4 Ajouter 100 µl de chaque dilution aux puits, incuber pendant une heure comme précédemment, et laver comme précédemment.
- 5 Ajouter 100 µl d'anticorps anti-vWF conjugué à la peroxydase DAKO, dilué au 1/1000 dans 1 ml/l PBS Tween à chaque puits et incuber comme précédemment.
- 6 Préparer la solution de substrat pendant ce temps; entourer le récipient avec du papier d'aluminium pour le garder à l'abri de la lumière. Continuer de mélanger jusqu'à ce que les cristaux ou la tablette se soient dissous (ajouter le peroxyde d'hydrogène immédiatement avant l'usage).
- 7 Mettre le lecteur de microplaque en marche.
- 8 Laver à deux reprises avec 0,5 ml/l de PBS Tween et une fois avec 0,1 M de tampon citrate-phosphate.
- 9 Ajouter 100 µl de solution de substrat fraîche dans chaque puits et incuber la microplaque à la température du laboratoire dans un bac à eau pendant environ six minutes (jusqu'à ce que la couleur soit visible dans la dilution la plus faible de l'étalon).
- 10 Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de solution d'acide sulfurique 10 % à chaque puits au même rythme que le substrat a été ajouté. Si une pipette à canaux multiples est utilisée, il est pratique d'ajouter le substrat à chaque rangée de puits à des intervalles de 10 secondes, et ensuite d'ajouter l'acide sulfurique en suivant la même séquence (à des intervalles de 10 secondes).

11 Lire la densité optique (DO) à 492 nm.

Les résultats sont obtenus en traçant la courbe de la DO en fonction de la dilution sur du papier log-log. La marche à suivre pour dessiner le graphique est indiquée dans la description du dosage en un temps du facteur VIII, au chapitre 23.

Test de liaison au collagène du facteur von Willebrand (vWF:CB)

PRINCIPE

Le facteur von Willebrand (vWF) a plusieurs fonctions. En plus d'être la protéine porteuse du facteur VIII dans le plasma, formant un complexe qui protège le facteur VIII de la protéolyse, il agit également comme médiateur dans l'agrégation des plaquettes en se fixant aux récepteurs membranaires des plaquettes (GpIb et GpIIb/IIIa) lors de l'activation des plaquettes. Il est également important dans l'hémostase primaire, où il agit comme un médiateur entre les plaquettes et le sous-endothélium.

Le vWF:RCo (chapitre 29) est une mesure des propriétés adhésives du vWF, mais il ne reflète pas toujours la fonction physiologique du vWF. La mesure de la capacité du vWF à se lier au collagène peut mieux refléter parfois sa fonction physiologique. Dans la plupart des cas (mais pas dans tous les cas) de maladie de von Willebrand, il y a concordance entre les résultats de vWF:RCo et de vWF:CB. Dans de rares cas de maladie de von Willebrand, l'une de ces activités est réduite tandis que l'autre est dans l'intervalle de référence. La caractérisation complète peut nécessiter les deux tests, quoique de nombreux centres n'en utilisent qu'un seul. Certains auteurs choisissent le test vWF:CB en l'absence d'un test vWF:RCo suffisamment précis.

Un certain nombre de trousse sont vendues sur le marché au moment de la rédaction du présent manuel. Un exemple est donné ci-dessous, mais d'autres trousse sont aussi utilisées avec succès. L'inclusion de cette méthode particulière dans le manuel ne constitue pas une recommandation pour le produit d'une société particulière. Si vous utilisez une trousse commerciale différente, il est important de suivre les directives du fabricant.

RÉACTIF

Trousse TECHNOZYM VWF:CBA ELISA (Technoclone, Vienne, Autriche)

Conserver à 2 °C–8 °C, selon les directives du fabricant.

ÉCHANTILLONS

Le plasma citraté à tester et les étalons peuvent être conservés congelés à des températures < -35 °C avant l'analyse.

MÉTHODE

- 1 S'assurer que la trousse a été portée à température ambiante 30 minutes avant de commencer le test. La trousse peut être divisée en trois ou en quatre portions, selon le nombre d'échantillons à analyser.

- 2 Reconstituer les échantillons, étalons et contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée et laisser reposer pendant 15 minutes, ou décongeler si congelé préalablement. Bien agiter-mélanger pendant 10 secondes.
- 3 Diluer tous les plasmas à tester, contrôles et étalons 1 + 25 (à savoir 20 µl plasma et 500 µl de tampon d'incubation) et agiter-mélanger ensuite.
- 4 Aliquoter et congeler les plasmas étalons et contrôles et les conserver à -80 °C.
- 5 Ajouter 100 µl de chaque dilution d'échantillon dans le puits approprié, recouvrir d'un film et incuber pendant 45 minutes à température ambiante (20-25 °C). Effectuer tous les tests en double.
- 6 Préparer le tampon de lavage. Diluer 1 part de tampon de lavage concentré avec 9 parts d'eau distillée et bien mélanger. Avant la dilution, tous les précipités cristallins éventuellement présents doivent être dissous en incubant la solution concentrée à 37 °C pendant 10 minutes.
- 7 Après 45 minutes, laver trois fois en distribuant 200 µl de tampon de lavage dilué dans chaque puits. Ensuite, inverser et tapoter doucement sur du papier absorbant.
- 8 Préparer la solution de travail du conjugué en diluant 1 part de conjugué à 50 parts de tampon d'incubation. Préparer la solution juste avant l'utilisation, puisqu'elle n'est stable que pendant 60 minutes. Pour 8 puits, mélanger 20 µl de conjugué à 1000 µl de tampon.
- 9 Ajouter 100 µl de solution de conjugué diluée à chaque puits, recouvrir et incuber à température ambiante pendant 45 minutes.
- 10 Laver trois fois avec 200 µl de solution tampon de lavage comme précédemment. Ensuite, inverser et tapoter doucement sur du papier absorbant.
- 11 Ajouter 100 µl de solution de substrat à chaque puits, recouvrir d'un film et incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
- 12 Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits.
- 13 Agiter pendant 10 secondes. Au moyen d'un lecteur de microplaques approprié, mesurer les densités optiques (DO) dans un délai de moins de 10 minutes, à 450 nm.
- 14 Tracer le graphique point à point (manuellement ou au moyen d'un progiciel de statistiques) la concentration de vWF:CB (axe x) en fonction de la DO (axe y), en utilisant du papier bilinéaire.

Intervalle de référence : 0,49-1,32 UI/ml

LECTURE SUPPLÉMENTAIRE

Favaloro EJ. An update on the VWF collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33:727-44.

Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FG, Keeling D, Peake IR, Pasi KJ. The diagnosis of VWD: A guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia* 2004; 10:199-217.

Test de liaison au facteur VIII pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand de type Normandie 32

PRINCIPE

La maladie de von Willebrand de type 2 est une forme qualitative de la maladie de von Willebrand qui altère l'activité de la protéine. La maladie de type 2N (de Normandie) est caractérisée par des taux anormalement bas de facteur VIII:C, dus à une diminution de l'affinité du vWF pour le facteur VIII. Cela se traduit par une diminution de la fixation du facteur VIII au vWF. Une partie du facteur VIII n'est pas protégé contre la dégradation/l'élimination, ce qui résulte en une concentration plus basse dans le plasma. Les mutations responsables de la maladie de von Willebrand de type 2N se trouvent dans le domaine de liaison du vWF au facteur VIII. Phénotypiquement, les patients atteints de la maladie de von Willebrand de type 2N ressemblent aux patients atteints d'hémophilie légère – facteur VIII:C réduit, des taux souvent normaux de vWF:RCo et de vWF:Ag, mais, contrairement aux hémophiles, ils présentent un caractère récessif autosomique congénital.

Le test de liaison au facteur VIII est une méthode basée sur une analyse de type ELISA permettant de déterminer si le vWF se lie normalement ou non au facteur VIII. On utilise un anticorps monoclonal pour capter le vWF, du chlorure de calcium pour séparer le facteur VIII endogène lié au vWF et on ajoute une quantité connue de facteur VIII recombinant qui va se lier au vWF. Le facteur VIII fixé au vWF est ensuite mesuré par un test chromogénique du facteur VIII. Une méthode pour la mesure de la liaison du facteur VIII, basée sur une technique publiée (Nesbitt et al. 1996), est décrite ci-dessous.

Les résultats obtenus avec un test commercial mis au point récemment (Asserachrom VWF:FVIII B Diagnostica Stago) ont été publiés sous forme d'abstract (Caron et al. 2009). Ce test est similaire à celui décrit ci-dessous pour les premières étapes de l'analyse. Il utilise des puits de microplaques sensibilisés avec un anticorps de lapin anti-vWF, qui lie le complexe vWF/FVIII du plasma (après dilution) des patients. Après l'élimination du facteur VIII endogène (du patient), du facteur VIII recombinant est ajouté qui se lie au vWF immobilisé du patient. Ce test commercial diffère de celui décrit ci-dessous dans la méthode de détection du facteur VIII lié. Un anticorps murin anti-facteur VIII humain conjugué à la peroxydase est utilisé. Il a été rapporté que le test a une sensibilité et une spécificité de 100 % basé sur l'analyse de 37 cas diagnostiqués préalablement de maladie de von Willebrand de type 2N et de 13 cas porteurs d'une mutation hétérozygote (Caron et al. 2009). Le coefficient de variation de la reproductibilité de la mesure du % de liaison du facteur VIII est <10 %.

RÉACTIFS

- Anticorps monoclonal MAS 533p au site de liaison GPIIb du vWF (Oxford Biotechnology OBT0085, Oxford, U.K.)
Conserver à 4 °C, conformément aux directives du fabricant. Noter que des anticorps d'autres sources peuvent être employés avec succès.
- Concentré de facteur VIII 2,5 U/ml (p. ex. Advate, Baxter Pharmaceutical)
Conserver à -80 °C.

Le concentré est dilué dans un tampon HEPES préparé à partir de :

- 2,763 g/l HEPES (forme acide)
 - 2,188 g/l HEPES (sel)
 - 8,19 g/l NaCl
 - Ajouter 1 % d'albumine bovine
 - Ajuster à 100 ml, pH à 7,35
- Trousse Coatest FVIII chromogenic (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, U.S.A.). Une trousse suffit pour deux plaques. Préparer la trousse et congeler les réactifs restants à -80 °C.
 - Acide acétique 20 %
 - Échantillons pour contrôle de qualité
Inclure un contrôle normal et, si disponible, un contrôle de vWF de type Normandie.

TAMPONS

Ces solutions tampons peuvent être colorées avec des colorants alimentaires afin d'améliorer leur visibilité dans la microplaque. Préparer des tampons frais pour chaque test.

- Tampon de citrate-phosphate 0,1M pH 5,0
Pour 0,5 l :
 - 3,65 g acide citrique (BDH 10081)
 - 4,74 g hydrogénophosphate disodique anhydre (BDH 102494C)
- Solution saline tampon Tris 10x (TBS) : 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0
Pour 0,5 l :
 - 30,27 g Tris (Sigma)
 - 29,22 g NaCl (Sigma)

Nécessite environ 60 ml HCL 1M pour obtenir le pH désiré.

- Solution tampon de lavage : TBS/0,1 % albumine bovine
Pour 1 litre :
 - 100 ml TBS 10x
 - 900 ml H₂O
 - 1 g albumine bovine (Sigma)
- Tampon de dilution du plasma : TBS/3 % albumine bovine
Pour 100 ml :
 - 10 ml TBS 10x
 - 90 ml H₂O
 - 3 g albumine bovine (Sigma)

- Solution de chlorure de calcium 0,35M
Pour 50 ml :
 - 17,5 ml solution de chlorure de calcium 1M
 - 32,5 ml H₂O
- Solution de dilution pour le facteur VIII
Pour 100 ml :
 - 100 ml solution tampon de lavage
 - 0,147 g chlorure de calcium
 - 0,002 ml Tween 20 (Sigma P5927) : tremper l'embout jaune de la pipette dans le Tween et laisser tomber une goutte dans le tampon.

MÉTHODE

Ce test est effectué sur trois jours consécutifs. Assurez-vous que les résultats du vWF:Ag sont disponibles pour chaque patient à tester avant de commencer cette analyse.

Jour 1 (après-midi)

- 1 Diluer l'anticorps monoclonal MAS 533p (Oxford Biotechnology) dans 0,1M de solution tampon citrate pH 5,0 à une concentration de 2,5 µg/ml (50 µl d'anticorps dans 10 ml de solution tampon).
- 2 Coater la microplaque NUNC avec 100 µl du mélange anticorps/ tampon, recouvrir de parafilm et laisser reposer toute une nuit à 4 °C. Comme la quantité de solution ne suffit pas pour 12 colonnes, ne pas coater la colonne 12.

Jour 2 (après-midi)

- 3 Laver quatre fois avec le TBS (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) contenant 0,1 % d'albumine bovine et absorber l'excédent de liquide en tapotant sur du papier absorbant.
- 4 Dispenser 100 µl/puits de dilutions sérielles de plasma (~1 U/dl vWF:Ag-0,125 U/dl vWF:Ag) dans du TBS/ 3 % albumine bovine et incuber à 4 °C pendant une nuit dans une boîte humide. Voir « Protocole de dilution » ci-dessous et la disposition de la microplaque à la Figure 32.1.

Protocole de dilution

- Quatre dilutions de chaque plasma à tester sont préparées par des dilutions sérielles. Commencer par au moins 0,6 ml de la première dilution.
- Le taux de vWF:Ag doit être connu avant de commencer ce test. Chaque échantillon doit être dilué afin d'obtenir une concentration de 1 U/dl (0,01 U/ml). Par exemple, si le taux de vWF:Ag est de 0,90 UI/ml, faire une dilution de départ de 1/90; si le taux de vWF:Ag est de 0,06 UI/ml, faire une dilution de départ de 1/6, etc.
- Pour les échantillons de contrôle et ceux des patients, diluer selon le taux de vWF:Ag arrondi au 0,05 U/ml près (à savoir, si le vWF:Ag = 0,13, diluer 1/15, etc.).

Jour 3 (commencer vers 9 h 30)

- 5 Laver comme précédemment.
- 6 Pour éliminer le facteur VIII endogène, incuber deux fois pendant une heure avec 100 µl de CaCl_2 0,35 M à température ambiante. Jeter le premier CaCl_2 avant d'ajouter le deuxième volume. Ne pas laver entre les deux adjonctions.
- 7 Laver comme précédemment.
- 8 Diluer 200 µl de facteur VIII dans 10 ml de diluant pour facteur VIII afin d'obtenir 0,05 U/ml facteur VIII. Dispenser 100 µl dans chaque puits et incuber pendant deux heures à 37 °C.
- 9 Laver comme précédemment.
- 10 Utiliser la trousse chromogénique Coatest SP4FVIII comme suit :
 - i. Sortir la trousse de la chambre froide 30 minutes avant l'utilisation afin de la thermostatiser.
 - ii. Préparer les réactifs conformément au feuillet inclus dans la trousse :
 - Facteur IXa + facteur X dans 3 ml d'eau distillée, préparer 2 flacons de chaque
 - S-2765 dans 12 ml d'eau distillée
 - iii. Dans un flacon jetable approprié, mélanger :
 - 5 parts de facteur IXa + facteur X (4,12 ml) (frais)
 - 1 part de phospholipides (0,83 ml)
 - 3 parts d'une dilution 1/10 de solution tampon de la trousse (250 ml tampon de la trousse et 2,25 ml d'eau)
 - iv. Dispenser 75 µl de ce mélange dans chaque puits et incuber ensuite pendant cinq minutes à 37° C.
- 11 Sans jeter le mélange, ajouter 25 µl de CaCl_2 0,025 M de la trousse dans chaque puits. Incuber pendant cinq minutes à 37 °C.
- 12 Ajouter 50 µl de substrat chromogénique S-2765 dans chaque puits.
- 13 Laisser à 37 °C jusqu'à ce que la couleur se développe (généralement environ 20 minutes) et que le contrôle 1,0 U/dl ait une densité optique (DO) entre 0,8-1,0. Lire avec un lecteur de microplaques à 405 nm.
- 14 Arrêter la réaction avec 50 µl d'acide acétique 20 % (préparé à partir de 2 ml d'acide acétique glacial et 8 ml d'eau).
- 15 Lire la densité optique de chaque puits une deuxième fois avec le lecteur de microplaques à 405 nm (filtre 1).
- 16 Tracer la courbe de la concentration de l'antigène du facteur von Willebrand en fonction de la densité optique à 405 nm du facteur VIII lié. Les résultats doivent être notés sous forme graphique et sous forme de rapport d'analyse (voir « Interprétation des données », ci-dessous).

