

### SUJETS ABORDÉS

- ✓ Test du temps de saignement
- ✓ Temps de prothrombine (TP)
- ✓ Temps de céphaline activée (TCA)
- ✓ Tests de mélange pour l'exploration approfondie de TP et de TCA allongés
- ✓ Temps de coagulation de la thrombine
- ✓ Temps de thrombine en présence de sulfate de protamine pour détecter la présence d'héparine
- ✓ Temps de reptilase
- ✓ Fibrinogène (dosage de Clauss modifié)
- ✓ Élimination de l'héparine du plasma

**Test du temps de saignement :** historiquement, ce test a été développé pour évaluer en préopératoire la capacité à maintenir un schéma hémorragique normal lors d'interventions chirurgicales majeures, ou à évaluer une suspicion de troubles de la coagulation en raison d'une anomalie plaquettaire. Il a malheureusement été confirmé que ce test n'était ni reproductible ni sensible, et son utilisation ne peut donc avoir lieu qu'en association avec des antécédents familiaux et cliniques complets, accompagnés de tests de dépistage de la coagulation, numération et morphologie plaquettaires comprises. L'analyseur PFA100/200 a largement remplacé le test du temps de saignement dans l'évaluation de la fonction plaquettaire, et ce malgré les insuffisances observées chez les patients thrombocytopéniques (Rodgers et Levin, 2023 ; Undas, 2023).

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). L'allongement du temps de saignement survient en présence d'une thrombocytopénie, d'une maladie de Willebrand (mW) de type 3 et 2B, d'une thrombasthénie de Glanzmann, d'un syndrome de Bernard-Soulier, d'une maladie du pool vide, d'autres dysfonctions plaquettaires, d'une septicémie (Williams et al., 2024), de maladies auto-immunes, d'une carence en vitamines, d'une anémie sévère, de tumeurs malignes hématologiques (p. ex. des troubles myéloprolifératifs entraînant un déficit en facteur V) et d'une réaction aux médicaments (Vinholt et al., 2019). Le fibrinogène est indispensable à l'arrêt des saignements et il a été suggéré que le facteur V jouait aussi un rôle. Le temps de saignement peut donc s'allonger chez les patients déficients en fibrinogène ou en facteur V. Cet allongement se produit également chez certains patients atteints d'insuffisance rénale, de dysprotéinémie et de troubles vasculaires (Russeau et al., 2023 ; Bourguignon et al., 2022).

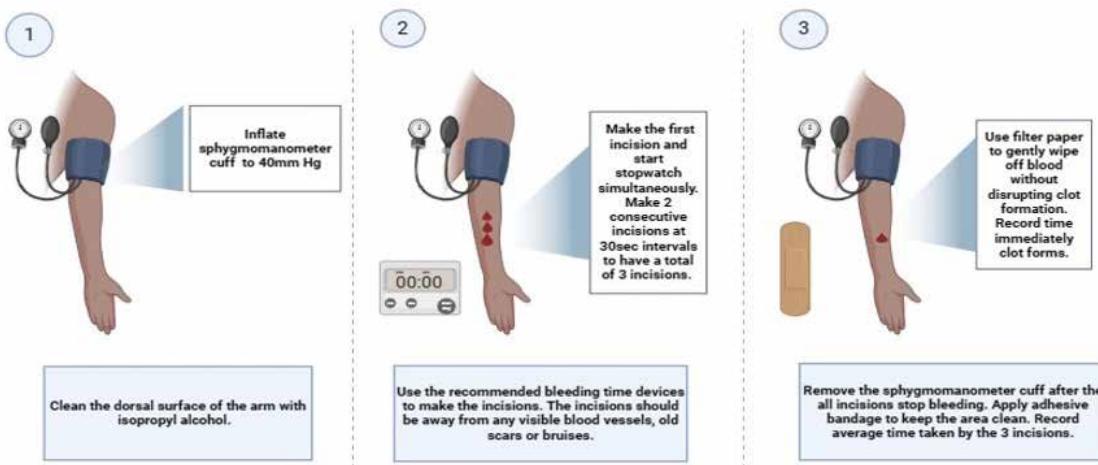
### Matériel et équipement :

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

### Méthode :

- ✓ Le brassard du sphygmomanomètre est placé autour du haut du bras, à la hauteur du cœur, et gonflé à 40 mm de mercure. Cette pression est maintenue tout au long du test.

- ✓ Nettoyer la face postérieure 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.
- ✓ Il est recommandé d'éviter les veines superficielles, les cicatrices et les ecchymoses.
- ✓ À 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.
- ✓ Noter le temps écoulé entre la ponction et l'arrêt du saignement.



**Figure 2.** Schéma de déroulement du test de temps de saignement (d'après le modèle de Sally Kim pour « Measurement of blood pressure: The Auscultatory Method » sur biorender.com)

**Interprétation :** la plage normale chez l'adulte est de deux à sept minutes (jusqu'à huit minutes), mais peut varier en fonction de la méthode utilisée.

**Remarques :** une plage normale doit être établie localement, quel que soit l'appareil utilisé. L'incision doit être faite parallèlement à la longueur du bras. Les incisions perpendiculaires saignent plus longtemps. Si le résultat est anormal, il convient de répéter le test. Il n'est pas nécessaire d'enregistrer les points finaux si le saignement dure plus de 20 minutes. L'effet des médicaments interférant avec la fonction plaquettaire doit être pris en compte. Par exemple, les médicaments qui contiennent de l'aspirine peuvent allonger le temps de saignement. Donc, lorsque c'est possible, il est recommandé de suspendre la prise de ces médicaments dans les sept jours précédent le test. Il est possible qu'une cicatrice perdue ou qu'un hématome se forme à l'endroit où les incisions ont été faites ; il faut en informer le patient avant de pratiquer l'incision. Chez les femmes enceintes, le temps de saignement peut être trompeur en raison de taux physiologiquement élevés de FVIII et de FW. Le brassard du sphygmomanomètre doit être régulièrement étalonné conformément aux normes de qualité en vigueur. La méthode de Duke présente un taux d'inexactitude plus élevé, avec un risque accru de développement d'un hématome (Rousseau et al., 2023). Étant donné que le temps de saignement est mesuré au chevet de la personne, toutes les procédures standard relatives concernant les exigences de qualité des examens de biologie médicale délocalisée (EBMD) doivent être appliquées pour la sécurité du patient (ISO 15189:2022). En cas de suspicion de mW et si le laboratoire en a la capacité, les tests/analyses suivants doivent être pratiqués en sus des antécédents hémorragiques complets : antigène du FW, activité du FW, dosage du facteur VIII, numération formule sanguine (numération et morphologie plaquettaires comprises) et tests de dépistage de base de la coagulation (TP, TCA, temps de thrombine, fibrinogène). Ils pourraient apporter une meilleure compréhension de ce que pourrait être le diagnostic clinique en l'absence de temps de saignement ou d'un laboratoire d'analyse de la coagulation spécial capable de poser un diagnostic de mW définitif.