Figure 32.1. Disposition d'une microplaque à 96 puits

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V1	CTL 1,0	PT2 1,0	PT4 1,0	PT6 1,0	PT8 1,0	CTL 1,0	PT2 1,0	PT4 1,0	PT6 1,0	PT8 1,0	
B	V2	CTL 0,5	PT2 0,5	PT4 0,5	PT6 0,5	PT8 0,5	CTL 0,5	PT2 0,5	PT4 0,5	PT6 0,5	PT8 0,5	
C	V3	CTL 0,25	PT2 0,25	PT4 0,25	PT6 0,25	PT8 0,25	CTL 0,25	PT2 0,25	PT4 0,25	PT6 0,25	PT8 0,25	
D	V4	CTL 0,125	PT2 0,125	PT4 0,125	PT6 0,125	PT8 0,125	CTL 0,125	PT2 0,125	PT4 0,125	PT6 0,125	PT8 0,125	
E	V5	PT1 1,0	PT3 1,0	PT5 1,0	PT7 1,0	N 1,0	PT1 1,0	PT3 1,0	PT5 1,0	PT7 1,0	N 1,0	
F	V6	PT1 0,5	PT3 0,5	PT5 0,5	PT7 0,5	N 0,5	PT1 0,5	PT3 0,5	PT5 0,5	PT7 0,5	N 0,5	
G	V7	PT1 0,25	PT3 0,25	PT5 0,25	PT7 0,25	N 0,25	PT1 0,25	PT3 0,25	PT5 0,25	PT7 0,25	N 0,25	
H	V8	PT1 0,125	PT3 0,125	PT5 0,125	PT7 0,125	N 0,125	PT1 0,125	PT3 0,125	PT5 0,125	PT7 0,125	N 0,125	

V = vide

CTL = plasma contrôle

PT = échantillons à tester

N = plasma contrôle von Willebrand de type Normandie (si disponible)

Tester huit patients sur une même plaque.

INTERPRÉTATION DES DONNÉES

- 1 Calculer la densité optique (DO) moyenne de chaque échantillon de patient, contrôle et contrôle négatif.
- 2 Dans Excel, ouvrir une nouvelle feuille de travail et saisir les données suivantes :
 - Colonne A – dans A1 : vWF:Ag U/dl; dans A2 : 1,0; dans A3 : 0,5; dans A4 : 0,25; dans A5 : 0,125
 - Colonne B – dans B1 : nom du patient; B2-5 : DO moyenne pour les quatre dilutions du plasma à tester
 - Colonne C – dans C1 : Contrôle normal; C2-5 : DO moyenne pour les quatre dilutions des contrôles
 - Colonne D – dans D1 : contrôle de type Normandie; D2-5 : DO moyenne des quatre dilutions de RD

-
- 3 Sélectionner « Assistant graphique à nuage de points (XY) » avec des droites lissées. Sélectionner les quatre colonnes et les OD et s'assurer que les séries sont en colonnes.
 - 4 Sur le graphique résultant, l'axe x doit être intitulé « vWF:Ag U/dl ». Intituler l'axe y « Liaison du facteur VIII à 405 nm ». Intégrer le graphique dans la feuille 1 comme un objet.
 - 5 Ajouter une droite de tendance linéaire aux courbes du contrôle normal et des plasmas des patients et choisir « afficher l'équation » sur le graphique. Ceci révélera une formule pour chaque courbe qui ressemble à $y=0...x + 0...y$. Utilisez la partie « $0...x$ » pour calculer le rapport gradient du patient/gradient contrôle.
-

RÉFÉRENCES

- Caron C, Ternisien C, Wolf M, Fressinaud E, Goudemand J, Veyradier A. An accurate and routinely adapted ELISA for Type 2N von Willebrand disease diagnosis. Abstracts of Congress of International Society for Haemostasis and Thrombosis, Boston, 2009.
- Nesbitt IM, Goodeve AC, Guilliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Characterisation of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost* 1996; 75:959-64.

Analyse des multimères du facteur von Willebrand

33

PRINCIPE

Le principe de l'analyse des multimères est la séparation électrophorétique des multimères du facteur von Willebrand sur gels d'agarose-SDS en fonction de leurs poids moléculaires, suivie d'une visualisation non radioactive au moyen d'un système d'anticorps conjugué à la phosphatase alcaline. Dans la méthode Enayat, trois concentrations de gels de séparation sont préparées, allant de 1 % à 1,8 % d'agarose (typiquement 1,2 %, 1,4 % et 1,8 %) afin de d'analyser la totalité des multimères du facteur von Willebrand (à 1 %), ainsi que la structure en triplet particulière de chaque multimère (à 1,8 %).

Cette méthode est dérivée de Enayat (1983) et Ruggeri (1981).

Figure 33.1. Horaire de travail de l'analyse des multimères du facteur von Willebrand

JOUR/ HEURE	Lundi/ Mardi	Mardi/ Mercredi	Mercredi/ Jeudi	Jeudi/ Vendredi
8 h	Le jour précédant l'analyse préparer les tampons, sauf le tampon du gel de séparation.	Observer le colorant marqueur. Arrêter lorsqu'il atteint la mèche. Au besoin augmenter le courant.		
9 h		Rincer les gels dans H ₂ O.	Rincer le gel dans H ₂ O. Rincer le gel dans TBS/Tween face vers le haut à 8 reprises avant la fin de la journée.	Rincer le gel dans H ₂ O. Rincer le gel dans TBS/Tween face vers le haut à 8 reprises avant 15 h.
10 h	Préparer le tampon du gel de séparation; ajouter l'agarose.	Sécher les gels au moyen d'un sèche-cheveux réglé sur froid.*		
11 h	Préparer les plaques; mettre le reste du gel tampon au four micro-ondes.			
11 h 30	Le laisser se refroidir à 65 °C-60 °C avant de le verser.			

12 h	Laisser le gel se figer à température ambiante pendant 30 minutes, et ensuite à 4 °C pendant une heure.			
14 h	Mettre le système de refroidissement en marche. Diluer et prendre le pH du tampon d'électrophorèse. Couper les mèches. Décongeler les échantillons du patient et le pool jaune; diluer au besoin.			
15 h	Découper les puits. Ajouter le plasma du patient. Faire migrer à 30 mA (230 V) pendant 30 minutes.	Mettre le gel dans 150 ml TBS-lait 5 % <i>face vers le haut</i> sur le mélangeur rotatif.		Vider le dernier lavage et verser la solution PA sur les gels <i>face vers le haut</i> .
16 h	Lorsque les échantillons sont à l'extérieur des puits, remplir ceux-ci avec le gel tampon restant et réduire le courant à 5 mA (110 V).			Après le développement de la couleur (45-60 minutes), arrêter la réaction en rinçant à plusieurs reprises dans H ₂ O. Sécher les gels au moyen d'un sèche-cheveux réglé sur froid.
17 h		Rincer les gels dans H ₂ O. Mettre le gel <i>face vers le bas</i> dans 25 ml d' <i>anti-corps primaire</i> pendant une nuit dans une cuve en verre.	Rincer les gels dans H ₂ O. Mettre le gel <i>face vers le bas</i> dans 25 ml d' <i>anti-corps secondaire</i> pendant une nuit dans une cuve en verre.	

*FACULTATIF : pour accélérer le processus de séchage, écraser les gels pendant 30 à 60 minutes, et sécher ensuite sous air chaud (p. ex. au moyen d'un sèche-cheveux à usage domestique).

RÉACTIFS

Préparer des tampons frais pour chaque test. Tous les réactifs sont faits à partir d'eau distillée et leur pH est ajusté.

- Tampon du gel de séparation : TRIS 0,4M, SDS 0,1 %, pH 8,8
 - 4,54 g de Tris-base (SIGMA T1503)
 - 0,1 g SDS (dodécylsulfate de sodium) (BDH 436696N)
 - 100 ml H₂O distillée

Dans un erlenmeyer de 100 ml, agiter par rotation :

- 100 ml tampon du gel de séparation
- 1,6 g agarose Seakem HGT (P) (Seakem 50050) pour gels ordinaires **OU**
- 1,8 g agarose pour la séparation des triplets **OU**
- 1,0 g agarose pour les multimères de poids moléculaire élevé

Employer 1,6 % pour les multimères de poids moléculaire élevé et 1,8 % pour la visualisation des triplets.

Note : Une concentration d'agarose plus basse (de 1,2%) permet de visualiser uniquement les multimères de poids moléculaire élevé; une concentration d'agarose plus élevée (de 1,8 %) permet de visualiser à la fois les multimères de bas poids moléculaire et de poids moléculaire élevé.

Ce volume suffit pour deux gels.

- Tampon pour les électrodes : pH 8,35

Concentré 10x

- 15,15 g Tris-base
- 72,1 g glycine
- 5 g SDS
- 500 ml H₂O distillée

Solution de travail

Ajouter 200 ml de tampon concentré 10x à 1800 ml H₂O distillée; pH 8,35

- Tampon pour l'échantillon : Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0

Solution stock concentrée 10x

- 1,21 g Tris-base / trizma (SIGMA T1503)
- 0,07 g EDTA disodique (BDH 10093)

Compléter à 100 ml avec H₂O distillée.

Solution de travail

Diluer à 1:10 le tampon pour échantillon concentré 10x dans 100 ml de H₂O distillée pour obtenir la solution de travail et ajouter ensuite :

- 4,8 g urée (BDH 102904W)
- 0,2 g SDS (dodécylsulfate de sodium) (BDH 436696N) pH 8,0

- Solution saline tampon Tris de réserve (TBS) : Tris 50mM, NaCl 150mM, pH 7,4
 - 12,1 g Tris-base
 - 18 g NaCl
 - 2 l H₂O distillée

- Tampon de blocage
 - 20 g de lait en poudre 5 % délipidé
 - 133 ml solution de réserve TBS
- Tampon de lavage
 - 500 µl Tween 20
 - 1 l solution TBS de réserve
- Anticorps primaire
Anticorps polyclonal de lapin antifacteur von Willebrand humain (anticorps vWF:Ag; par exemple, Dako A0082)
- Anticorps secondaire
Anticorps porcin anti-lapin conjugué à la phosphatase alcaline (par exemple, Dako D0306)
- Trousse de substrat pour la phosphatase alcaline (Biorad 170-6432)
- Support pour gel de type Gel Bond (Biowhittaker Molecular Applications 53750)

MÉTHODE

Jour 1 : Préparation du gel et électrophorèse

- 1 Mettre l'agarose et le tampon du gel de séparation au four micro-ondes jusqu'à ce qu'ils soient transparents et laisser solidifier. Lorsque vous êtes prêts à le verser, faire fondre à nouveau et le laisser se refroidir à 65 °C avant de le verser (recouvrir de papier d'aluminium pour éviter l'évaporation).
- 2 Verser le gel dans un « sandwich » fait de deux plaques en verre (200 x 120 mm) et d'un séparateur en forme de U (15 mm de large) positionné au-dessus de la plaque comme décrit ci-dessous.
- 3 Découper un morceau de film gel-bond en utilisant le séparateur de gel comme patron. Humecter une des plaques de verre et déposer le Gel Bond sur celle-ci avec le côté adjacent au papier (côté hydrophile) tourné vers le haut. Enlever toutes les bulles d'air avec un rouleau. Mettre le séparateur sur le dessus, y déposer ensuite la deuxième plaque de verre et l'immobiliser avec des pinces bulldog sur les côtés et sur le bord inférieur. S'assurer que l'appareil soit à niveau avant d'y verser le gel.
- 4 Pendant que la solution de gel d'agarose est en train de refroidir à 60-65 °C, réchauffer le matériel servant à couler le gel avec de l'eau courante chaude ou un séchoir à cheveux.
- 5 Verser l'agarose dans une seringue préchauffée et l'injecter dans le montage servant à couler le gel au moyen d'un petit morceau de tubulure provenant d'une aiguille à ailettes.
- 6 Mettre une petite quantité de gel d'agarose de côté dans une éprouvette afin de remplir les puits ultérieurement.

- 7 Laisser le gel se solidifier à température ambiante pendant au moins 30 minutes et ensuite à 4 °C dans un bac humide pendant une heure. L'entreposer dans un bac humide s'il n'est pas destiné à l'usage immédiat, en veillant à obturer les bords ouverts avec du parafilm afin d'éviter qu'il ne se dessèche (le gel peut être entreposé pendant une nuit, au besoin).
- 8 Paramétrer la cuve pour électrophorèse pour qu'elle refroidisse à 14 °C et préparer 2 l de tampon d'électrophorèse dilué à 10 % (contrôler le pH après dilution). Mettre 1 l de tampon de chaque côté de la cuve.
- 9 Une fois le gel solidifié, se servir de la matrice pour découper 11 puits sur sa surface. Humecter la plaque d'électrophorèse avec de l'eau distillée et positionner le gel au centre de la plaque de refroidissement blanche/bleue dans la cuve, avec les puits pour échantillons de l'autre bout (cathode).
- 10 Mesurer un morceau de papier filtre (WHATMAN 3030690) d'une longueur de 10-15 cm et le plier trois fois. Plier en deux et déchirer (ceci donne habituellement une bordure plus nette que le découpage) afin d'obtenir de trois à cinq couches au total pour chaque côté. Mesurer la largeur et découper le papier filtre pour obtenir la largeur exacte. Humecter le papier filtre de tampon d'électrophorèse et placer ensuite chaque mèche de papier filtre sur chaque extrémité du gel, en recouvrant le gel par environ 5 mm.
- 11 Diluer les échantillons du patient et le pool jaune en guise de contrôle. Faire des dilutions 1/10 dans la solution tampon de travail pour échantillons si le plasma a un taux de vWF:Ag d'environ 1,0 UI/ml; faire une dilution au 1/2 si le taux est très faible. L'utilisation de plasma non dilué est déconseillée (le facteur de von Willebrand des plaquettes est habituellement dilué à 1/2).
- 12 Nettoyer complètement le matériel servant à couler le gel avec de l'eau chaude après l'utilisation.
- 13 Ajouter 20 ml de l'échantillon dilué, et ensuite 1 ml de bleu de bromophénol dans chaque puits. Le pool jaune (contrôle normal) est placé dans les puits 1, 6 et 11.
- 14 Mettre en place le couvercle de la cuve d'électrophorèse et mettre l'alimentation sous tension, en vérifiant que le fil rouge est attaché au raccordement rouge et le noir au noir. Laisser les échantillons migrer hors des puits en mettant le courant au niveau maximum pendant 30 à 60 minutes. Noter les conditions de l'électrophorèse sur la fiche de travail.
- 15 Mettre hors tension et remplir les puits avec le gel d'agarose mis de côté.
- 16 Effectuer l'électrophorèse à un courant constant de 5 mA pendant environ 20 heures (approx. 80 V). Si la tension est trop élevée, la résistance des mèches doit être ajustée (loi d'Ohm), donc ajouter une mèche à l'extrémité où se trouve la cathode jusqu'à ce que la tension soit acceptable.

Jour 2 : Préparation du gel pour la visualisation

- 17 Le matin suivant, le marqueur de bleu de bromophénol aura migré vers le côté anionique du gel.
- 18 Lorsque le marqueur bleu est approximativement à 1 cm du bord du gel, noter les paramètres de l'électrophorèse et arrêter l'électrophorèse. Enlever le gel du bac à électrophorèse.
- 19 Jeter tout tampon utilisé, nettoyer la cuve avec de l'eau et essuyer soigneusement les supports d'électrode oranges le long du fil métallique.
- 20 Déposer le gel *face vers le haut* dans une cuve en plastique remplie d'eau distillée et le laver doucement pendant une à deux heures sur un mélangeur rotatif ou un agitateur à bascule. Changer l'eau à plusieurs reprises durant la période de lavage.
- 21 Retirer soigneusement les gels et laisser toute l'eau restante s'égoutter sur un papier absorbant.
- 22 Soit sécher à plat avec un sèche-cheveux réglé à chaleur moyenne (le gel étant fixé par ses extrémités) soit écraser le gel recouvert de papier filtre et de papier ménage en mettant plusieurs livres lourds sur celui-ci et en le plaçant sur une tablette à niveau d'eau. Sécher ensuite avec un séchoir à cheveux réglé à la chaleur moyenne, comme précédemment. Le séchage peut prendre plus d'une heure par gel.
- 23 Lorsque les gels seront complètement secs (ils auront une apparence brillante et plate sur le Gel Bond), enlever le Gel Bond qui dépasse mais en laisser sur au moins 5 mm autour du périmètre du gel.
- 24 Déposer le gel *tourné vers le haut* dans une cuve en plastique contenant du TBS + lait délipidé 5 % (Marvel) et incubé pendant au moins 90 minutes (plus c'est long, mieux c'est) lentement sur une bascule Stuart.
- 25 Rincer le gel à plusieurs reprises avec de l'eau distillée.
- 26 Préparer une dilution de 1/2000 d'anticorps primaire anti-facteur von Willebrand dans du TBS. Utiliser 12,5 µl d'anticorps dans 25 ml de TBS. Mettre l'anticorps dilué dans le plat en pyrex destiné à la solution d'anticorps primaire.
- 27 Essuyer l'excédent d'eau du gel et *tourner le gel vers le bas* dans l'anticorps dilué. S'assurer qu'il n'y a aucune bulle d'air entre le gel et l'anticorps dilué.
- 28 Mettre le couvercle sur la boîte et incubé pendant la nuit sur la pailleasse à température ambiante.

Jour 3

- 29 Enlever le gel de la solution d'anticorps primaire et rincer rapidement à plusieurs reprises dans de l'eau distillée.
- 30 Mettre le gel *tourné vers le haut* dans une cuve en plastique. Laver au moins huit fois avec du TBS-0,05 % Tween (100 ml-150 ml/lavage) frais pendant toute la journée, en agitant sur un mélangeur rotatif.
- 31 Préparer une dilution de 1/2000 de l'anticorps secondaire porcin anti-lapin conjugué à la phosphatase alcaline dans du TBS. Utiliser 12,5 µl d'anticorps dans 25 ml de TBS. Mettre l'anticorps dilué dans le plat en pyrex destiné à l'anticorps secondaire.
- 32 Rincer le gel à l'eau distillée. Essuyer l'excédent d'eau du gel et *tourner le gel vers le bas* dans la solution d'anticorps secondaire. S'assurer qu'il n'y ait aucune bulle d'air entre le gel et l'anticorps dilué.
- 33 Mettre le couvercle sur la boîte et incuber pendant la nuit sur la pailleasse à la température ambiante.

Jour 4 : Visualisation des multimères

- 34 Enlever le gel de la solution d'anticorps secondaire et le rincer rapidement à plusieurs reprises dans de l'eau distillée.
- 35 Mettre le gel *tourné vers le haut* dans une cuve en plastique. Laver au moins huit fois avec du TBS-0,05 % Tween (100 ml-150 ml/lavage) frais pendant toute la journée, en agitant sur un mélangeur rotatif.
- 36 Pendant le dernier lavage (vers 15 h), préparer 20 ml de la solution de travail de substrat plasmatique à partir de la trousse 25 x de solution tampon pour le développement de la couleur de la phosphatase alcaline (H102). Diluer 800 µl 25 x tampon PA dans 20 ml d'eau pour chaque gel. Ajouter ensuite 200 µl de la solution A et 200 µl de la solution B au tampon et mélanger complètement.
- 37 Enlever le gel du dernier lavage et enlever tout excédent de liquide.
- 38 Déposer le gel *tourné vers le haut* dans le plat en pyrex destiné au développement de la couleur et verser sur le gel le mélange de substrat préparé.
- 39 Agiter doucement sur l'agitateur à bascule jusqu'à ce que la réaction soit complète et que les bandes des multimères soient révélées. Ceci peut prendre jusqu'à 45 minutes.
- 40 Une fois la réaction achevée, jeter le substrat et laver le gel au moins deux fois dans de l'eau distillée et l'agiter pendant au moins 30 à 60 minutes pour arrêter la réaction.

41 Essuyer tout excédent de liquide du gel et le sécher avec un sèche-cheveux, comme précédemment.

42 Le gel peut être scanné, stocké sous forme informatique et quantifié par densitométrie, au besoin.

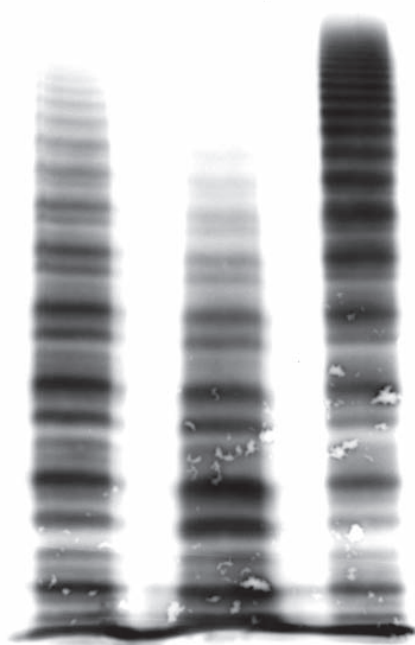
Conformément à la figure 33.2, les résultats obtenus peuvent être interprétés en fonction des images de multimères observées sur le gel.

Figure 33.2. Interprétation des images de multimères

Images de multimères	Interprétation
Présence de multimères de tous les poids moléculaires	Qualitativement normal
Présence exagérée de triplets de bas poids moléculaire	Réduction de multimères de poids moléculaire élevé
Déplétion massive de multimères de poids moléculaire élevé	Légère diminution de multimères de poids moléculaire élevé
Augmentation de la première bande de faible poids moléculaire	Légère réduction des multimères de poids moléculaire élevé
Aucun multimère visible	Aucun multimère détecté

Figure 33.3. Exemple d'un gel de multimères

Note : Les formes du facteur de von Willebrand ayant un poids moléculaire élevé se situent au sommet des colonnes.



Colonne 1 : patient atteint de la maladie de von Willebrand de type 2B

Colonne 2 : patient atteint de la maladie de von Willebrand de type 2A

Colonne 3 : plasma normal dont les multimères sont tous intacts

RÉFÉRENCES

- Enayat MS, Hill FG. Analysis of the complexity of the multimeric structure of FVIII related antigen/von Willebrand protein using a modified electrophoretic technique. *J Clin Pathol* 1983; 36:915-9.
- Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Classification of variant VWD subtypes by analysis of functional characteristics and multimeric composition of FVIII/von Willebrand factor. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370:205-9.

34

Mesure quantitative des inhibiteurs du facteur VIII

PRINCIPE

Les inhibiteurs du facteur VIII qui apparaissent lors de traitements substitutifs chez les personnes atteintes d'hémophilie présentent une cinétique d'inhibition progressive.

Lorsque le facteur VIII est ajouté à du plasma contenant un inhibiteur et que le mélange est incubé, le facteur VIII est progressivement neutralisé. Si la quantité de facteur VIII et le temps d'incubation sont standardisées, le taux de l'inhibiteur peut être défini en unités selon la quantité du facteur VIII ajouté qui est neutralisée.

Le test peut être effectuée avec du facteur VIII humain ou porcin.

La présence d'un inhibiteur peut être soupçonnée en présence d'une demi-vie et d'une récupération réduites du facteur VIII injecté.

TEST DE BETHESDA

La source du facteur VIII est un plasma normal poolé pour la détermination des titres anti-humains et du concentré de facteur VIII porcin dilué dans plasma déficient en facteur VIII pour les titres anti-porcins.

Une unité de Bethesda est définie comme la quantité d'inhibiteur qui neutralise 50 % d'une unité de facteur VIII ajouté en deux heures à 37 °C.

Patients chez qui un inhibiteur n'est pas suspecté :

1. Ajouter des parts égales (0,2 ml) de plasma de patient au plasma normal poolé.
2. Pour contrôle, ajouter 0,2 ml de facteur VIII:C 0 % à 0,2 ml de plasma normal poolé.
3. Incuber à 37 °C pendant deux heures. Effectuer le dosage du facteur VIII:C.

Patients chez qui un inhibiteur est suspecté :

1. Préparer des dilutions du plasma du patient avec de la solution tampon du dosage de facteur VIII. Il vaut mieux préparer trop de dilutions que trop peu. Celles-ci peuvent toujours être conservées sur de la glace pour effectuer une deuxième série de tests après la période d'incubation de deux heures. Si de l'information préalable concernant le titre d'inhibiteur attendu est disponible, la gamme des dilutions à tester doit être suffisamment grande pour atteindre l'une ou l'autre limite de l'intervalle.
2. Une quantité standardisée de facteur VIII sous forme d'un pool de plasma normal est ajoutée à chaque dilution de plasma à tester — celle-ci devrait contenir normalement environ 100 U/dl. Ainsi, chaque mélange mis à incuber a une concentration de départ d'environ 50 U/dl. La concentration

précise n'est pas importante, puisque la même source de facteur VIII est ajoutée à tous les mélanges incubés.

3. Dans le dosage du facteur VIII effectué après l'incubation de deux heures, le mélange contrôle (plasma normal et de plasma déficient en facteur VIII) est utilisé à comme référence normalisée et la concentration en facteur VIII des autres mélanges est calculée en fonction de celle-ci. Ce matériel sert en tant que référence à 100 % dans ce test.

Il est important de tamponner le plasma normal, soit en y ajoutant l'imidazole 0,1M pH 7,4 comme décrit récemment dans la modification Nijmegen ou en utilisant le plasma normal poolé tamponné comme décrit au chapitre 7. Ceci améliore la sensibilité et la spécificité du test. Pour les titres anti-porcins, le plasma porcin n'est pas disponible facilement. Dès lors, il est acceptable d'utiliser du concentré porcin dilué à 1 U/ml dans du plasma déficient en facteur VIII.

4. À la fin de la période d'incubation, le taux résiduel en facteur VIII est mesuré et l'inhibiteur est calculé à partir d'un graphique décrivant la relation entre le facteur VIII résiduel et les unités d'inhibiteurs (voir la Figure 34.1 ci-dessous).

RÉACTIFS/ÉQUIPEMENT

- Tampon d'imidazole (voir le chapitre 9)
- Solution saline tampon d'Owren (voir le chapitre 9)
- Pool de plasma normal (voir le chapitre 7)
Note : ce pool doit être tamponné afin d'améliorer la stabilité du facteur VIII pendant l'incubation de deux heures du test.
- Concentré porcin
- Plasma déficient en facteur VIII
- Réactifs pour la détermination du TCA
- Bain de glace fondante
- Tubes en plastique (75 x 12 mm)

MÉTHODE

Anti-facteur VIII humain

- 1 Préparer des dilutions géométriques du plasma à tester dans des tubes en plastique en volumes de 0,2 ml, en utilisant le tampon imidazole comme diluant. Les dilutions nécessaires varieront en fonction du patient. Nous suggérons comme point de départ de commencer avec du non dilué, 1/2, 1/4, etc.

Note : Si le patient a préalablement subi un test d'inhibiteur, le taux obtenu peut fournir un guide approximatif aidant à déterminer les dilutions à utiliser. Il est également utile de noter si le patient a reçu récemment un traitement quelconque avec du facteur VIII, puisque ceci peut soit augmenter soit diminuer le taux d'inhibiteur.

- 2 Pipetter 0,2 ml de plasma déficient en facteur VIII dans un autre tube en plastique. Ceci servira d'étalon.
- 3 Ajouter 0,2 ml de pool de plasma normal au tube étalon et aux dilutions de plasma à tester. Le taux de facteur VIII dans tous les tubes sera approximativement 0.5 U/ml. Ceci est considéré comme 100 % dans le dosage du facteur VIII qui a lieu à la fin de l'incubation.
- 4 Boucher tous les tubes, les mélanger et les incuber à 37 °C pendant deux heures.
- 5 Deux heures plus tard, transférer tous les tubes dans un bain de glace, sauf si le dosage de facteur VIII est effectué immédiatement.
- 6 Doser le facteur VIII dans tous les mélanges incubés par la méthode habituelle de dosage du facteur VIII, mais en attribuant une valeur de 100 % au tube étalon. Les dilutions qui conviennent au dosage du facteur VIII sont 1/5, 1/10, 1/20.
- 7 Calculer le facteur VIII résiduel de chaque mélange testé, en utilisant l'étalon comme valant 100 %.

RÉSULTATS/INTERPRÉTATION

Choisir la dilution du plasma à tester qui donne le facteur VIII résiduel le plus près de 50 %, tout en restant dans l'intervalle de 30 % à 60 % pour calculer l'inhibiteur. Alternativement, calculer le résultat de chaque dilution et calculer la moyenne. Tout facteur VIII résiduel <25 % et >75 % ne doit **pas** être utilisé dans les calculs du taux d'inhibiteur.

Une courbe du % de facteur VIII résiduel en fonction des unités d'inhibiteur peut être tracée sur du papier log-log, conformément à la définition d'une unité d'inhibiteur (voir la Figure 34.1).

Lire le taux d'inhibiteur correspondant au facteur VIII résiduel pour chaque mélange et le corriger pour tenir compte de la dilution. Par exemple :

Dilution 1/4 + pool normal

Facteur VIII résiduel = 50 %

Unité d'inhibiteur (tiré du graphique) = 1 UB (Unité Bethesda)

Multiplier par le facteur de dilution (1/4) = 4 UB

NOTES

- Les dosages d'inhibiteur sont le plus souvent effectués chez des patients atteints d'hémophilie sévère, qui n'ont donc peu ou pas de facteur VIII:C mesurable. Si le plasma à tester contient plus de 5 U/dl de facteur VIII, il faut en tenir compte lors du calcul du titre d'inhibiteur.