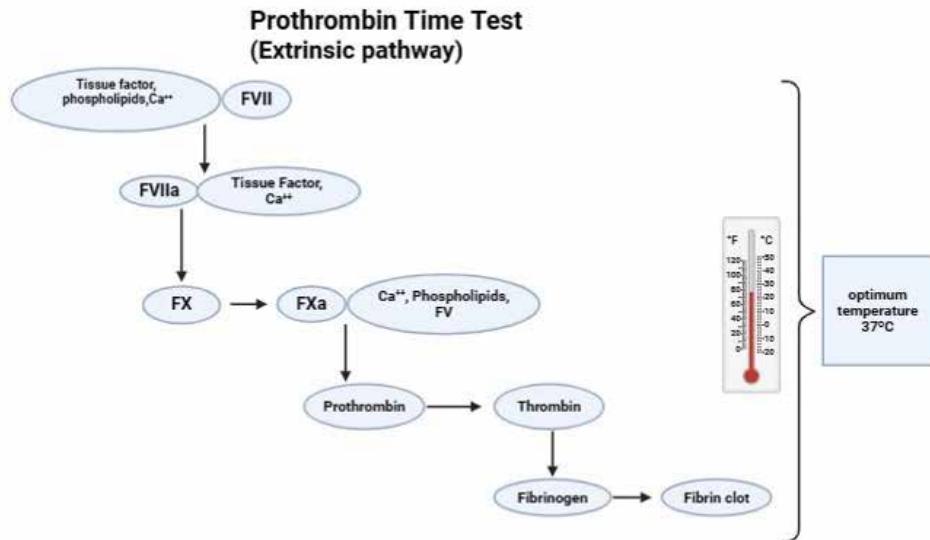
**Temps de prothrombine (TP) :** il évalue l'intégrité du système extrinsèque. Il est très utile pour détecter les déficits en facteur de coagulation, qualitatifs ou bien quantitatifs, des voies extrinsèques et communes. Il est également utile pour le suivi des anticoagulants antagonistes de la vitamine K (AVK) tels que la warfarine, ainsi que la détection des maladies du foie, de la carence en vitamine K, du déficit en facteur X dû à une amylose, de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), de la présence d'anticoagulants oraux directs (AOD) de manière dose-dépendante ou d'anticorps contre les facteurs de la voie extrinsèque. Ces conditions peuvent allonger les résultats du test du TP (Dorgalaleh et al., 2021). Le TP est sensible aux variations des taux de facteurs V, VII et X et, dans une moindre mesure, de facteur II (prothrombine). Il ne convient pas à la détection de variations mineures du fibrinogène, mais peut être anormal si le taux de fibrinogène est très faible ou si un inhibiteur est présent. La sensibilité du test dépend des réactifs et de la technique utilisés et il est important d'établir en local une plage de référence. La voie mesurée par le temps de prothrombine est illustrée à la figure 3. Le réactif pour mesurer le temps de prothrombine, communément nommé « thromboplastine », contient du facteur tissulaire et des phospholipides. De nombreux réactifs appropriés sont disponibles dans le commerce.

#### Réactifs :

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

**Méthode :** la technique d'inclinaison manuelle du tube est décrite dans la partie 4 du présent manuel. Il y a lieu de suivre les recommandations du fabricant du réactif. Lors de l'utilisation d'un nouveau réactif thromboplastine dont le numéro de lot est différent du précédent, une nouvelle courbe d'étalonnage doit être tracée.

**Interprétation :** 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. Cela souligne à nouveau l'importance d'établir des plages normales pour la méthode utilisée dans le laboratoire et sur la base de la population locale. En présence de déficits légers en facteurs II, V, VII ou X, le degré d'allongement peut être minime. Concernant le déficit en facteur II, le TP peut se situer dans la plage normale. La présence d'anticoagulants de type lupique ou d'anticorps antiphospholipides peut avoir un effet sur certains réactifs du TP, et certains types d'anticorps rares peuvent allonger le TP sans allonger le TCA. Les réactifs contenant des concentrations relativement faibles en phospholipides sont plus susceptibles d'être affectés, en particulier certains réactifs fabriqués en modifiant, à l'aide d'un lipide, le facteur tissulaire recombinant. La présence de facteur VII activé, soit à la suite d'une thérapie par facteur VIIa recombinant soit lorsque le facteur VII endogène a été activé, peut raccourcir le TP. 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). Il est possible que le sang total servant à la détermination du TP reste 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 à base de facteur tissulaire humain peut être plus révélateur d'un risque de saignement. Pour une discussion approfondie sur les questions liées à la détermination du TP, consulter les lignes directrices en vigueur du CLSI sur le TP et le TCA en un temps (2023).



**Figure 3.** Voie mesurée par le test du TP

**Temps de céphaline activée (TCA) :** ce test basé sur la formation d'un caillot aide à identifier les déficits en facteur de coagulation ou les inhibiteurs des voies intrinsèques et communes. Conjugué à un temps de prothrombine normal, il s'agit du test le plus utile pour détecter les déficits en facteurs VIII, IX, XI et XII. Le TCA sera également plus long dans tout déficit impliquant les voies communes (déficits en facteurs V, X et II et fibrinogène) et en présence d'inhibiteurs. Certains anticoagulants à visée thérapeutique, comme l'héparine, allongent aussi le TCA. Il est important d'exclure la possibilité que de tels traitements aient été utilisés dans l'exploration initiale de TCA allongés. Le TCA est plus long en présence d'un déficit en prékallicréine (PKK) ou en kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), à moins que le test ne soit effectué à l'aide d'un réactif contenant de l'acide ellagique comme activateur (Turi, 1986). Dans ce cas, le TCA sera normal, même en l'absence totale de ces facteurs. Il est conseillé de noter que chaque laboratoire doit déterminer ses plages normales de TCA en fonction de la population locale, du type de réactif de TCA et du coagulomètre employé. Le réactif de TCA contient des phospholipides dilués et des activateurs de contact tels que la silice, l'acide ellagique et le kaolin. Cela est ajouté au plasma citraté pauvre en plaquettes à 37 °C. Ce mélange est incubé à 37 °C pendant une durée spécifiée pour permettre l'activation des facteurs de contact, puis l'ajout de chlorure de calcium conduit à la formation du caillot de fibrine. La durée de formation d'un caillot est consignée en secondes. La voie mesurée par le TCA est illustrée à la figure 4.