Ceci peut se faire de trois manières :

- La première est d'ajouter davantage de facteur au mélange étalon qu'au mélange à tester afin de compenser la différence en facteur VIII du mélange à tester. Par exemple, si le plasma à tester contient 20 U/dl de facteur VIII, le mélange de contrôle est fait à partir de 120 µl de plasma normal et 80 µl de plasma déficient en facteur VIII (0 %). Le mélange à tester et le mélange étalon contiennent alors tous les deux approximativement 60 U/dl de facteur VIII au début de la phase d'incubation. Cette approche peut uniquement être utilisée si le plasma du patient est testé sous forme non diluée mais non pas après dilution, car la concentration initiale en facteur VIII serait modifiée.
- Alternativement, on peut tenir compte du niveau initial de facteur VIII dans le plasma à tester dans le calcul. Dans ce cas, les mélanges mis à tester sont fabriqués de la façon ordinaire.
- Une autre option est de chauffer le plasma à tester à 58 °C pendant 90 minutes avant l'analyse, ce qui détruira tous les facteurs de coagulation, y compris le facteur VIII. Puisque les immunoglobulines résistent à la chaleur, le titre d'inhibiteur ne sera pas modifié par ce traitement.
- Le plasma déficient en facteur VIII utilisé dans la fabrication du mélange étalon est important. Il doit contenir des taux normaux de facteur von Willebrand, puisqu'il a été démontré que les titres d'inhibiteurs sont de 30 % à 50 % plus bas si le plasma déficient en facteur VIII ne contient pas de facteur von Willebrand (Verbruggen et al. 2001).

Exemple 1 : patient avec 20 U/dl de facteur VIII

Plasma contrôle normal poolé + facteur VIII 0 %

- a. Plasma normal poolé + plasma à tester non dilué – facteur VIII initial = 120 %
- b. Plasma normal poolé + plasma à tester dilué 1/2 – facteur VIII initial = 110 %

Les dosages de facteurs sont effectués après une incubation de deux heures.

- a. Plasma normal poolé + plasma à tester non dilué – facteur VIII = 120 % du contrôle. Facteur VIII résiduel : $120/120 = 100 \%$; résultat de l'inhibiteur : négatif
- b. Plasma normal poolé + plasma à tester dilué 1/2 – facteur VIII = 110 % du contrôle. Facteur VIII résiduel : $110/110 = 100 \%$; résultat de l'inhibiteur : négatif

Exemple 2 : patient avec 20 U/dl de facteur VIII (et présence d'un inhibiteur)

Plasma du patient testé non dilué

Plasma normal poolé + plasma à tester non dilué – facteur VIII initial = 120 % du contrôle

Après incubation de deux heures, effectuer les dosages de facteur VIII.

Plasma normal poolé + plasma à tester non dilué – facteur VIII = 90 % du contrôle

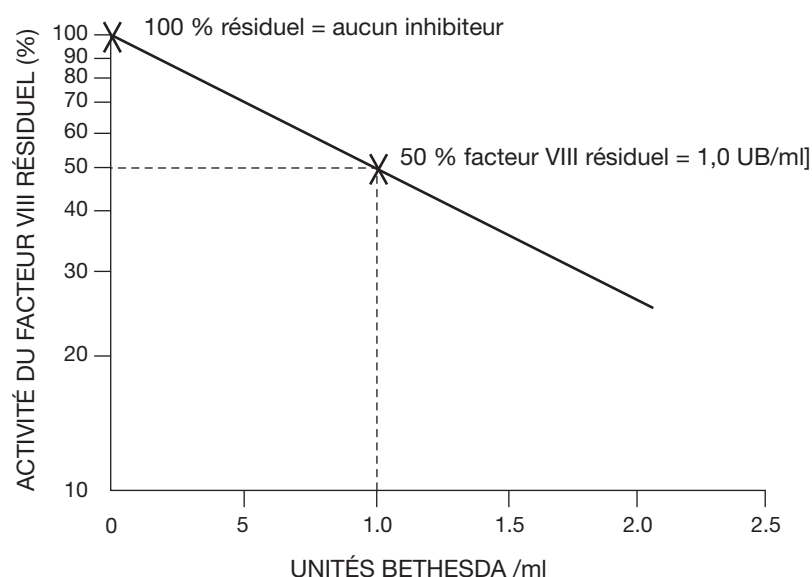
Facteur VIII résiduel = $90/120 = 75 \%$

Anti-facteur VIII porcin

La méthode pour déterminer les inhibiteurs du facteur VIII porcin est essentiellement la même que celle utilisée pour les inhibiteurs humains, sauf en ce qui concerne la source de facteur VIII. Celle-ci doit être d'origine porcine, mais jusqu'à présent, une source fiable de facteur VIII plasmatique porcin n'est pas facilement accessible. Ainsi, du concentré porcin dilué dans du plasma (humain) hémophile à une concentration de 1 U/ml est utilisé.

Note : Si le facteur VIII résiduel se situe entre 80 % et 100 % dans un échantillon qui a été incubé non dilué avec le concentré porcin, il est interprété comme n'ayant pas d'inhibiteur. Bien que le facteur VIII porcin dérivé du plasma n'est pas utilisé actuellement, un concentré recombinant de facteur VIII porcin est en voie de développement au moment de la rédaction du présent manuel.

Figure 34.1. Relation entre facteur VIII résiduel et titre d'inhibiteur



RÉFÉRENCES

- Kasper C, Aledort L, Counts R, Edron J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Laserson J, Levine P, MacMillan C, Pool J, Shapiro S, Shulman N, Eys J. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34:869-872.
- Verbruggen B, Giles A, Samis J, Verbeek K, Meninsk E, Novakova I. The type of FVIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assays for factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2001; 86:1435-1439.
- Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda Assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73:247-251. (for the Nijmegen modification)

PRINCIPE

Les inhibiteurs du facteur IX ont des propriétés cinétiques différentes de ceux du facteur VIII:C, dans le sens où la réaction antigène/anticorps se fait plus rapidement. Le dosage est basé sur l'incubation pendant 10 minutes à 37 °C du plasma du patient et d'une part égale d'une source de facteur IX, suivi d'un dosage du facteur IX.

Une unité d'inhibiteur est définie comme ce qui détruit 50 % de l'activité du facteur IX en 10 minutes à 37 °C.

RÉACTIFS

- Les mêmes que pour le dosage du facteur IX (voir chapitre 23)
- Plasma normal poolé comme source de facteur IX (même plasma poolé que pour le dosage des inhibiteurs du facteur VIII)

MÉTHODE

Si on suspecte la présence d'un inhibiteur, utiliser des dilutions du plasma du patient qui conviennent. Sinon, du plasma non dilué doit être utilisé pour dépister l'inhibiteur.

1 Au moyen de tubes en plastique 75 x 12 mm :

- Test : ajouter 0,2 ml de plasma du patient (ou dilution) à 0,2 ml plasma normal poolé.
- Contrôle : ajouter 0,2 ml de facteur IX à 0 % à 0,2 ml de plasma normal poolé.

2 Contrôle : après 10 minutes d'incubation, effectuer un dosage du facteur IX en se servant du mélange de contrôle comme étalon (comme dans le dosage de l'inhibiteur du facteur VIII).

CALCUL

Exprimer les résultats sous forme de pourcentage de l'activité résiduelle du contrôle. Les unités d'inhibiteurs sont calculées de la même manière que l'inhibiteur du facteur VIII:C de la méthode Bethesda décrite au chapitre 34.

36 Test de l'activité du facteur XIII

PRINCIPE

Tapisser de fibrinogène les puits d'une microplaque. Des liaisons non spécifiques sont évitées par l'utilisation d'un agent bloquant spécial. Le facteur XIII présent dans l'échantillon est activé par de la thrombine en présence de ions de calcium. Lors de l'étape d'incorporation, le facteur XIIIa présent dans le plasma à tester lie le substrat BAPA (5-biothinamidopentylamine) au fibrinogène qui tapisse les puits de la microplaque. La quantité de BAPA liée est proportionnelle à l'activité du facteur XIII de l'échantillon à tester. A l'étape suivante, de la streptavidine conjuguée à de la phosphatase alcaline est ajoutée. Le conjugué se lie au BAPA immobilisé sur la fibrinogène. La phosphatase alcaline convertit le substrat synthétique de phosphate de p-nitrophényle (PpNP) en phosphate et p-nitrophénol, ce dernier est mesuré à 405 nm.

Les réactifs utilisés dans la méthode décrite ci-dessous sont vendus sur le marché sous forme de trousse (Prefakit FXIII incorporation assay, Pentapharm, Suisse). Veuillez noter que d'autres fabricants proposent des tests d'activité, y compris la trousse Berichrom (Siemens, Marburg, Allemagne), qui reposent sur d'autres principes d'analyse.

RÉACTIFS

Tous les réactifs nécessaires sont inclus dans la trousse commerciale.

MÉTHODE

Jour 1

- 1 Laisser les composants de la trousse atteindre la température ambiante pendant 30 minutes.
- 2 Reconstituer le réactif de coating (R2) dans de l'eau distillée selon le volume recommandé par le fabricant.
- 3 Ajouter 100 µl de réactif de coating dans les puits vides de la microplaque.
- 4 Congeler le réactif de coating restant pour usage ultérieur. Il reste stable pendant six mois à -20 °C.
- 5 Obturer les puits utilisés avec des feuilles plastiques adhésives fournies et incuber pendant la nuit (14 à 16 heures) à une température de 20 °C à 25 °C.

Jour 2

- 6 Diluer 50 ml de TBS R1 (solution saline en tampon Tris) concentrée 20 x dans 950 ml d'eau distillée ou volume moindre, au besoin.
 - 7 Diluer 3 ml de réactif bloquant R3 dans 27 ml de TBS R1 dilué. Congeler l'excédent de R3.
 - 8 Jeter le réactif de coating de la microplaque, inverser la microplaque et la tapoter au dessus d'un papier absorbant pour enlever les restes de liquide.
 - 9 Ajouter 300 µl de réactif bloquant dilué dans chaque puits.
 - 10 Incuber pendant 60 à 90 minutes à 37 °C dans un incubateur.
 - 11 Reconstituer le R10 d'étalonnage dans 0,5 ml d'eau distillée et les trois contrôles, R11, R12 et R13, dans 0,2 ml d'eau distillée.
 - 12 Décongeler le plasma à 37 °C pendant cinq minutes avant l'analyse.
 - 13 Préparer un mélange de quelques centaines de ml d'eau et de glace afin de faire un bain de glace fondante.
 - 14 Préparer des dilutions de tous les plasmas à tester et les contrôles, plasma 10 µl et tampon TBS R1 dilué (dilution 1:101). Agiter-mélanger (vortex).
 - 15 Préparer les dilutions suivantes pour l'étalon :
 - Étalon 1 : 30 ml R10 + 970 ml TBS R1
 - Étalon 2 : 20 ml R10 + 980 ml TBS R1
 - Étalon 3 : 75 ml R10 + 25 ml TBS R1
 - Étalon 4 : 25 ml R10 + 75 ml TBS R1
 - Étalon 5 : 10 ml R10 + 90 ml TBS R1
- Note : Les dilutions 1 et 2 sont prêtes à être utilisées. Diluer ensuite 10 µl des dilutions 3 à 5 dans 1 ml de TBS R1.*
- 16 Laver la microplaque **trois** fois avec 300 µl/puits de TBS R1. Inverser et tapoter au-dessus d'un papier absorbant pour enlever l'excédent de liquide.
 - 17 Reconstituer la partie A (R4) et la partie B (R5) du réactif activateur dans 5 ml d'eau distillé chacun. Conserver dans le bain de glace pendant 30 minutes maximum.
 - 18 Ajouter 25 µl de plasma (étalons, contrôles ou plasmas à tester) dans les puits appropriés. Inclure un échantillon « tampon » de TBS R1.
 - 19 Mélanger les parties A et B des réactifs activateurs (R4 et R5) pour former le réactif d'incorporation final.
 - 20 Ajouter 75 µl du réactif d'incorporation final dans chaque puits, y compris la cupule contenant l'échantillon « tampon ».

- 21 Incuber pendant 30 minutes à 37 °C dans un incubateur.
- 22 Ajouter 200 µl/puits de solution R6 pour arrêter l'incorporation. Mélanger **doucement** pendant 10 minutes sur l'agitateur à microplaque.
- 23 Reconstituer le réactif de détection R7 en ajoutant 12 ml d'eau distillée. Congeler le R7 reconstitué non utilisé.
- 24 Laver la microplaque **quatre** fois avec 300 µl/puits de TBS. Tapoter sur du papier absorbant pour enlever le surplus de liquide.
- 25 Ajouter 100 µl/puits de réactif de détection R7. Incuber pendant 15 minutes à 37 °C dans l'incubateur.
- 26 Laver la plaque **quatre** fois avec 300 µl/puits de TBS. Tapoter sur du papier absorbant pour enlever le surplus de liquide.
- 27 Préparer la solution de substrat **immédiatement** avant de l'utiliser :
- Pour 96 puits (microplaque entière), ajouter 9 comprimés de R8b à 22,5 ml de tampon diéthanolamine R8a
 - Pour 64 puits (8 barettes), ajouter 6 comprimés à 15 ml diéthanolamine
 - Pour 32 puits (4 barettes), ajouter 3 comprimés à 7,5 ml diéthanolamine
 - Pour 24 puits (3 barettes), ajouter 2 comprimés à 5 ml diéthanolamine
- 28 Ajouter 180 ml/puits de la solution de substrat. Incuber pendant 11 minutes à 37 °C dans l'incubateur.
- 29 Ajouter 50 ml/puits de la solution d'arrêt (NaOH 4 M) R9.
- 30 Faire la lecture des densités optiques dans les 15 minutes à 405 nm dans un lecteur de microplaques.

Note : Plusieurs réactifs de la trousse peuvent être congelés pour usage ultérieur, comme décrit précédemment. Cependant, il ne faut pas congeler le substrat, les parties A et B du réactif activateur, les étalons et les contrôles. Des trousse de réactifs contenant les produits qui ne peuvent pas être conservés peuvent être achetées pour être utilisées avec les réactifs partiellement utilisés qui ont été congelés. Ceci réduira le coût par test si les échantillons à tester sont analysés en petits lots.

CALCUL DES RÉSULTATS

Les dilutions de l'étalon et les valeurs des contrôles sont fournies avec chaque trousse.

A l'aide d'un logiciel de traitement de données approprié ou du papier graphique, dessiner une courbe d'étalonnage en traçant la concentration en facteur XIII en fonction de la densité optique des dilutions des étalons après soustraction de la densité optique de l'échantillon « tampon ». Utiliser des échelles linéaire/linéaire. Soustraire la densité optique de l'échantillon « tampon » de la densité optique des dilutions de l'échantillon à tester/du contrôle et convertir les densités optiques en activité du facteur XIII au moyen de la courbe d'étalonnage.

Anticoagulant lupique et anticorps antiphospholipides

37

INTRODUCTION

Il est important pour les laboratoires qui investiguent d'éventuelles diathèses hémorragiques chez les patients de pouvoir détecter la présence d'anticorps qui prolongent les temps de coagulation de tests de laboratoire comme le TCA.

Un groupe d'anticorps pouvant entraîner des prolongations importantes du TCA est un groupe hétérogène couramment désigné par le terme anticorps antiphospholipides (AAP), parfois nommé dans la littérature anticoagulants lupiques ou lupus anticoagulants (LA). Il est désormais évident que lesdits anticorps antiphospholipides sont une famille hétérogène d'anticorps qui réagissent avec des épitopes de protéines, elles-mêmes complexées avec des phospholipides chargés négativement. Beaucoup de ces anticorps ont besoin de beta-2-glycoprotéine 1, une protéine qui se lie aux phospholipides. D'autres peuvent être dirigés contre la prothrombine.

Il est important de noter que ces anticorps peuvent interférer avec les analyses de coagulation au laboratoire, en prolongeant les tests qui dépendent des phospholipides, comme le TCA et, parfois, le TP, mais ils ne sont pas associés au saignement, sauf dans les quelques rares cas où il existe une déficience sévère acquise en prothrombine. Paradoxalement, ces anticorps sont clairement associés avec des thromboses veineuses et artérielles par des mécanismes encore mal élucidés.

Dans les centres qui tentent de diagnostiquer des diathèses hémorragiques, il est nécessaire de pouvoir détecter de tels anticorps par de tests spécifiques lors des investigations chez des patients dont le TCA est prolongé. Plusieurs documents contenant des recommandations ainsi que des revues présentant les résultats obtenus par différentes techniques ont été publiés. Ces revues, ainsi que celles énumérées dans les références se trouvant à la fin de ce chapitre, portent sur l'étude de la détection en laboratoire d'anticoagulants lupiques.

Il est important de reconnaître que les différentes techniques pour la détermination du TCA n'ont souvent pas la sensibilité nécessaire pour détecter la présence de tels anticorps et que, vu la nature hétérogène de ce groupe, les recommandations indiquent qu'il est nécessaire de réaliser plus d'un test pour confirmer la présence d'anticoagulants de type lupique.

Les critères déterminant la présence d'anticoagulants lupiques sont les suivants :

1. Prolongation d'un test de coagulation dépendant de phospholipides.
2. Preuve que la prolongation est due à un inhibiteur, démontrée par des tests de mélanges.
3. Confirmation que l'inhibiteur est dépendant de la présence de phospholipides.
4. Absence d'un inhibiteur dirigé contre un facteur de coagulation (comme les facteurs VIII:C, IX:C ou XI).

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Il est important de s'assurer que la quantité de plaquettes résiduelles dans le plasma à tester est maintenue à un niveau minimal, surtout si le plasma est congelé et décongelé avant l'analyse. Une façon d'éliminer un maximum de plaquettes est de filtrer le plasma centrifugé (préparé comme pour les autres tests de coagulation) au moyen d'un filtre de 0,22- μ . Alternativement, le plasma peut être centrifugé à deux reprises, comme décrit au chapitre 4. Ceci a pour but de réduire à <10 G/l le nombre de plaquettes dans le plasma à analyser. Puisque la filtration peut avoir un effet sur d'autres tests de coagulation et peut être coûteuse, l'option préférée est de décanter le plasma pauvre en plaquettes de la première centrifugation (minimum de 1700 g pendant un minimum de 10 minutes) dans un autre tube et d'ensuite centrifuger ce plasma une deuxième fois dans les mêmes conditions. Après la deuxième centrifugation, décanter soigneusement le plasma sans perturber la couche inférieure puisque celle-ci contiendra la majorité des rares plaquettes qui n'auront pas été enlevées lors de la première centrifugation. Les plasmas préparés ainsi par double centrifugation ont normalement un nombre de plaquettes résiduelles se situant bien au dessous de $10 \times 10^9/l$ et conviennent à la congélation avant la recherche d'anticoagulant lupique. Ces recommandations s'appliquent tant à la préparation de plasmas de contrôle qu'à celle de plasma à tester.

TESTS DE MÉLANGES

Les détails des tests de mélanges servant à mettre en évidence la présence éventuelle d'un inhibiteur sont présentés au chapitre 14.

TESTS SPÉCIFIQUES POUR LA DÉTECTION D'ACL ET D'AAP

Il existe de plus en plus de tests spécifiques servant à rechercher la présence d'anticoagulants lupiques, dont le temps de venin de la vipère de Russell dilué (DRVVT) et le temps de coagulation au kaolin, nommé aussi test Exner. D'autres tests spécifiques à base de venin de serpent, comme le temps de Textarine ou le temps de venin du Taipan ont été employés, ainsi que le temps de thromboplastine diluée. Les détails relatifs à ces tests sont inclus dans la liste de références ci-dessous.

Même lorsque des tests relativement spécifiques sont utilisés, comme le temps de venin de la vipère de Russell dilué, ou d'autres tests, il est important de confirmer que l'effet de l'inhibiteur est dépendant de la présence de phospholipides au moyen de tests de confirmation.

Une méthode pour le DRVVT est proposée ci-dessous, dont les résultats anormaux sont plus spécifiques de la présence d'anticorps antiphospholipides que ceux obtenus avec le TCA.

Selon la mise à jour des directives de l'ISTH récemment publiée (Pengo et al. 2009), il est recommandé que les deux tests dépendant de phospholipides qui devraient être utilisés sont le DRVVT et le TCA, et qu'en cas de résultat anormal, le test doit être répété en présence de phospholipides en excès. Les directives indiquent que l'utilisation de plaquettes lavées comme source d'excès

de phospholipides peut s'avérer problématique étant donné l'absence de standardisation de leur préparation et de la possibilité de variations d'un lot à l'autre. Nous incluons dans le présent document une méthode pour la préparation de plaquettes lavées pour les centres qui continueront d'utiliser cette approche. Le document de l'ISTH ne recommande pas l'utilisation du temps de coagulation au kaolin, du temps de thromboplastine diluée ou d'un certain nombre de tests à base de venin de serpent moins bien connus.

RÉFÉRENCES

- Brandt JT, Triplett DA, Alung B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Anti-phospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1184–1190.
- Lupus Anticoagulant Working Party. Guidelines on testing for the lupus anticoagulant. *J Clin Pathol* 1991; 44:885–889.
- Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Thromb Haemost* 2009; 7:1737–40.

PRINCIPE

Le venin de la vipère de Russell (RVV) contient un enzyme qui active directement le facteur X, qui active à son tour la prothrombine en présence de phospholipides, d'ions calcium et de facteur V. La dilution du venin et des phospholipides rend le test particulièrement sensible à la présence d'un anticoagulant lupique (lupus anticoagulant, LA). Un temps de venin de vipère Russell dilué (en anglais Diluted Russel Viper Venom Time, DRVVT) prolongé peut donc être dû à la présence d'inhibiteurs anti-phospholipides, mais aussi par une déficience ou une anomalie des facteurs II, V, X ou du fibrinogène. Si le temps de coagulation du DRVVT est supérieur à l'intervalle de référence établi localement, le test est refait en remplaçant les phospholipides par des plaquettes lavées et lysées par congélation-décongélation. Une correction du temps de coagulation par cette substitution indique la présence d'un anticorps antiphospholipides.

RÉACTIFS

- Imidazole (tampon glyoxaline) – 0,05M pH 7,3
 - 3,4 g imidazole
 - 5,85 g chlorure de sodium
 1. Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée.
 2. Ajuster le pH à 7,3 avec de l'HCl 1M.
 3. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Venin de vipère de Russell (Diagnostic Reagents, Chinnor Road, Thame, Royaume-Uni)
 1. Ajouter 2 ml d'eau distillée à 0,2 mg de venin pour obtenir 0,1 mg/ml.
 2. Congeler à -35 °C ou à une température inférieure, en aliquotes de 20 µl.
 3. Pour l'utilisation, décongeler et diluer à approximativement 1 partie pour 500 dans du tampon imidazole (10 µl dans 5 ml) pour obtenir du venin de vipère de Russell dilué (DRVV)
- Phospholipides (PL; Substitut de plaquette Diagen Bell and Alton, Diagnostic Reagents, Chinnor Road, Thame, Royaume-Uni)
Reconstituer avec de l'eau distillée conformément aux directives du fabricant.
- Solution de chlorure de calcium 25mM
- Plaquettes lavées lysées par congélation-décongélation
Des plaquettes humaines normales sont lavées et lysées par congélation-décongélation pour exposer les phospholipides procoagulants. Une méthode

complète est décrite à la fin de ce chapitre (voir « Préparation de plaquettes lavées pour le DRVVT », page 123).

- Plasma normal poolé
Ce plasma doit être préparé soigneusement afin de s'assurer qu'un nombre minimal de plaquettes résiduelles soient présentes, comme décrit dans la préparation de l'échantillon ci-dessus. Il peut être pratique d'utiliser le plasma normal poolé décrit au chapitre 7, pourvu que le plasma poolé soit centrifugé à **deux reprises** avant d'être congelé.

MÉTHODE

- 1 Dans un tube à essai en verre préchauffé à 37 °C, ajouter 0,1 ml de phospholipides et 0,1 ml de plasma normal poolé.
- 2 Chauffer à 37 °C pendant 1 à 2 minutes.
- 3 Ajouter 0,1 ml de RVV dilué (RVV à la température ambiante). Mélanger et laisser incuber pendant exactement 30 secondes à 37 °C.
- 4 Ajouter 0,1 ml de chlorure de calcium 25 mM préchauffé. Mélanger et démarrer le chronomètre.

- 5 Chronométrer la formation du caillot. Effectuer tous les tests en double.

Le plasma normal poolé devrait avoir un temps de coagulation entre 30 et 35 secondes. Si <30 secondes, diluer davantage la solution de RVV en ajoutant plus de tampon imidazole. Si >35 secondes, ajouter plus de la solution stock de RVV. Répéter le test sur du plasma normal poolé jusqu'à l'obtention d'un temps entre 30 et 35 secondes.

- 6 Préparer une dilution de 1/8 de PL dans du NaCl 0.9%; par exemple, en ajoutant 0,1 ml de PL à 0,7 ml de NaCl.

- 7 Répéter les étapes 1 à 5 en remplaçant les PL non dilués par la dilution de PL préparée ci-dessus.

Si le temps de coagulation (précédemment de 30 à 35 secondes) est désormais prolongé à 35 - 40 secondes cela indique que la concentration en PL est suffisamment basse pour rendre le test sensible aux anticorps phospholipides.

Si le temps de coagulation dépasse 40 secondes, répéter les étapes 1 à 5 en utilisant du PL dilué 1/4. Si le temps de coagulation demeure entre 30 et 35 secondes, répéter les étapes 1 à 5 en utilisant du PL dilué 1/16. Si le temps est entre 35 et 40 secondes, passer à l'étape suivante.

- 8 Avec de cette solution de RVV (qui donne un temps de coagulation entre 30 et 35 secondes avec du PL pur et du plasma normal poolé) et la dilution de phospholipide qui donne un temps de coagulation de 35-40 secondes, répéter les étapes 1 à 5, en substituant le plasma normal poolé par le plasma du patient.

- 9 Calculer le rapport des temps de DRVV (DRVVT) : diviser le temps du patient par celui au DRVVT obtenu avec le plasma normal poolé (rapport de DRVVT).
- 10 Les étapes 1 à 5 sont maintenant répétées en utilisant le plasma normal poolé, et le plasma à tester, en substituant les PL par des plaquettes lavées et lysées par congélation-décongélation. Cette procédure est nommée procédure de neutralisation plaquettaire (PNP). A l'étape 2, le mélange est incubé pendant 10 minutes. Le rapport du temps du plasma à tester divisé par le temps du plasma normal poolé est calculé pour la PNP.

INTERPRÉTATION

L'intervalle de référence du rapport de DRVVT doit être établi localement avec du plasma de volontaires sains, comme décrit dans le chapitre 8. L'intervalle de référence (moyenne $\pm$ 2 écarts-types) du rapport de DRVVT avec PL est typiquement 0,90-1,10. Un rapport de DRVVT prolongé indique soit une déficience en facteurs II, V, X ou de fibrinogène, soit la possibilité qu'un anticorps antiphospholipides soit présent.

Un rapport de DRVVT prolongé avec phospholipides, mais qui diminue ou qui se corrige dans le rapport de la PNP suggère la présence d'un anticorps antiphospholipides.

Il faut noter qu'une déficience en facteurs de coagulation mentionnés ci-dessus est associée à des rapports augmentés tant pour le DRVVT avec phospholipides que pour le rapport de la PNP.

La présence d'héparine dans l'échantillon peut mener à des résultats semblables à ceux obtenus en présence d'anticorps antiphospholipides.

CORRECTIONS DU DRVVT DANS LA PNP

Les corrections ou la diminution du rapport de DRVVT prolongé, le ramenant dans l'intervalle de référence, sont une preuve convaincante de la présence d'anticoagulant lupique.

Souvent, le rapport de la PNP n'est pas corrigé ni ramené à l'intérieur de l'intervalle de référence. Le degré de correction nécessaire pour indiquer la présence probable d'un anticoagulant lupique n'est pas connu avec certitude. Une approche est de calculer le pourcentage de correction comme suit :

$$\frac{\text{rapport de DRVVT avec PL} - \text{rapport de la PNP}}{\text{rapport de DRVVT avec PL}} \times 100$$

Un résultat supérieur à l'intervalle de référence qui se corrige de >10 % par la PNP est considéré indicatif de la présence d'un anticoagulant lupique.

38.1 Préparation des plaquettes lavées pour le DRVVT

RÉACTIF

Tampon de Tyrode pH 6,5

- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 0,065 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,415 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 1,0 g NaHCO_3

Dissoudre dans 900 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 6,5. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

MÉTHODE

- 1 Préparer le plasma riche en plaquettes (PRP) à partir de sang frais citraté en le centrifugeant à 170 g (1200 t/m) pendant 10 minutes à la température ambiante.

OU

Utiliser des concentrés de plaquettes utilisés pour le traitement de patients.

- 2 Diluer le PRP 1/2 dans du tampon de Tyrode.
- 3 Placer les plaquettes diluées dans des tubes à centrifuger à fond conique et centrifuger pendant 10 minutes à 850 g à température ambiante.
- 4 Enlever le surnageant en utilisant une pipette Pasteur en plastique et resuspendre le culot de plaquettes dans du tampon de Tyrode (ajouter une quantité de tampon équivalent au volume initial de PRP). Centrifuger à 850 g, comme précédemment. Ce processus est répété deux fois.
- 5 Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans du tampon de Tyrode, en utilisant une quantité de tampon équivalent à 25 % du volume initial de PRP.
- 6 Aliquoter les plaquettes lavées finales en quantités de 1,0 ml dans des tubes en plastique et les congeler-décongeler à deux reprises à -20 °C avant de les utiliser.

Les plaquettes contribuent à l'hémostase principalement de deux manières:

- Elles adhèrent aux microfibrilles subendothéliales et aux fibres de collagène de la paroi des vaisseaux sanguins, après quoi elles changent de forme, présentent une réaction de libération spécifique et s'agrègent ensuite pour former le clou hémostatique primaire.
- Ces événements entraînent, surtout lors de la libération et de l'agrégation, la production d'activités procoagulantes, auxquelles participent principalement les phospholipides de la membrane plaquettaire, de sorte que la coagulation sanguine est initiée aux endroits où l'agrégation des plaquettes a eu lieu.

Des déficiences quantitatives ou qualitatives des plaquettes peuvent résulter en une diathèse hémorragique significative, principalement due à une formation insuffisante du clou hémostatique, mais aussi, dans une moindre mesure, à l'activation suboptimale de la coagulation sanguine.

Une fonction plaquettaire déficiente ou une thrombocytopénie peuvent se manifester sur le plan clinique par une variété de symptômes qui suggèrent fortement une insuffisance de l'hémostase primaire (p. ex. ecchymoses, épistaxis, hémorragie gastro-intestinale ou ménorragie). Les déficiences plaquettaires entraînent habituellement des diathèses hémorragiques plutôt légères. Ces patients peuvent présenter des saignements excessifs uniquement à la suite d'une chirurgie ou d'une extraction dentaire.

Les déficiences plaquettaires comprennent la maladie du pool vide, la maladie de Glanzmann et le syndrome de Jean Bernard-Soulier.

Lors de l'investigation de patients avec suspicion de diathèse hémorragique, il est important de colliger leurs antécédents cliniques détaillés. L'examen d'un frottis sanguin, la numération du nombre plaquettaire et la détermination du temps de saignement (décrit au chapitre 11) sont des tests initiaux importants. Si les résultats de ces tests se situent dans l'intervalle de référence, la cause du saignement investiguée n'est probablement pas due à une déficience plaquettaire importante sur le plan clinique.