## Réactifs :

- ✓ Réactif pour la détermination du TCA
  - ✓ Chlorure de calcium 25 mM

**Méthode :** la technique d'inclinaison manuelle du tube est décrite dans la partie 4 du présent manuel. Il y a lieu de suivre les recommandations du fabricant du réactif.

**Interprétation :** une plage normale doit toujours être établie en local. Un TCA allongé avec un TP normal suggère la possibilité d'un déficit en facteurs VIII, IX, XI ou XII, en KHPM ou en PKK, ou la présence d'un inhibiteur. Dans ce cas, il est recommandé de refaire le test avec un mélange composé à parts égales de plasma normal et de plasma du patient (la « solution 50:50 » ci-après). Si le TCA corrige de plus de 50 % la différence des temps de coagulation du plasma du patient et du plasma normal, il faut suspecter un déficit en facteur (décrit en détail dans le sujet spécifique ci-après). 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 lupique.

**Tableau 7.** Exemple d'interprétation d'un TCA allongé

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

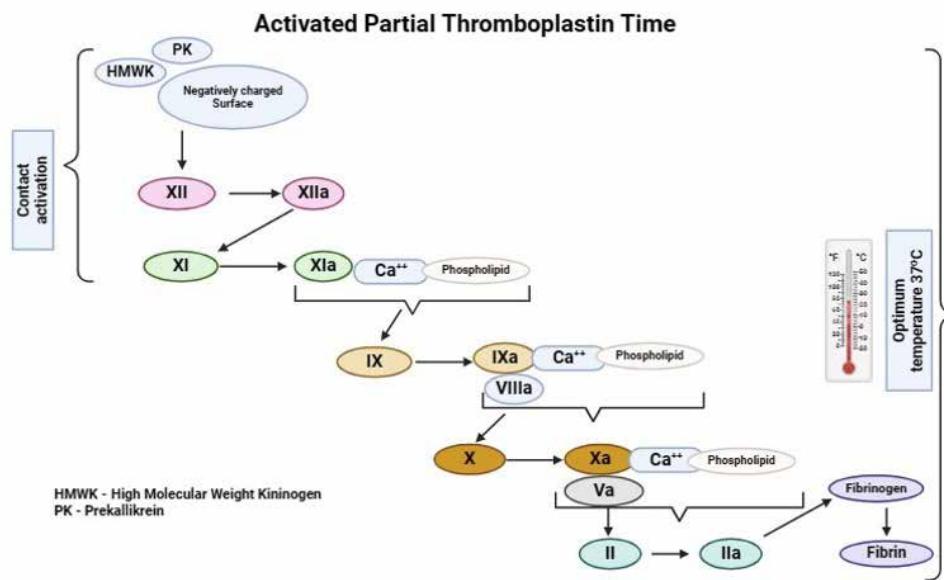
**Investigations portant sur un TCA allongé isolé :** l'ordre logique des étapes à suivre pour des patients présentant un TP normal et un TCA allongé est le suivant :

- ✓ Mesurer le temps de thrombine. Si celui-ci est normal, passer aux étapes suivantes. Si le temps de thrombine est allongé, répéter le test en présence de sulfate de protamine. Si le temps de thrombine est corrigé et normalisé, cela suggère la présence d'héparine et il ne sera pas nécessaire d'effectuer les tests approfondis indiqués ci-dessous. Si l'on sait que le patient ne prend pas d'héparine sous quelque forme que ce soit, un nouvel échantillon devrait être demandé.
- ✓ Déterminer le TCA sur un mélange formé à parts égales de plasma normal et de plasma du patient (50 % de chaque). Un mélange à 50 % qui ne parvient pas à corriger et normaliser le TCA peut indiquer la présence d'un inhibiteur (décrite en détail ci-après).
- ✓ Déterminer le TCA avec un deuxième réactif contenant une concentration en phospholipides élevée, telle que l'Actin FS (Dade Behring). Si le TCA initial est nettement allongé (d'au moins trois secondes au-dessus de la limite supérieure de la normale utilisée) et que le TCA avec Actin FS est normal, un anticoagulant de type lupique est probablement la cause de l'allongement du TCA. Cela peut être confirmé ultérieurement au moyen de tests spécifiques, comme le temps de venin de vipère de Russell dilué, bien que ceci ne soit généralement pas nécessaire en l'absence de demande de recherche d'un éventuel anticoagulant de type lupique comme facteur de risque de thrombose. Une autre cause possible, mais très rare, d'un TCA normal avec Actin FS et d'un TCA allongé avec un réactif utilisant de la silice ou du kaolin comme activateur, est le déficit en PKK. À l'instar des anticoagulants de type lupique, cela ne prédispose pas à un risque de saignement. Dès lors, la confirmation peut ne pas être requise. Lorsque le TCA initial est clairement allongé (trois secondes ou plus) et que le TCA avec Actin FS est normal, il n'est pas nécessaire d'effectuer des dosages de facteurs.
- ✓ Si les deux TCA sont allongés, effectuer les dosages FVIII:C, FIX et FXI. Un dosage de FXII peut être réalisé le cas échéant, puisqu'il s'agit d'un déficit relativement courant et que sa mise en évidence peut expliquer l'allongement du TCA. Il n'est pas nécessaire d'exclure la présence de troubles de la coagulation étant donné qu'un déficit en facteur XII n'est pas associé à un risque accru de saignement.
- ✓ Les réactifs (Actin FS notamment) qui contiennent de l'acide ellagique comme activateur donnent des résultats normaux, et ce, même en présence de déficit sévère en PKK.