L'historique médicamenteux est important. Un certain nombre de médicaments peuvent influencer les résultats des tests de la fonction plaquettaire, dont le temps de saignement. Par exemple, l'effet produit par l'ingestion récente d'aspirine peut perdurer jusqu'à 10 jours.

Pour une liste des médicaments pouvant interférer avec la fonction plaquettaire, voir les directives de la *British Society for Haematology* sur les tests de la fonction plaquettaire, dont la référence est fournie ci-dessous.

La méthode de la rétraction du caillot, décrite ci-dessous, est un autre test simple qui peut indiquer la présence éventuelle d'une anomalie.

39.1 Rétraction du caillot

La rétraction du caillot dans le sang total coagulé peut fournir un indice sur le nombre de plaquettes et sur la fonction plaquettaire. Lorsque le caillot se rétracte, du sérum est expulsé et le degré de rétraction du caillot peut être mesuré.

MÉTHODE

- 1 Prélever 1 ml de sang dans un tube à essai en verre (75 mm × 10 mm) et le mettre à 37 °C.
- 2 Examiner le tube visuellement jusqu'à ce qu'un caillot solide soit présent. Laisser reposer pendant une heure encore à 37 °C.
- 3 Mesurer la distance entre la base du tube jusqu'au ménisque. Enlever soigneusement le caillot au moyen d'un bâtonnet mince en bois (p. ex. un cure-dents), en laissant s'écouler dans le tube le sérum présent dans le caillot.
- 4 Mesurer la distance entre la base du tube jusqu'au ménisque du sérum.
- 5 Diviser la hauteur du ménisque du sérum par la hauteur totale initiale et multiplier par 100 pour obtenir un pourcentage.

INTERPRÉTATION

Normalement, plus de 40 % du sérum est retrouvé. Une diminution de l'extrusion du sérum est observée dans certaines déficiences plaquettaires, notamment dans la maladie de Glanzmann.

NOTES

- Les tubes et le cure-dents en bois doivent être propres afin d'éviter que le caillot ne se colle au tube.
- Le caillot doit être enlevé doucement et soigneusement pour éviter de le presser et d'augmenter ainsi la libération de sérum.

RÉFÉRENCES

Chanarin I (ed.). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.

Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1322-1330.

39.2 Mesure de l'agrégation plaquettaire

PRINCIPE

La densité optique du plasma riche en plaquettes diminue au fur et à mesure que les plaquettes forment des agrégats. L'amplitude et, dans une certaine mesure la vitesse de cette diminution, dépendent principalement de la réactivité des plaquettes, pour autant que les autres variables (p. ex. nombre de plaquettes, vitesse de l'agitation du mélange et la température) soient contrôlées.

Les changements de densité optique sont enregistrés, dans la mesure où la densité optique du plasma riche en plaquettes reflète le degré d'agrégation plaquettaire provoquée par l'un de multiples agonistes.

La densité optique est mesurée en continu au moyen d'un agrégomètre connecté à un enregistreur graphique afin que les résultats puissent être exprimés sous forme de tracé.

Un certain nombre d'études portant sur les pratiques actuelles dans différents centres (Jennings et al. 2008, Cattaneo et al. 2009) ainsi que des directives (Bolton-Maggs et al. 2006) ont été publiées.

PRÉCAUTIONS À PRENDRE AVANT D'INVESTIGUER L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE

Sauf lors de l'investigation spécifique de leur effet sur l'agrégation plaquettaire, les médicaments qui contiennent de l'aspirine ne doivent pas être ingérés dans les 10 jours avant la réalisation des tests, puisque l'aspirine interfère avec la réaction de libération des granules plaquettaires.

Il faut également éviter d'ingérer d'autres médicaments connus pour influencer la fonction plaquettaire pendant un laps de temps au moins équivalente au temps nécessaire à leur élimination de la circulation. Ceux-ci comprennent certains antihistaminiques, antibiotiques et antidépresseurs. Il faut vérifier les médicaments prescrits avant d'effectuer tout test de la fonction plaquettaire.

Comme les chylomicrons peuvent interférer avec la mesure de l'agrégation plaquettaire, il faut éviter de faire les tests après un repas riche en graisses.

De nombreux autres éléments « normaux » de l'alimentation, dont l'alcool, les oignons, l'ail, les piments et le gingembre peuvent aussi inhiber l'agrégation plaquettaire. Il faut tenir compte de ceci lors de l'évaluation des résultats.

PRÉPARATION DU PLASMA RICHE EN PLAQUETTES ET PAUVRE EN PLAQUETTES

Du sang veineux est prélevé avec un minimum d'occlusion veineuse dans 1/10 de volume de citrate trisodique (0,109 M) dans un tube en polypropylène ou en verre siliconé. Environ 20 ml de sang est nécessaire pour effectuer une étude complète de l'agrégation.

Comme la réfrigération active les plaquettes le sang doit être manipulé à 20 °C-25 °C. Le plasma riche en plaquettes (PRP) est préparé par centrifugation à 200 g pendant 10 à 15 minutes.

Le PRP est soigneusement décanté, en évitant toute contamination par des globules rouges ou la couche leucocytaire (l'agrégation sera réduite en présence de l'un ou l'autre), dans un tube en polypropylène et maintenu à 20 °C-25 ° jusqu'au moment du test. Une température précise de conservation n'est pas critique mais elle peut faire varier les résultats, par conséquent tous les échantillons de PRP devraient être mis à la même température.

Le sang restant est centrifugé à 2000 g pendant 20 minutes et le plasma pauvre en plaquettes (PPP) est décanté et conservé à 4 °C.

Une numération plaquettaire est effectuée sur le PRP : le nombre de plaquettes a un effet sur la réponse d'agrégation obtenue, mais ces effets sont minimes dans l'intervalle dans lequel la plupart des numérations de PRP se situent (soit 200-600 G/l). En effet, des recherches démontrent que la dilution de PRP dans du PPP provenant du même patient peut inhiber les réponses obtenues, probablement parce que le PPP peut contenir des substances libérées par les plaquettes en raison du trauma additionnel causé par la centrifugation à une vitesse plus élevée (Cattaneo et al. 2007, Linnemann et al. 2008). Pour ces raisons, le PRP dont la numération plaquettaire se situe dans l'intervalle mentionné ci-dessus ne devrait normalement pas être ajusté.

Les numérations excessivement élevées dans le PRP ($>1000 \times 10^9/l$) peuvent entraîner un changement de la réponse d'agrégation. Il peut alors être préférable d'ajuster le nombre de plaquettes à un niveau plus convenable. Ceci peut se faire en diluant le PRP dans le PPP du patient. De même, un nombre de plaquettes bas ($<200 \times 10^9/l$) peut entraîner une diminution de l'agrégation. Les méthodes visant à concentrer les plaquettes provoquent pratiquement toujours un changement sur le plan fonctionnel et sont déconseillées. Toutefois, un PRP de contrôle dilué (dans du PPP) pour obtenir un nombre de plaquettes similaire peut être testé à titre de comparaison.

L'agrégation plaquettaire dépend du pH. Le PRP doit donc être maintenu entre 7,7 et 8,0. Le contrôle du pH peut être obtenu en conservant le PRP dans des tubes bien remplis et bouchés ainsi qu'en réalisant les tests dans les deux heures qui suivent le prélèvement du sang.

INDUCTEURS D'AGRÉGATION

Les réactifs tels que l'ADP et le collagène se lient à des récepteurs spécifiques de la membrane plaquettaire, ce qui active la plaquette et déclenche une série de réactions. Ceci entraîne une modification de la forme de la plaquette, sa contraction, sa mobilisation et la libération de composants granulaires et, finalement, l'agrégation plaquettaire.

Plusieurs voies, différentes mais interconnectées, d'activation des plaquettes sont présentes qui vont dépendre du type et de la concentration de l'agoniste utilisé, qui entraînent l'agrégation plaquettaire. Dans la cuvette où la réaction a lieu, le passage d'une suspension uniforme de plaquettes à des agrégats provoque une diminution de l'absorbance et une augmentation de la lumière transmise à travers la suspension de plaquettes. Ceci est détecté par un agrégomètre connecté à un enregistreur.

Les cinq agents agrégeants énumérés ci-dessous devraient suffire pour permettre de déterminer les différents désordres de la fonction plaquettaire.

Adénosine-5-diphosphate (ADP)

Une solution stock de sel disodique 1 mM est préparée avec une solution tampon saline d'Owren (TSO) et conservée en petits aliquotes à -40 °C. Celle-ci est stable pendant au moins trois mois. Une fois décongelée, la solution doit être utilisée dans les trois heures ou jetée.

Avant utilisation, d'autres dilutions sont préparées dans du TSO. Le type de réponse à l'ADP dépend de sa concentration finale.

- A 2 µmol/l, les vagues primaire et secondaire, clairement séparées, peuvent être observées : la première vague représente l'effet direct provoqué par l'agoniste et la deuxième vague est due à la libération d'ADP endogène et à la génération de thromboxane A₂ (TXA₂), qui agrègent les plaquettes.
- A moins de 2 µmol/l, peu de sujets normaux présentent une deuxième vague et la vague primaire se défait généralement au fur et à mesure que l'ADP subit une dégradation enzymatique.
- A plus de 3 µmol/l, la vague primaire est habituellement si intense que la distinction entre celle-ci et la vague secondaire n'est plus observable.

L'ADP provoque un changement de forme des plaquettes, qui passent de discoïdes à sphérique avec des protubérances pointues. Ce changement initial induit une légère augmentation de la densité optique de la suspension de plaquettes, qui est uniquement visible que si la première vague est diminuée.

Adrénaline (epinephrine)

Une solution stock de bitartrate 1 mM/l est préparée dans du TSO. Elle doit être conservée et utilisée dans les mêmes conditions que l'ADP. En ce qui concerne l'adrénaline, les concentrations utilisées et le type de réponse ressemblent à celles de l'ADP. Cependant, la première vague ne se défait pas même en l'absence de la deuxième vague et l'intensité de la première vague n'est jamais assez forte pour masquer la vague.

Collagène

Une suspension très stable de fibrilles de collagène de tendon équin (1 mg/ml), vendue par Hormon-Chemie, Munich, Allemagne, est largement utilisée. Un certain nombre d'autres réactifs conviennent également. Elle est conservée à 4 °C et doit être bien mélangée avant d'être diluée dans la solution tampon qui l'accompagne dans l'emballage. Elle doit être utilisée à une concentration finale de 0,5-2,0 µg/ml dans le PRP; les suspensions diluées sont stables pendant une semaine à 4 °C.

Il n'y a pas de première vague avec le collagène. La réponse est habituellement définie par le délai entre l'adjonction de l'agoniste et le début de l'agrégation (temps de latence) et par l'intensité de celle-ci. Une légère augmentation de la densité optique causée par le changement de forme précède l'agrégation.

Du collagène provenant de plusieurs différentes sources est utilisé. Le type de collagène et l'espèce à partir de laquelle la préparation est préparée (p. ex., équin ou bovin) peuvent avoir une influence importante sur les résultats obtenus. En

effet, une gamme de concentrations variant par un facteur > 100 est nécessaire selon l'origine du matériel. Il est donc important de choisir une source appropriée et d'établir un intervalle de référence local pour ce réactif et qui doit être réévalué s'il y a changement de réactif. Voir Jennings et al. (2008) pour une revue de la littérature.

Ristocétine

A une concentration finale de ristocétine de 1 mg/ml dans le PRP, la première et la deuxième vague peuvent généralement être observées mais une concentration supérieure l'effet est si intense que les deux vagues convergent.

La première vague est une mesure de la quantité de facteur de von Willebrand présent dans le plasma, tandis que la seconde vague est due à la libération de substances endogènes.

Acide arachidonique

L'arachidonate de sodium (99 % pur) est dissout dans le TSO à une concentration de 10 mM/l. De petits aliquotes sont placés dans des flacons en verre foncés qui sont remplis d'azote afin d'empêcher l'oxydation, qui sont ensuite bien bouchés et conservés à une température inférieure à -20°C .

L'agrégation est généralement monophasique et précédée par une courte phase de latence.

RÉACTIFS

Note : Ces concentrations sont valables si une partie de réactif est ajoutée à neuf parties de PRP.

- ADP
Préparer une dilution de $1/10 = 100\text{ }\mu\text{M}$ (soit 0,1 ml solution $1000\text{ }\mu\text{M}$ + 0,9 ml TSO)

Préparer à partir de celle-ci deux solutions de travail de concentrations différentes :
 - $20\text{ }\mu\text{M}$ (soit 0,2 ml $100\text{ }\mu\text{M}$ + 0,8 ml TSO)
 - $30\text{ }\mu\text{M}$ (soit 0,3 ml $100\text{ }\mu\text{M}$ + 0,7 ml TSO)
Dans les cas où l'hyperagrégabilité est à tester, des concentrations plus faibles peuvent être nécessaires (p. ex. $10\text{ }\mu\text{M}$, $5\text{ }\mu\text{M}$).
- Adrénaline (epinephrine)
Diluer comme l'ADP
- Collagène
Bien mélanger et diluer dans du TSO :
 - $1/500$ (soit 0,1 ml solution de réserve + 4,9 ml TSO) = $20\text{ }\mu\text{g/ml}$
 - $1/100$ (soit 0,5 ml dilution $1,50$ + 0,5 ml TSO) = $10\text{ }\mu\text{g/ml}$
- Ristocétine
Celle-ci peut être utilisée avec quatre concentrations différentes, selon les résultats obtenus : 15 mg/ml , $12,5\text{ mg/ml}$, $7,5\text{ mg/ml}$, and 5 mg/ml
- Acide arachidonique
 10 mM/l

MÉTHODE

En raison de l'hyporéactivité des plaquettes à l'agrégation causée par la centrifugation, les tests d'agrégation ne doivent pas être commencés dans les 30 minutes qui suivent la préparation du PRP. En particulier, la réponse à l'ADP est réduite pendant les 20 à 30 minutes qui suivent la préparation du PRP. Toutefois, les tests doivent être terminés dans un délai de deux heures.

- 1 Mettre l'agrégomètre en marche pour le thermostatiser à 37 °C et programmer la vitesse d'agitation à 900 t/m.
Certains agrégomètres ont deux canaux, donc il est pratique d'utiliser une moitié de la largeur du papier graphique par canal.
Avec une déflexion de 10 mV, les réglages utilisés pour le PRP sont de 0,5 et de 5,5 mV pour les canaux 1 et 2 respectivement (correspondant à 0 % d'agrégation) et les valeurs du blanc correspondantes (qui sont établies par le PPP) seraient de 4,5 et de 9,5 mV (correspondant à 100 % d'agrégation).
- 2 Mettre 0,45 ml de PRP dans une cuvette en verre (jeter après usage) qui contient un barreau magnétique siliconé pour agiter le mélange).
- 3 Placer la cuvette de PRP dans le support du canal 1 et régler la transmission à 0 % (0,5 mV). Substituer par une cuvette contenant 0,5 ml PPP et régler la transmission à 100 % (4,5 mV). Répéter cette procédure jusqu'à ce qu'il n'y ait plus besoin d'ajuster ces réglages.
- 4 Répéter la procédure pour le canal 2 en utilisant les réglages 5,5 et 9,5 mV.
- 5 Laisser le PRP se thermostatiser à 37 °C pendant deux minutes. Ajouter 0,05 ml d'agoniste au fond de la cuvette et observer les modifications de densité optique pendant trois minutes.

Répéter cette procédure pour chaque agoniste.