**Remarques :** il existe dans le commerce de nombreux réactifs appropriés, dont les matériaux présentent des sensibilités différentes. Comme pour le TP, les temps de coagulation peuvent être influencés par l'utilisation d'un coagulomètre. Historiquement, la recherche a prouvé qu'il existait une grande variabilité dans les tests du TCA, comme l'ont montré les résultats variables provenant de différents réactifs ou coagulomètres et de l'analyse d'échantillons similaires dans différents laboratoires. Ces preuves incitent à la nécessité d'établir des plages de valeurs normales en local pour des coagulomètres et des réactifs de TCA spécifiques. Dans les plasmas à analyser, des taux élevés d'un facteur de coagulation peuvent compenser des taux plus faibles d'autres facteurs. Par exemple, un facteur VIII nettement élevé au cours d'une réaction de phase aiguë peut conduire à un TCA normal en présence de baisses des facteurs IX ou XI, ce qui pourrait être cliniquement important. Si un patient a des antécédents personnels ou familiaux

suggérant des troubles de la coagulation, un examen plus approfondi (y compris dosages de facteurs spécifiques) peut être justifié en présence d'un TCA normal, en particulier si le résultat se situe dans la partie supérieure de la plage de référence. La concentration de phospholipides varie considérablement d'un réactif à l'autre. C'est l'une des raisons pour lesquelles la sensibilité des réactifs à la présence d'anticoagulants de type lupique varie considérablement. Si un réactif sensible au lupus est utilisé pour le TCA initial, il est pertinent d'effectuer un second TCA avec un réactif tel qu'Actin FS (Dade Behring, Marbourg, Allemagne) dont la concentration en phospholipides est très élevée (Kitchen *et al.*, 1999). Si l'allongement avec le premier réactif est dû à un anticoagulant de type lupique, le second TCA est presque toujours normal, car très peu d'anticoagulants de type lupique allongent le TCA lorsque le réactif Actin FS est utilisé.

Un TCA normal avec Actin FS, combiné à un TCA allongé initial, exclut normalement la présence d'un déficit en facteurs VIII, IX ou XI et, dans ce cas, il n'est pas nécessaire de procéder à des dosages des facteurs. Dans de rares circonstances, un TCA normal peut se produire avec n'importe quel réactif lorsque les facteurs IX ou XI sont légèrement réduits (30 à 50 U/dl) et que l'élévation du facteur VIII est prononcée. Le TCA avec Actin FS est souvent normal lorsque le facteur XII est plus faible dans la plage de 20 à 50 U/dl et que le TCA avec activation à base de kaolin ou de silice est légèrement élevé. Cette anomalie n'a aucune pertinence clinique. Quelques anticoagulants lupiques puissants allongent le TCA avec Actin FS. Les anticorps spécifiques contre le facteur VIII, IX ou XI allongent le TCA, quel que soit le réactif. Pour une discussion approfondie sur les questions liées à la détermination du TCA, se rapprocher du CLSI (2023).



**Figure 4.** Voie mesurée par le TCA

**Tests de mélange pour l'exploration approfondie de TP et de TCA allongés :** les tests de mélange sont en grande partie effectués lorsque le TP ou le TCA initial est allongé et qu'il faut identifier la cause de cet allongement de manière à pratiquer d'autres tests et parvenir à un diagnostic. L'on a constaté que la réalisation et l'interprétation des tests de mélange sont très variables. Il est primordial d'avoir une bonne connaissance des déficits en facteurs et du comportement des inhibiteurs dans les tests de mélange, en plus des facteurs susceptibles d'en influencer la réalisation et l'interprétation (figure 5) (Favaloro, 2020 ; Adcock *et al.*, 2023). Le plasma du patient et le PNP sont mélangés à parts égales (c.-à-d. 50:50) et le test précédemment allongé est réalisé sur ce mélange. Il convient d'avoir recours à des contrôles appropriés (PNP mélangé à du plasma contenant un inhibiteur et PNP mélangé à du plasma comportant un déficit factoriel). Il existe différentes méthodes d'interprétation et chaque laboratoire doit établir ses plages limites. Il doit par ailleurs établir les intervalles de référence normaux pour le TP et le TCA en fonction de la population locale de manière à parvenir à une interprétation fiable des résultats (Adcock *et al.*, 2023).

## Procédure :

- ✓ Mélanger des parts égales de PNP et de plasma du patient (50:50) et préparer le test précédemment allongé (le TCA sera appliqué dans ce cas).

Si le résultat de TCA obtenu à partir du mélange est corrigé par rapport au résultat de TCA allongé initial, d'autres tests de mélange peuvent être effectués pour identifier le facteur déficient. Un deuxième lot de tests de mélange peut être analysé avec un tube contenant un mélange de plasma du patient et de plasma déficient en facteur VIII à parts égales, et un deuxième tube contenant un mélange égal de plasma déficient en facteur IX et de plasma du patient. Le TCA est mesuré sur les deux mélanges. Le résultat de TCA qui présente une correction indique un déficit en facteur VIII ou IX (tableau 8).

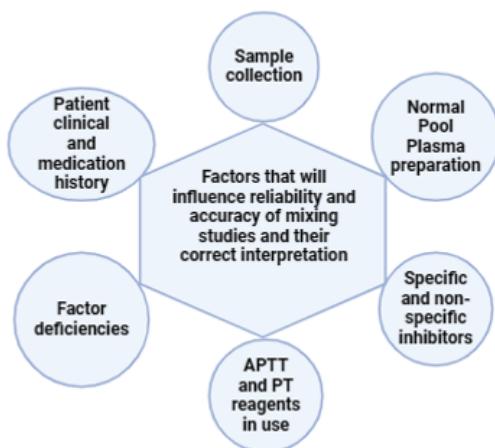
Ces deux mélanges ne sont effectués que si les antécédents cliniques du patient suggèrent un déficit factoriel de la voie intrinsèque dans les laboratoires qui n'ont pas la capacité de réaliser des dosages de facteurs.

**Interprétation des tests de mélange :** si le TCA corrige de plus de 50 % la différence des temps de coagulation du plasma du patient et du plasma normal, il faut suspecter un déficit en facteurs, comme évoqué précédemment. 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 lupique. Nous pouvons également utiliser le pourcentage de correction pour l'interprétation du test de mélange, comme ci-dessous.

$$(\%) \text{ Correction} = \frac{(\text{patient APTT} - \text{mix APTT})}{(\text{patient APTT} - \text{NPP APTT})} \times 100$$

Correction = la valeur en pourcentage est supérieure/égale au point limite local

Aucune correction = la valeur en pourcentage est inférieure à la valeur limite établie en local



**Figure 5.** Schéma élaboré sur biorender.com à partir d'informations obtenues auprès d'Adcock et al. 2023

Comme le soulignent Adcock et al. (2023), plusieurs facteurs influencent l'exactitude des tests de mélange. Les antécédents cliniques et médicamenteux du patient constituent un facteur important. Parmi les autres facteurs importants, citons le respect des normes acceptées pour le prélèvement d'échantillons, d'éventuels antécédents de déficits en facteurs, le type de réactifs utilisés et leur sensibilité (en particulier aux déficits factoriels légers et aux inhibiteurs), l'établissement d'intervalles de référence normaux pour les tests de dépistage sur la base d'échantillons normaux de la population locale, la préparation du plasma

normal poolé et les taux de concentration des facteurs de coagulation (au moins 80 %), ainsi que la nature endogène ou exogène des inhibiteurs spécifiques ou non spécifiques. Une meilleure compréhension de ces facteurs améliorera la capacité des laboratoires à correctement interpréter les résultats des tests de mélange.