NOTES

- Pour l'ADP et l'adrénaline, commencer avec une concentration de 20 µM. La concentration finale dans le PRP sera de 2 µM.
- Pour le collagène, utiliser une concentration de 10 g/ml. La concentration finale sera de 1 µg/ml.
- Pour la ristocétine, utiliser une concentration de 12,5 mg/ml. Pour le dépistage de la maladie de von Willebrand de type 2B, tester aussi les concentrations de 7,5 mg/ml et de 5 mg/ml. Celles-ci auront respectivement des concentrations finales dans le PRP de 1,25 mg/ml, 0,75 mg/ml et de 0,5 mg/ml. Utiliser une solution de 15 mg/ml si aucune réponse n'est obtenue avec 12,5 mg/ml.

S'il y a hyperagrégation des plaquettes avec 0,5 mg/ml de ristocétine (ce qui indique la présence possible d'une maladie de von Willebrand de type 2B ou de type plaquettaire) :

- Vérifier s'il y a agrégation spontanée en testant le PRP dans les mêmes conditions d'agitation dans l'agrégomètre, mais sans ajouter d'agoniste pour stimuler l'agrégation.
- Procéder à un lavage des plaquettes par centrifugation. Pour ce faire, prélever 1 ml de PRP du patient et 1 ml de PRP du contrôle dans deux tubes. Centrifuger les PRP et resuspendre les plaquettes dans une solution d'EDTA-NaCl. Répéter la centrifugation/resuspension 2 fois. Après la dernière centrifugation, resuspendre soigneusement les plaquettes du patient dans du plasma normal et les plaquettes du contrôle dans le plasma du patient. Tester à nouveau 0,5 mg/ml de ristocétine.

Les agrégations devraient correspondre à l'un des types indiqués ci-dessous.

Figure 39.1. Types de réaction

PRP du patient PPP du patient	Plaquettes du patient PPP normal	Plaquettes normales PPP du patient
Agrégation	Aucune réponse	Agrégation = maladie de von Willebrand de type 2B
Agrégation	Agrégation spontanée	Aucune réponse = maladie de von Willebrand de type plaquettaire*

*Pour une revue de la maladie de von Willebrand de type plaquettaire, voir Franchini et al. (2008).

INTERPRÉTATION DES TRACÉS D'AGRÉGATION

- Si les plaquettes à tester ne donnent pas une réponse normale – à savoir deux phases d'agrégation couvrant plus de 50 % de l'échelle, avec les concentrations indiquées ci-dessus couvrant plus de 50 % de l'échelle avec les concentrations des réactifs indiquées ci-dessus – alors il faut augmenter la concentration de l'agoniste (dans les limites du raisonnable) jusqu'à l'obtention d'une réponse satisfaisante.
- Dans les cas où il existe une déficience évidente au niveau de la réaction de sécrétion, observer attentivement la réponse à l'acide arachidonique.
- Si aucune réponse n'est obtenue avec l'acide arachidonique, tester avec du thromboxane A2 et/ou de l'ionophore du calcium.
- Lors de l'étude de l'agrégation plaquettaire dans le cadre d'une évaluation d'hyperagrégabilité, l'ADP et l'adrénaline sont utilisées à des concentrations plus faibles pour obtenir une courbe dose-réponse. Les concentrations utilisées sont : 2 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,1 μ M (concentrations finales dans le PRP). Une agrégation spontanée est aussi effectuée avant de tester les agonistes restants :
 1. Mettre 0,5 ml de PRP dans la cuvette et placer celle-ci dans l'agrégomètre.
 2. Observer les changements de la densité optique pendant 15 minutes.

Si le volume de PRP est insuffisant, le volume minimum qui peut être utilisé dans les cuvettes standard est 0,36 ml de PRP + 40 µl d'agoniste.

- Le PRP d'un donneur normal en bonne santé, préparé de la même façon, doit être traité en parallèle afin contrôler les réactifs. Ceci est particulièrement important si le patient a des résultats anormaux, puisque certains agonistes sont labiles, et particulièrement une fois dilués aux concentrations de travail. Les résultats de sujets normaux testés de cette manière peuvent être utilisés afin d'établir des intervalles de référence afin de faciliter l'interprétation des résultats des patients.

CALCUL DES RÉSULTATS

Les résultats sont habituellement exprimés de trois façons :

1. Pourcentage de la diminution de la densité optique, mesuré trois minutes après l'ajout de l'agoniste. Il s'agit de la façon la plus pratique, quoiqu'elle ne fournisse aucune information sur la forme des courbes d'agrégation.
2. Le traçage de la pente initiale de l'agrégation. Ceci indique le taux d'agrégation, mais n'indique pas si la deuxième vague a eu lieu.
3. La détermination d'une concentration seuil d'agoniste, à savoir la quantité de réactifs d'agrégation juste nécessaire pour provoquer une réponse de la deuxième vague (ceci tend à gaspiller le PRP).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La plus grande prudence est de mise lors de l'interprétation des tracés d'agrégation plaquettaire. Un certain nombre de facteurs techniques peuvent influencer les résultats. Garder à l'esprit qu'il existe un nombre important de différences entre l'agrégation analysée par néphélométrie et celle qui se produit dans le corps.

Néanmoins, des renseignements diagnostiques utiles peuvent être obtenus et certains exemples de types d'agrégation sont illustrés à la Figure 39.2.

Figure 39.2. Résultats de l'agrégation plaquettaire dans une gamme de troubles

Trouble	ADP	Collagène	Ristocétine 1,25 mg/ ml	Ristocétine 0.5 mg/ ml	Acide arachidonique	Adrénaline
Maladie de von Willebrand de types 1 et 2A	N	N	A/R**	A	N	N
Maladie de von Willebrand de type 2B	N	N	N	Ra	N	N
Syndrome de Bernard-Soulier	N	N	A	A	N	N
Maladie de Glanzmann	A	A	N	A	A	A
Maladie du pool vide	P/N	R/N	P/N	A	R/N	P/N
Déficiência en cyclo-oxygénase*	R/N	R	N	A	R	R/N

N = Normal; A = Absent; R = Réduit; Ra = Réponse accrue; P = Première vague uniquement

*Ou effet aspirine; **Peut être normal dans des cas légers de la maladie de von Willebrand de type 1

INVESTIGATION PLUS APPROFONDIE DE LA FONCTION PLAQUETTAIRE

Si un tracé d'agrégation plaquettaire anormal est observé chez un individu, il est conseillé de répéter l'agrégation au moins une fois ultérieurement afin de vérifier la persistance de l'anormalité.

En présence d'agrégation anormale, il peut être utile de mener une investigation plus approfondie. Celle-ci comprend la mesure du contenu en nucléotides des plaquettes et leur libération lors de l'agrégation plaquettaire.

L'analyse quantitative des glycoprotéines de la membrane peut être effectuée pour le diagnostic sans équivoque du syndrome de Bernard-Soulier et de la maladie de Glanzmann.

Le mécanisme de sécrétion des plaquettes peut être évalué en mesurant le contenu total de l'ADP et de l'adénosine triphosphate (ATP) de la plaquette et la sécrétion de l'ATP ou de la 5-hydroxytryptamine (ou les deux) des granules denses.

Figure 39.3. Facteurs techniques qui influencent la fonction plaquettaire

Anticoagulant	Un dixième du volume de citrate trisodique.
Temps	Commencer les tests 30 minutes après la préparation du PRP. Terminer tests dans les deux heures qui suivent le prélèvement sanguin.
Centrifugation	Doit suffire à enlever les globules rouges et blancs, mais non les grandes plaquettes. Doit être effectuée à la température ambiante, et non à 4 °C.
Numération plaquettaire	Numération basse $< 100 \times 10^9/l$ entraîne réponses lentes et faibles. Numération élevée $> 1000 \times 10^9/l$ peut entraîner une réponse réduite.
pH	$< \text{pH } 7,7$ inhibe l'agrégation. $> \text{pH } 8,0$ améliore l'agrégation.
Vitesse de mélange	$< 800 \text{ t/m}$ entraîne une diminution de l'agrégation $> 1200 \text{ t/m}$ disperse les amas de plaquettes.
Hématocrite	$> 55 \%$ entraîne moins d'agrégation, surtout d'inhibition de deuxième vague en raison de la concentration accrue en citrate.
Température	$< 35 \text{ °C}$ entraîne une diminution de l'agrégation avec des doses ordinaires de tous les agonistes, mais une réponse augmentée aux doses faibles d'ADP.
Lipémie	La présence de chylomicrons provoque une réduction de l'agrégation.
Cuvette sale	Peut provoquer une agrégation spontanée apparente.
Pas barreau magnétique	Aucune réponse à l'ajout d'agent agrégeant.
Bulles d'air	Large oscillations rapides du stylo avant l'agrégation. Provoquées aussi par un nombre plaquettaire bas.

DIFFÉRENCES ENTRE LES CONDITIONS *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE

Pour l'analyse sanguine *in vitro* :

- Le sang est traité à l'anticoagulant.
- Les globules blancs et rouges sont enlevés.
- Les composantes vasculaires sont exclues.
- La coagulation est exclue.
- La population de plaquettes est sélectionnée.
- Les produits d'activation et de la sécrétion des plaquettes sont présents.
- Les réactifs employés ne sont pas physiologiques ni dans leur composition et ni dans leur dose.
- Les plaquettes deviennent instables quand sorties de la circulation corporelle.
- Les médicaments peuvent présenter des effets plus ou moins marqués qu'*in vivo*.

RÉFÉRENCES

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, Minford A, Mumford AD, Parapia LA, Perry DJ, Watson SP, Wilde JT, Williams MD; UKHCDO. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UK HCDO. *Br J Haematol* 2006; 135:603–33.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 2009; 7:1029.
- 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* 2007; 92:694–7.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30:91–4.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61:950–4.
- 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. *Thromb Haemost* 2008; 6:677–83.

INTRODUCTION

La lyophilisation, ou cryodessiccation, peut servir à préparer du plasma qui restera stable pendant des périodes de temps prolongées. Ceci est utile, par exemple, pour la préparation de plasma déficient en facteur VIII lyophilisé, qui est habituellement stable pendant au moins deux à cinq ans lorsqu'il est conservé à -20 °C ou à une température inférieure et qui est suffisamment stable pour résister pendant de courtes périodes (jusqu'à sept jours) à des températures de 20 à 25 °C.

PLASMA APPROPRIÉ

Le sang veineux est mélangé à du citrate de sodium 0,105-0,109 M dans une proportion de 9 parts de sang pour 1 part d'anticoagulant. Centrifuger à 1700 g pendant 10 minutes, pooler au besoin, et conserver à -55 °C en attendant les résultats des tests virologiques. Confirmer les résultats négatifs pour l'anti-VIH 1 et 2, l'anti-VHC et l'antigène de surface de l'hépatite B.

ÉQUIPEMENT

- Flacons 2 ml en verre neutre transparent avec col de 13 mm dont la paroi interne est siliconée
- Bouchon à lyophilisation de 13 mm gris
- Obturateurs entièrement détachables de 13 mm

(Tous ces objets sont vendus par Diagnostic Reagents, Thame, Oxfordshire, Royaume-Uni)

- Appareil de lyophilisation (Supermodulyo et appareil à plateaux, système de bouchage proposé par Life Sciences International, Unit 5, Ringway Centre, Edison Road, Basingstoke, Hampshire, RG21 6YH, Royaume-Uni)
- N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-acide éthanesulfonique (HEPES; BDH Laboratory Suppliers, Poole, BD15 1TD, Royaume-Uni)

MÉTHODE

- 1 Décongeler le plasma rapidement à 37 °C.
- 2 Bien mélanger.
- 3 Ajouter 0,8 g de HEPES pour 100 ml de plasma.

- 4 Mélanger et laisser le HEPES se dissoudre (environ 15 à 20 minutes).
- 5 Remplir les plateaux de lyophilisation en acier inoxydable de flacons vides.
- 6 Distribuer des aliquotes d'exactly 0,5 ml dans chaque flacon.
- 7 Mettre un bouchon en caoutchouc dans chaque flacon jusqu'au seuil de la partie étroite du bouchon. S'assurer que l'air puisse sortir du flacon.
- 8 Congeler à -70 °C trois heures au minimum.
- 9 Mettre l'appareil de lyophilisation en marche. Activer le dispositif de réfrigération.
- 10 Mettre les plateaux (jusqu'à huit plateaux) sur l'appareil à plateaux.
- 11 Mettre l'appareil à plateaux dans la chambre en plastique transparent au-dessus du robinet de sortie d'air sur le lyophilisateur.
- 12 Activer la pompe. S'assurer que les deux étapes précédentes et celle-ci soient terminées dans un laps de temps de trois à quatre minutes afin d'empêcher le plasma de commencer à décongeler. S'il y a décongélation partielle, les produits mousseront, se lyophiliseront mal et devront être jetés.
- 13 S'assurer que le vide se développe en surveillant le manomètre (mouvement visible en l'espace de quelques minutes) et par l'immobilité de la chambre à plasma lorsque vous exercez une légère pression manuelle latérale.
- 14 Laisser sous vide pendant cinq jours.
- 15 Sceller les flacons sous vide en vissant les poignées sur l'appareil à plateaux.
- 16 Permettre à l'air de passer par le robinet d'entrée.
- 17 Décongeler et sécher le lyophilisateur.
- 18 Conserver le plasma lyophilisé à -20 °C, et mettre un bouchon aussitôt que possible.
- 19 Afin de confirmer que la lyophilisation du plasma soit uniforme, tester de quatre à six flacons choisis à des endroits différents des plateaux en acier. Déterminer le TP et le TCA, qui ne devraient pas varier de plus de 6 % à 8 %.

INTRODUCTION

L'automatisation dans les laboratoires d'analyse de la coagulation est désormais répandue dans la plupart des régions du monde. Elle a contribué à l'amélioration de la standardisation et à faciliter les tests qui exigent une formation et des conditions de travail spécifiques, de sorte que les laboratoires peuvent améliorer leur efficacité et profiter d'un meilleur catalogue de prestations.

L'automatisation dans le domaine de l'hémostase est relativement récente. Les méthodes manuelles basées sur la détection visuelle du caillot de fibrine et au moyen de bains-marie à 37 °C étaient autrefois les seules techniques d'étude de la coagulation. Ensuite, dans les années 1970, de nouveaux appareils semi-automatiques sont arrivés qui utilisaient des principes photométriques ou mécaniques pour détecter la fibrine. Plus récemment, des instruments entièrement automatisés sont couramment utilisés dans les laboratoires modernes. Aujourd'hui, de nouveaux appareils connectés à des systèmes de traitements de données spécifiques peuvent effectuer des tests de coagulation, chromogènes et immunologiques.

Deux méthodologies sont actuellement disponibles :

1. Mécanique
2. Optique
 - 2.1 Photooptique
 - 2.2 Néphélométrie
 - 2.3 Chromogène
 - 2.4 Immunologique

PRINCIPE MÉCANIQUE

Les méthodes électromagnétiques sont fondées sur la détection d'une augmentation de la viscosité du plasma lors de la formation de fibrine. Deux variantes de ce principe d'appliquent à l'équipement du laboratoire aujourd'hui.

La première utilise un champ électromagnétique appliqué aux cuvettes de test qui détecte le mouvement d'une sphère en acier inoxydable placée dans l'échantillon plasmatique. La sphère d'acier suit un mouvement de pendule, se balançant d'un côté à l'autre d'un mouvement continu dans un mélange de réactif et de plasma. Au fur et à mesure que la fibrine se forme, la viscosité augmente et le mouvement de la sphère est ralenti. Lorsque l'oscillation de la sphère atteint un niveau prédéterminé, le chronomètre s'arrête et indique le temps de coagulation du plasma.