**Plasma déficient en facteur VIII/IX pour étude de mélange :** le plasma provenant de patients présentant un déficit sévère isolé en facteur VIII ou IX (< 1 UI/dl) est très utile pour les études mixtes. Le plasma sélectionné à cette fin doit avoir un TP normal, confirmant que les autres facteurs de coagulation synthétisés dans le foie sont susceptibles d'être à des taux normaux. Ces plasmas peuvent être lyophilisés pour une conservation à long terme ou stockés sous forme de plasma à -35 °C (minimum) pendant au moins trois mois. En utilisant des mélanges 50:50 d'additif et de plasma du patient, une anomalie peut être caractérisée. Dans les situations où il y a un allongement isolé du TCA, le plasma déficient en facteur VIII est préférable au plasma vieilli. De même, un plasma déficient en facteur IX est préférable au plasma adsorbé.

L'éthique impose d'obtenir le consentement éclairé du patient avant de prélever un échantillon pour les tests de mélange. De même, l'absence d'inhibiteur doit être établie avant le recueil d'échantillons.

**Tableau 8.** Schéma des résultats de tests de mélange en présence de déficits factoriels individuels

Déficit dans le plasma du patient	TCA	Déficit en FVIII	Déficit en FIX	Plasma normal
FVIII	anormal	non corr.	corr.	corr.
FIX	anormal	corr.	non corr.	corr.
FXI/FXII	anormal	corr.	corr.	corr.
Inhibiteur	anormal	non corr.	non corr.	non corr.

Déficit dans le plasma du patient	TP	TCA	Plasma normal
FII	anormal	anormal	corr.
FV	anormal	anormal	corr.
FVII	anormal	normal	corr.
FX	anormal	anormal	corr.

non corr. = aucune correction ; corr. = correction

**Remarques :** l'échantillon de coagulation doit contenir une numération plaquettaire  $< 10 \times 10^9/l$  pour fournir une teneur minimale en phospholipides et permettre la détection des anticoagulants de type lupique faibles (Toulon et al., 2016). Les études de mélange doivent uniquement être effectuées sur le plasma qui avait donné un résultat allongé. Si, pour une raison quelconque, un nouvel échantillon a été prélevé chez le patient, le test initial anormal doit être répété avant que le test de mélange ne soit effectué. Il convient de toujours procéder à la validation et la vérification de nouveaux réactifs avec de nouveaux numéros de lot pour s'assurer que la sensibilité des réactifs aux inhibiteurs et aux déficits factoriels reste dans la plage acceptable (Toulon et al., 2016). Tous les échantillons de coagulation doivent être prélevés comme décrit dans la partie 3 de ce manuel. Les plasmas contenant des inhibiteurs non spécifiques qui ont un effet sur le TCA (anticoagulant de type lupique p. ex.) ne présentent typiquement pas de correction ; cependant les plasmas qui contiennent un titrage d'inhibiteurs faible ou très faible peuvent être corrigés partiellement par du plasma normal.

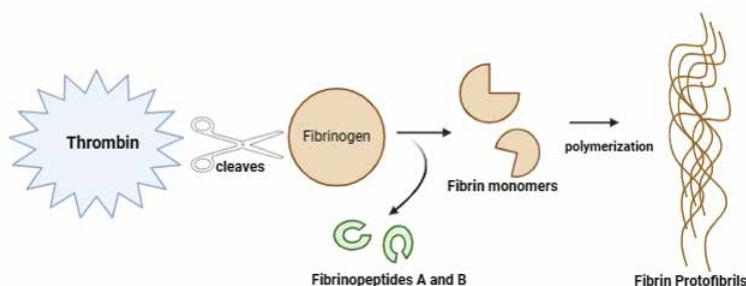
**Inhibiteurs spécifiques du facteur VIII :** les inhibiteurs spécifiques du facteur VIII sont susceptibles d'être associés à l'absence de correction immédiate du TCA par ajout de plasma normal. Dans d'autres cas, l'ajout de plasma normal entraîne une correction immédiate, suivie d'un allongement du TCA dans le mélange au cours du temps. Un mélange composé de plasma du patient et de plasma normal peut être analysé après une heure passée à 37 °C, et le TCA peut être déterminé sur du plasma normal et du

plasma du patient incubés séparément pendant la même durée. Les inhibiteurs spécifiques contre d'autres facteurs de coagulation sont particulièrement rares, mais peuvent survenir. 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 rapidement de manière générale. La figure 6 montre l'effet sur le TCA lorsque du PNP à 20 et 50 % est ajouté à des échantillons de personnes atteintes d'hémophilie A acquise et présentant des anticorps antifacteur VIII. La limite supérieure de la plage normale pour cette méthode de TCA était de 37 secondes. Cet exemple illustre qu'en présence d'anticorps antifacteur VIII, il peut dans certains cas y avoir 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 un allongement progressif du TCA, puisque l'anticorps antifacteur VIII inhibe le facteur VIII. La méthode de Bethesda modifiée par Nijmegen est le test « de référence » pour la quantification des inhibiteurs présents dans un échantillon de plasma après un dépistage positif. La méthode chromogénique de Bethesda est le test privilégié pour évaluer les inhibiteurs chez les patients sous émizumab, car l'on sait que les résultats du dépistage des inhibiteurs sur la base du TCA sont plus courts chez les patients sous émizumab (Lowe et al., 2020). D'autres inhibiteurs des facteurs de coagulation (inhibiteurs du facteur Xa notamment) peuvent être détectés à l'aide d'un dosage de l'activité antifacteur Xa.

**Tableau 9.** Études de mélange dans l'hémophilie A acquise

Titre Bethesda (U/ml)	TCA (s)	TCA + plasma normal à 20 % (s)	TCA + plasma normal à 50 % (s)
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

**Temps de coagulation de la thrombine :** Le temps de coagulation de la thrombine (également appelé « temps de thrombine ») est utile pour identifier les anomalies fibrinogéniques héréditaires ainsi que les anomalies quantitatives ou qualitatives acquises. L'on sait qu'il est très sensible à la présence d'héparine ou de médicaments, tels que les inhibiteurs directs de la thrombine ou IDT (Bonar et al., 2017). Il est le reflet de la réaction entre la thrombine et le fibrinogène. Il est allongé lorsque le taux de fibrinogène est très bas (inférieur à 1,0 g/l), en présence d'héparine, de substances analogues à l'héparine, d'IDT ou d'autres inhibiteurs (produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine, etc.) et lorsque le fibrinogène est qualitativement anormal (dysfibrinogénémie), incluant à la fois les anomalies congénitales et acquises, secondaires à une atteinte hépatique (Mackie et al., 2024).