Une deuxième méthode de détection mécanique utilise également une sphère en acier inoxydable, placée cette fois dans un endroit précis. Un capteur magnétique détecte la position de la sphère et, alors que la cuvette tourne, la sphère maintient son inclinaison tant que l'échantillon liquide demeure fluide. Lorsque la fibrine est formée, le caillot s'empare de la sphère et la déplace de son emplacement initial. Lorsqu'elle sort de la portée du capteur, le circuit est interrompu et le chronomètre s'arrête (Thomas et al. 1999).

PRINCIPES OPTIQUE OU SPECTROPHOTOMÉTRIQUE

Principe photooptique

Les systèmes optiques sont basés sur le fait que la formation de caillot provoque un changement dans la densité optique du plasma. Lors de la formation du caillot, les caractéristiques optiques du plasma/des réactifs mesurées initialement se modifient. Ces modifications sont monitorées et utilisées pour déterminer le temps nécessaire pour qu'un certain degré de changement se produise.

Principe néphélométrique

Le principe néphélométrique est utilisé par certains systèmes. Dans des tests de coagulation, une source de lumière laser monochromatique est transmise, par exemple, au moyen de fibres optiques. La lecture de la dispersion de la lumière est rendue possible par un capteur qui peut être installé à 90 ou à 180 degrés du trajet de la lumière, selon le système employé, qui mesure par la suite la lumière diffusée à un certain angle ou qui enregistre les changements de la transmission de la lumière. Lorsque la lumière atteint des complexes insolubles comme les fibres de fibrine, elle se disperse vers l'avant à des angles diffus (180 degrés) et à des angles diffus latéraux (90 degrés). Le chronomètre s'arrête lorsque la quantité de lumière diffuse ou de lumière transmise atteint un certain niveau prédéterminé. La différence entre la lumière diffuse ou transmise avant et après la formation du caillot est habituellement proportionnelle à la quantité de fibrine formée.

Principe chromogène

Ce principe se fonde sur l'usage d'une substance générant une couleur spécifique, appelée chromophore, dont la para-nitroaniline (pNA) est la plus courante. Elle a une absorbance maximale à 405 nm. Le principe du test chromogène est fondé sur la liaison de la pNA aux substrats synthétiques (Rodak, 1995). La pNA est fixée à une suite d'acides aminés qui imitent la séquence cible du facteur de coagulation activé que nous voulons déterminer. Le facteur de la coagulation coupe le substrat chromogène à un endroit précis dans une séquence définie d'acides aminés et libère la pNA.

L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la quantité de pNA libérée. Celle-ci est mesurée par photodétection à une longueur d'onde de 405 nm. Plus la pNA est coupée et libérée plus la capacité d'absorbance de l'échantillon augmente, ce qui entraîne des changements plus importants dans la densité optique de la solution (Rodak, 1995).

Figure 41.1. Avantages et inconvénients des méthodes de détection dans la définition de paramètres

Méthode	Avantages	Inconvénients
Mécanique	• Aucune interférence de caractéristiques physiques comme la lipémie ou de l'hémolyse • Peut utiliser de petits volumes d'échantillon • Peut parfois analyser du sang total dans certains tests, ce qui élimine le besoin de centrifuger	• Impossible d'observer un graphique de la formation de caillot • Peut poser des problèmes sur le plan de la détection du résultat final dans certains échantillons contenant un taux de fibrinogène bas
Photooptique	• Possibilité de voir graphiquement la formation de caillots • Vérifications optiques pour hémolyse/lipémie/ictère dans certains systèmes optiques	• Interférences due à la lipémie, à l'hémolyse, à l'hyperbilirubinémie ou à l'augmentation de protéines dans certains systèmes • Certains systèmes peuvent éprouver de la difficulté à détecter les caillots lors de l'emploi de réactifs complètement transparents • Des temps de coagulation très courts peuvent ne pas être détectés en raison du temps de latence précédant le début du monitoring
Néphélométrique	• Peut mesurer les réactions antigène-anticorps de protéines présentes en très petites quantités	• Limite le nombre de tests disponibles • Coût des réactifs
Chromogénique	• Possibilité que les tests totalement spécifiques soient plus faciles • Possibilité de paramètres additionnels qui ne peuvent pas être mesurés par la détection d'un caillot • Augmente le répertoire de tests possibles • Améliorations possibles de la précision comparativement aux analyses à base de formation du caillot	• Limité par la longueur d'onde de l'instrument • Nécessite de grands volumes à tester pour obtenir un ratio coûts-bénéfice positif • Coût de l'instrument et des réactifs
Immunologique	• Permet l'automatisation de méthodes manuelles chronophages • Augmente le nombre de tests possibles	• Nombre limité de tests disponibles • Coût des instruments • Coût des réactifs

Les premiers appareils de coagulation ne pouvaient fournir qu'un seul paramètre de définition, tel un paramètre mécanique ou photooptique. Les outils photooptiques étaient à l'origine conçus pour faire la lecture d'une seule longueur d'onde (par ex, 500 nm ou 600 nm), qui pouvait servir uniquement à la détection de la formation du caillot.

Plus récemment, certains coagulomètres peuvent faire la lecture à deux ou plusieurs longueurs d'onde, incluant souvent 405 nm, ce qui augmente la possibilité d'effectuer de réactions plus modernes (méthodes utilisant des substrats chromogènes). Dans les années 1990, un certain nombre de fabricants ont intégré avec succès les méthodes de détection multiples, qui rendent désormais possible pour un seul laboratoire d'appliquer de méthodologies multiples avec le même équipement.

Principe immunologique

Des microparticules de latex enrobées d'un anticorps spécifique contre l'analyte (l'antigène) à mesurer sont habituellement utilisées. Un faisceau de lumière monochromatique traverse une suspension de microparticules de latex. Lorsque la longueur d'onde est plus grande que le diamètre des particules en suspension, les particules absorbent une petite quantité de lumière. Cependant, lorsque les microparticules de latex enduites d'anticorps spécifique entrent en contact avec l'antigène présent dans la solution, elles adhèrent à l'anticorps en créant des liens entre les particules, ce qui produit leur agglutination. Lorsque le diamètre des particules agglutinées s'approche de la longueur d'onde du faisceau de lumière monochromatique, une plus grande quantité de lumière est absorbée. Cette augmentation de l'absorption de la lumière est proportionnelle à l'agglutination, qui, à son tour, est proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. Ce type de technologie est présent dans les analyseurs de coagulations plus sophistiqués introduits sur le marché dans les années 1990. Des tests immunologiques classiques, qui exigent habituellement beaucoup de temps, peuvent être effectués en quelques minutes lorsque l'un de ces outils automatisés est employé.

AVANTAGES DE L'AUTOMATISATION DANS UN LABORATOIRE DE COAGULATION

1. Améliore la capacité et la souplesse du temps consacré à la profession (Rodak, 1995).
2. Améliore la reproductibilité de tests. Par le passé, les essais de coagulation faits manuellement étaient inexacts et avaient des coefficients de variation supérieurs à 20 %. Les appareils semi-automatiques apportèrent une plus grande exactitude dans les tests de coagulation. Toutefois, en raison du pipetage manuel des échantillons et des réactifs, les tests doivent être faits en double. L'équipement entièrement automatisé améliore l'exactitude, qui atteint des coefficients de variation inférieurs à 5 %, voire 1 % pour certains tests. Ceci a fait en sorte que certains auteurs ont introduit la notion de tests en simplicate et la possibilité de réduire de moitié les coûts des réactifs et des cuvettes.
3. Réduit les coûts d'échantillon et de réactifs.
4. Facilite le stockage de données et les systèmes de recherche au moyen de logiciels informatiques.

5. Permet de retester les résultats automatiquement lorsque des erreurs sont commises au premier passage.
6. Offre la possibilité d'exécuter différents tests sur un même échantillon.
7. Permet l'échantillonnage à partir d'un tube fermé, ce qui augmente la sûreté et l'efficacité des tests de coagulation. Ceci réduit dans une large mesure la possibilité que l'opérateur soit exposé à des aérosols ou des éclaboussures de l'échantillon du patient ou de commettre des erreurs d'étiquetage. Un fabricant offre un système breveté de dépistage qui sépare automatiquement le plasma des érythrocytes avant d'effectuer les tests sans centrifugation préalable.
8. Permet de diluer les échantillons, les étalons et les contrôles. L'équipement peut être programmé pour des dilutions additionnelles si le résultat initial échappe à la linéarité de la méthode. Il peut aussi effectuer automatiquement d'autres tests sans intervention de l'opérateur s'il est cliniquement justifié de procéder ainsi, ou en raison des résultats obtenus au premier essai.
9. La plupart des analyseurs comportent des systèmes d'alarme qui avertissent l'opérateur dépassements de critères préétablis, qui peuvent indiquer des problèmes dans l'équipement (p. ex., quantité trop faible de réactif, défaillance sur le plan de la température, volume d'échantillon trop petit et erreurs dans le contrôle de qualité).

Les types de méthodologies disponibles comportent des avantages et des inconvénients qui doivent être connus et compris afin de garantir la précision et la validité des résultats des tests. Il est important de tenir compte que les laboratoires sont responsables de produire des résultats dignes de confiance. Le souci principal d'un laboratoire est de choisir de l'équipement de coagulation qui fournit des résultats appropriés malgré les restrictions budgétaires. De tels instruments exigent de l'entretien technique régulier, la mise à jour des connaissances et des contrôles du système, puisqu'une erreur ou une défaillance peut influencer de façon décisive un certain nombre de facteurs. Les systèmes de contrôle qui garantissent la fiabilité analytique sont par conséquent obligatoires.

Certains laboratoires ont la chance de pouvoir évaluer l'équipement avant d'en faire l'achat. Si ceci n'est pas possible, il est très important d'obtenir des renseignements adéquats et des conseils d'un laboratoire de référence.

Lors de l'évaluation précédant l'achat d'un nouvel équipement, comparer d'abord les analyseurs en fonction de critères tels que :

- le coût de l'équipement
- période d'inactivité et fiabilité
- délai de réponse aux demandes de réparation
- facilité d'emploi
- disponibilité de services d'entretien adéquats dans un délai approprié
- processus de validation et temps de traitement
- coût des éléments jetables

- flexibilité en ce qui concerne l'usage de réactifs d'autres fabricants
- possibilité d'ajouter de nouveaux protocoles de tests
- cours de formation et soutien pour la formation continue (Rodak, 1995)

La sensibilité de différents types d'équipement à divers paramètres variera en fonction de la façon dont les machines sont étalonnées et de la manière dont le point final de la réaction est détecté. Les laboratoires ont des besoins différents, et il est conseillé d'établir l'ordre des priorités. Pour un exemple, voir la figure 41.2.

Figure 41.2. Caractéristiques de l'équipement spécialisé

Source : Rodak, 1995

Caractéristiques	Description
Accès aléatoire	Avec l'échantillon du patient, une gamme de tests différents peut être effectuée en même temps, dans n'importe quel ordre.
Tube d'échantillon primaire	L'échantillon de plasma est directement prélevé par aspiration dans le tube de prélèvement ouvert placé dans l'analyseur.
Système de pénétration d'un tube de prélèvement fermé	L'analyseur aspire l'échantillon de plasma dans le tube de prélèvement avec le bouchon de caoutchouc en place.
Code à barres	Permet l'identification de réactifs, d'échantillons de patients ou des deux au moyen d'un code à barres. Ceci réduit l'entrée de données manuelle.
Interface bidirectionnelle	L'analyseur interroge un ordinateur central afin de déterminer le nombre de tests demandé. L'opérateur n'a pas besoin de programmer manuellement cette information dans l'appareil.
Indicateur d'échantillon	Avertit l'opérateur de problèmes quant à l'intégrité de l'échantillon.
Capteur de niveau des liquides	Avertit l'opérateur en cas d'insuffisance du volume de l'échantillon ou du réactif pour effectuer une analyse adéquate, ou si l'équipement n'a pas aspiré suffisamment de liquide de l'échantillon pour effectuer le test demandé.
Programmes intégrés de contrôle de qualité	Le logiciel de l'instrument mémorise et organise les données du contrôle de qualité. Il peut inclure l'application complète des règles de Westgaard pour indiquer les résultats se situant à l'extérieur des limites.
Possibilité d'introduire des échantillons STAT	Permet à l'opérateur de mettre fin à la séquence des tests afin de mettre un nouvel échantillon urgent (STAT) dans l'analyseur
Capacité de réfrigération des échantillons chargés	Préserve l'intégrité des échantillons ou des réactifs ou des deux lors du processus de vérification.

Caractéristiques	Description
Capacité de stockage des échantillons chargés	Indique la quantité de l'échantillon du patient qui peut être chargé en tout temps dans l'analyseur.
Capacité de tests réflexe	Rend possible la programmation de l'équipement pour qu'il répète ou ajoute des essais selon des paramètres particuliers définis par l'opérateur.
Mémorisation des données du patient	La capacité de l'analyseur de mémoriser les résultats des tests qui peuvent être consultés en tout temps. Peut mémoriser les courbes de formation de caillot.
Contrôle du volume de réactif	Avertit l'opérateur de l'insuffisance de réactif pour les tests programmés.
Traitement	Le nombre d'essais qui peuvent être traités dans une période donnée (généralement classé sous forme de nombre de tests par heure).
Courbe de formation de caillot	Permet à l'opérateur de visualiser la formation du caillot dans la cuvette. Aide à détecter certaines conditions anormales ou des états morbides, ou l'origine des résultats anormaux d'un test raté ainsi que leur résolution.

La technologie est en plein essor et les demandes quotidiennes croissantes créent un besoin pour un laboratoire d'avoir des instruments de ce type. Ceux-ci représenteront un grand en avant dans le domaine du laboratoire, étant donné la possibilité d'effectuer des tests d'une manière fiable, juste et précise et d'obtenir des résultats dans un délai plus rapide et sous de meilleures conditions de contrôle.

Les avantages de l'automatisation sont nombreux. La technologie progresse constamment pour se conformer aux nouveautés dans ce domaine et pour réduire les délais de traitement, ce qui permet aux tests d'être fiables, justes et précis, tout en maintenant le degré de qualité.

RÉFÉRENCES

Rodak BF (ed): *Diagnostic Hematology*. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 626–631.

Thomas LC, Sochynsky CL. Multiple measuring modes of coagulation instruments. *Clin Hemost Rev* 1999; 13:8.

AUTRES PUBLICATIONS PERTINENTES

Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Robotic automatisé analysis. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:269–279.

Sasaki M, Kageoka T, Ogura K et al. Total laboratory automation in Japan: Past, present and the future. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:217–227.

42 Analyse génétique moléculaire

Une publication séparée du Comité des sciences de laboratoire de la FMH, actuellement en cours de rédaction par M. Ampaiwan Chaunsumrit et Dr Anne Goodeve, traitera des méthodes de laboratoire touchant à tous les aspects de l'analyse génétique moléculaire concernant l'hémophilie et les troubles apparentés. Ce manuel de laboratoire, qui traitera de l'analyse phénotypique, sera téléchargeable gratuitement sur le site Web de la FMH au www.wfh.org.

FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOPHILIE

1425 Boulevard René Lévesque Ouest, Suite 1010
Montréal (Québec) H3G 1T7
CANADA

Tél.: (514) 875-7944

Fax: (514) 875-8916

E-mail: wfh@wfh.org

Internet: www.wfh.org

FÉDÉRATION MONDIALE DE
L'HÉMOPHILIE

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA
FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA

Traitement pour tous