**Figure 6.** Schéma illustrant la conversion du fibrinogène en fibrine en présence de thrombine. Élaboré sur biorender.com

## Réactifs :

- ✓ 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.

Divers réactifs sont disponibles dans le commerce. Certains ont deux niveaux de dilutions du réactif avec le tampon, et une troisième concentration du réactif pour les échantillons à forte teneur en héparine suggérant un patient sous héparine thérapeutique. Comme toujours, il y a lieu de suivre les instructions du fabricant, et les plages de référence normales locales doivent être établies par le laboratoire.

**Méthode :** la méthode d'inclinaison manuelle du tube est décrite dans la partie 4 du présent manuel. Il convient de suivre les recommandations du fabricant du réactif.

**Remarques :** 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). Pour de la thrombine concentrée, la diluer dans une solution saline à environ 10-15 U/ml, ou davantage au besoin, jusqu'à atteindre un temps de coagulation approprié pour le contrôle. Pour tous les réactifs du temps de thrombine disponibles dans le commerce, il convient de respecter les instructions du fabricant concernant la reconstitution, l'utilisation et la conservation. La solution de thrombine reconstituée peut être stockée à une température de -35 °C minimum et diluée avant d'être utilisée. La thrombine diluée se détériore à température ambiante. Du PNP servant de contrôle doit être inclus avec chaque série de tests. Les échantillons de plasma pour le temps de thrombine doivent être analysés dans les quatre heures suivant le prélèvement et dans les deux heures si la présence d'héparine est suspectée. Des taux élevés d'héparine dans l'échantillon entraîneront l'absence de formation d'un caillot. Cela est également possible avec certains IDT (dabigatran entre autres). Utiliser le temps de reptilase pour confirmer la présence d'IDT ou une contamination par l'héparine ou sa présence dans l'échantillon du patient. Les résultats du temps de thrombine varient en fonction du type de réactifs et de l'instrument de coagulation utilisé. Par conséquent, il est recommandé que chaque résultat soit communiqué au patient avec une plage de référence spécifique à ce réactif et à cet instrument.

**Temps de thrombine en présence de sulfate de protamine pour détecter la présence d'héparine :** la présence d'HNF peut causer un allongement du temps de thrombine. Les plus grandes chaînes d'héparine, qui allongent le temps de thrombine, peuvent être neutralisées par adjonction de sulfate de protamine. Le sulfate de protamine est disponible dans de nombreuses pharmacies hospitalières, où il est utilisé comme agent thérapeutique pour neutraliser l'effet de l'héparine. La concentration du médicament dans les préparations thérapeutiques est normalement beaucoup plus élevée que ce qui est utile pour les analyses biologiques. Par conséquent, le cas échéant, le médicament doit être dilué dans une solution saline de façon à atteindre une concentration de 40 mg% et obtenir la solution de travail. La solution de travail de thrombine avec sulfate de protamine est préparée en mélangeant neuf parts de réactif à une part de sulfate de protamine 40 mg%. Celle-ci est ensuite utilisée à la place de la solution de thrombine. Un contrôle normal doit être analysé. Si le temps de thrombine d'un échantillon est allongé, mais se corrige à moins de deux secondes du résultat de contrôle, la présence de l'héparine est confirmée.

## Réactifs (Hogwood et al., 2017) :

- ✓ Tampon barbital pH 7,4 (Fritsma, 2019)
- ✓ Solution de travail de sulfate de protamine – utiliser 5 ml de sulfate de protamine 10 mg/ml pour préparer une dilution 1/20 à l'aide de tampon barbital. Des dilutions en série à différentes concentrations de sulfate de protamine peuvent être préparées à partir de cette solution. Elles restent stables lorsqu'elles sont stockées à 4 °C.
- ✓ PPP du patient
- ✓ Thrombine

#### Méthode :

- ✓ Effectuer une dilution en série de sulfate de protamine dans du tampon barbital.
- ✓ Préparer de la thrombine diluée à l'aide de tampon barbital. L'ajout de 100 µl de thrombine diluée à 200 µl de plasma du patient dans un tampon à 37 °C devrait permettre la formation d'un caillot à 10 secondes.

**Interprétation :** si le caillot se forme dans les 10 secondes, il n'y a pas d'HNF dans le plasma du patient. Si le temps est allongé, le plasma du patient contient de l'HNF. Le plasma du patient est mélangé avec du sulfate de protamine dilué et le test est répété. L'objectif est de mesurer le temps de thrombine sur différentes dilutions de plasma du patient et sulfate de protamine qui permettent la formation d'un caillot dans une plage normale.

**Temps de reptilase :** la reptilase est un venin provenant du faux crotal ou grage commun (*Bothrops atrox*). Il s'agit d'une enzyme ressemblant à la thrombine, appelée « batroxobine », qui agit par clivage du fibrinogène pour former le fibrinopeptide A, ce qui entraîne la formation d'un monomère de fibrine et d'un caillot par polymérisation. Cette enzyme n'est pas inhibée par les antithrombines et n'est donc pas affectée par la présence d'héparine ou d'IDT. Par conséquent, elle peut être utilisée pour évaluer le taux de conversion du fibrinogène en fibrine en présence d'héparine et d'IDT (Mackie et al., 2024). Il est pertinent de vérifier si un temps de thrombine allongé est dû à la présence d'héparine ou d'IDT dans l'échantillon. Si le temps de thrombine est allongé et que le temps de reptilase est normal, la cause la plus probable sera la présence d'héparine ou d'IDT. En cas de dysfibrinogénémie, le temps de reptilase peut être plus sensible (c'est-à-dire plus long) que le temps de thrombine. La reptilase ajoutée au plasma du patient (PPP) fournit de la batroxobine qui clive le fibrinogène, libérant le fibrinopeptide A pour former un monomère de fibrine avec formation de caillots après polymérisation (Karapetian, 2013).

**Réactifs :** reptilase (Sigma Aldrich, code V5375) dissoute à une concentration de 25 mg dans 15 ml de tampon d'Ownen. Ce venin à l'état brut est dangereux et il faut faire attention de ne pas inhale la poudre. Le technicien doit porter des gants et un masque lorsqu'il manipule le venin brut. La solution mère doit être conservée congélée à -70 °C en aliquotes de 0,5 ml. Elle est stable pendant au moins deux ans dans ces conditions. Afin de préparer un réactif prêt à l'emploi, décongeler et diluer une partie de la solution mère dans 10 parts de tampon d'Ownen. 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 congélées prêtées à l'emploi doivent être décongelées 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 (20 à 25 °C). Il existe diverses préparations de batroxobine disponibles dans le commerce.

#### Méthode :

- ✓ Effectuer tous les tests en double.
- ✓ Placer un nombre suffisant de tubes de coagulation en verre de 75 × 10 mm dans un bain-marie à 37 °C (deux par patient, plus deux pour le contrôle).
- ✓ Pipeter 0,3 ml de plasma (contrôle ou patient) dans des tubes de coagulation préchauffés.
- ✓ Chauffer pendant une à deux minutes.
- ✓ Ajouter 0,1 ml de dilution de reptilase et enclencher le chronomètre.
- ✓ Incliner à trois reprises pour mélanger, puis à trois autres reprises toutes les cinq secondes jusqu'à la formation d'un caillot.
- ✓ Noter le temps de coagulation.
- ✓ Le temps du contrôle doit être entre 15 et 18 secondes. (S'il est plus court, ajuster en diluant davantage le réactif de reptilase avec du tampon d'Ownen.)
- ✓ Si aucune coagulation ne se produit, noter le résultat comme > 90 secondes.

**Plage normale :** le temps du patient doit se situer à trois secondes près du temps du contrôle. Les deux temps doivent être communiqués.

**Interprétation :** l'interprétation du temps de thrombine et du temps de reptilase allongés est présentée au tableau 10.

**Tableau 10.** Interprétation du temps de thrombine allongé

Temps de thrombine	Temps de reptilase	Cause	Commentaires
Allongé	Également allongé	Hypo- ou afibrinogénémie	Mesurer le fibrinogène
Allongé	Fortement allongé	Dysfibrinogénémie	Congénitale ou acquise
Allongé	Normal	Héparine	
Allongé	Légèrement allongé	Héparine et une certaine hypo- ou dysfibrinogénémie	De rares cas de dysfibrinogé-némie peuvent donner ce résultat
Allongé	Également allongé	Coagulation intravasculaire disséminée (CIVD)	Mesurer les D-dimères
Allongé	Normal	Inhibiteurs directs de la thrombine	

**Remarque :** des réactifs pour le temps 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 l'un de ces produits est utilisé, suivre les instructions du fabricant. Comme la reptilase est un réactif coûteux, il est possible de faire appel à la méthode de neutralisation de la protamine/temps de thrombine pour confirmer la présence d'héparine dans l'échantillon à tester.

**Fibrinogène (dosage de Clauss modifié) :** des dilutions d'un plasma normal de référence dont la teneur en fibrinogène est connue sont préparées avec une solution tampon glyoxaline. 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 de référence.

**Réactifs :**

- ✓ Plasma de référence dont la concentration en fibrinogène est connue
- ✓ Concentration élevée de thrombine de 100 à 200 U/ml (la concentration peut varier en fonction de la source)
- ✓ Tampon imidazole (glyoxaline) ou tampon d'Owren pH 7,35

**Méthode :** la technique d'inclinaison manuelle du tube est décrite dans la partie 4 de ce manuel. Il convient de suivre les recommandations du fabricant du réactif.

Ce test n'est pas affecté par l'héparine aux doses utilisées dans le traitement de la thrombo-embolie veineuse. L'utilisation d'une concentration plus élevée de thrombine est censée neutraliser l'effet de fortes concentrations de HNF sur la thrombine, telles que celles appliquées dans le pontage cardiopulmonaire permettant la formation de caillots. Il convient cependant de faire preuve de prudence lors de l'interprétation des résultats chez ces patients, car des temps de coagulation allongés peuvent être observés, ce qui entraîne une sous-estimation du taux de fibrinogène, à moins que le réactif ne contienne des agents neutralisant l'héparine. L'effet des IDT dépendra fortement de leur concentration dans le plasma

du patient et du type de réactifs utilisés. Les IDT dans la plage thérapeutique n'affectent pas la thrombine à forte concentration utilisée dans le dosage de Clauss (Mackie et al., 2024).

#### Données d'étalonnage types :

(Remarque : une courbe d'étalonnage doit être établie avec les réactifs utilisés en local.)

Plasma de référence : fibrinogène 2,1 g/l

**Tableau 11.** Exemple d'étalonnage du fibrinogène

Dilution de l'étalon	Concentration de fibrinogène (g/l)	Temps de coagulation (s)
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  $\times$  5/10 (puisque dilution 1/5 au lieu de 1/10)

= 0,9 g/l

**Remarques sur le dosage de Clauss :** le taux de fibrinogène peut être sous-estimé en présence de concentrations élevées de fibrine/produits de dégradation du fibrinogène. Il est donc conseillé de soigneusement interpréter les résultats en cas de suspicion. Il y a lieu d'éviter le prélèvement d'échantillons de sang de coagulation à partir de dispositifs veineux ou artériels contaminés par l'héparine afin d'exclure toute possibilité d'interférence de l'héparine dans les résultats obtenus. Les échantillons provenant de patients recevant des doses élevées d'HNF doivent être évités lors de la quantification des taux de fibrinogène afin d'éviter l'obtention de résultats faussement faibles.

**Test de fibrinogène dérivé du TP :** un certain nombre d'analyseurs de coagulation peuvent estimer le taux de fibrinogène lors de la détermination du temps de prothrombine. Cela est possible puisque la pente de la diffusion ou de la transmission de la lumière lors de la formation d'un caillot est proportionnelle à la concentration initiale de fibrinogène. Ces méthodes sont couramment appelées « fibrinogène dérivé du temps de prothrombine », et la plupart 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 élevés (plus de 5 g/l). Les résultats sont généralement normaux en présence de dysfibrinogénémie (Mackie et al., 2024 ; Miesbach et al., 2010). Il existe des méthodes de 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).

**Facteurs qui affectent l'utilisation du fibrinogène dérivé du TP :** pour les patients sous anticoagulothérapie, il est conseillé de ne pas utiliser l'estimation du fibrinogène dérivé du TP pour quantifier les taux de fibrinogène. Certains anticoagulants oraux affectent la production de thrombine, en réduisant en fin de compte la production et provoquant la formation de fibrilles épaisses détectées comme une turbidité dans l'échantillon par les capteurs optiques et relayées comme une augmentation du fibrinogène (Chitolie et al., 1994). Il y a eu des cas de patients atteints d'hypodysfibrinogénémie identifiés comme ayant un

fibrinogène dérivé du TP normal alors que ces taux étaient en fait faibles lorsqu'ils étaient mesurés selon la méthode de Clauss (Chitolie et al., 1994). La turbidité du plasma de référence conduit à des estimations plus élevées des taux de fibrinogène. En outre, le plasma lipémique et trouble d'un patient peut conduire à une estimation élevée erronée du fibrinogène. Ces taux inexacts peuvent être observés en cas de maladies sévères chroniques. Sur la base des lignes directrices internationales en vigueur pour la quantification du fibrinogène, la méthode de Clauss est recommandée. De plus, en raison des inexactitudes associées au fibrinogène dérivé du TP, il ne faut pas l'utiliser pour le dépistage des déficits en fibrinogène, ni chez les patients dont on sait qu'ils sont sous anticoagulothérapie, et les résultats doivent être interprétés avec beaucoup de vigilance.

**Élimination de l'héparine du plasma :** l'héparinase 1 (le composant actif d'Hepzyme®) est spécifique de l'héparine, dont elle clive les molécules en plusieurs endroits, ce qui produit des oligosaccharides qui ont perdu leurs propriétés antithrombotiques. Hepzyme® est une héparinase 1 bactérienne purifiée, produite dans *Flavobacterium heparinum*. Elle peut éliminer jusqu'à 2 UI d'héparine par millilitre présent dans le plasma. Hepzyme® peut servir à neutraliser l'effet de l'héparine dans un échantillon, de sorte que la coagulation de base puisse être évaluée. On y a en particulier recours dans les cas de contamination à l'héparine (Forte et Abshire, 2000).

#### Réactifs :

- ✓ Hepzyme®, un flacon contenant une préparation sèche d'héparinase 1 avec stabilisants
- ✓ Fabricant : Dade Behring
- ✓ Conservation : 4 °C
- ✓ Stabilité : voir la date de péremption du fabricant. Chaque flacon ne peut être utilisé que pour un seul patient.

#### Méthode :

- ✓ Ajouter 1,0 ml de plasma citraté pauvre en plaquettes dans un flacon d'Hepzyme®.
- ✓ Reboucher et retourner délicatement 5 à 10 reprises.
- ✓ Laisser à température ambiante pendant 15 minutes.
- ✓ Transférer dans un récipient en plastique de 2 ml et attendre quelques instants que les bulles disparaissent.
- ✓ Placer sur l'appareil CA1500 et procéder à l'analyse.

Le temps de thrombine doit être inclus pour confirmer que l'héparine a intégralement été éliminée. Les analyses doivent être pratiquées dès que possible (c'est-à-dire conformément aux lignes directrices pour cette procédure).

**Interprétation :** cette 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 dans le TCA, le temps de thrombine ou le TP après le traitement par Hepzyme® indique la présence d'héparine. L'héparine non fractionnée et l'héparine de bas poids moléculaire sont toutes deux dégradées par cette enzyme.

## Références

- Adcock DM, Gosselin RC. The danger of relying on the APTT and PT in patients on DOAC therapy, a potential patient safety issue. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 37-40.
- Adcock DM, Moore GW, Montalvão SL, Kershaw G, Gosselin RC. Activated partial thromboplastin time and prothrombin time mixing studies: Current state of the art. *Semin Thromb Hemost* 2023; 49(6): 571-579.
- Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: Implications for decentralized anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haematol* 1997; 96(3): 431-434.
- Bonar RA, Lippi G, Favaloro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. In: Favaloro EJ, Lippi G, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2017: 3-27.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inaccuracy of the 'derived' fibrinogen measurement. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5(6): 955-957.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. One-stage prothrombin time (PT) test and activated partial thromboplastin time (APTT) test, 3rd edition. CLSI standard H47. 2023. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h47>.
- Dorgalaleh A, Favaloro EJ, Bahraini M, Rad F. Standardization of prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR). *Int J Lab Hematol* 2021; 43(1): 21-28.
- Favaloro EJ. Coagulation mixing studies: Utility, algorithmic strategies and limitations for lupus anticoagulant testing or follow up of abnormal coagulation tests. *Am J Hematol* 2020; 95(1): 117-128.
- Favaloro EJ. Optimizing the verification of mean normal prothrombin time (MNPT) and international sensitivity index (ISI) for accurate conversion of prothrombin time (PT) to international normalized ratio (INR). *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 59-74.
- Forte K, Abshire T. The use of hezyme in removing heparin from blood samples drawn from central venous access devices. *J Pediatr Oncol Nurs* 2000; 17(3): 179-181.
- Fritsma GA. Antithrombotic Therapies and Their Laboratory Assessment. In: *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. 2019: 746-764.
- Hogwood J, Mulloy B, Gray E. Precipitation and neutralization of heparin from different sources by protamine sulfate. *Pharmaceuticals (Basel)* 2017; 10(3): 59.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 15189:2022(en) Medical laboratories — Requirements for quality and competence. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-4:v1:en>. Accessed March 23, 2025.
- Jennings I, Kitchen DP, Woods T, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: Data from UK National External Quality Assessment Scheme surveys. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20(5): 388-390.
- Karapetian H. Reptilase time (RT). *Methods Mol Biol* 2013; 992: 273-277.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of seven APTT reagents in relation to heparin sensitivity. *Br J Haematol* 1999; 106(3): 801-808.
- Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68(3): 301-305.
- Lowe A, Kitchen S, Jennings I, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Effects of emicizumab on APTT, FVIII assays and FVIII inhibitor assays using different reagents: Results of a UK NEQAS proficiency testing exercise. *Haemophilia* 2020; 26(6): 1087-1091.

- Mackie I, Casini A, Pieters M, Pruthi R, Reilly-Stitt C, Suzuki A. International Council for Standardisation in Haematology recommendations on fibrinogen assays, thrombin clotting time and related tests in the investigation of bleeding disorders. *Int J Lab Hematol* 2024; 46(1): 20-32.
- Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121(3): 396-404.
- Maier CL, Sniecinski RM. Anticoagulation monitoring for perioperative physicians. *Anesthesiology* 2021; 135(4): 738-748.
- Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52(2): 210-211.
- Miesbach W, Schenk J, Alesci S, Lindhoff-Last E. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia. *Thromb Res* 2010; 126(6): e428-433.
- Miller CH. Laboratory testing for factor VIII and IX inhibitors in haemophilia: A review. *Haemophilia* 2018; 24(2): 186-197.
- Pipe SW. Functional roles of the factor VIII b domain. *Haemophilia* 2009; 15(6): 1187-1196.
- Practical-Haemostasis.com. Protamine sulphate neutralization test. <https://practical-haemostasis.com/>. Accessed March 23, 2025.
- Rodgers RPC, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 499-516.
- Rousseau AP, Vall H, Manna B. Bleeding Time. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK537233/>. Accessed March 23, 2025.
- Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F, Appert-Flory A. In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 389-396.
- Undas A. The bleeding time test in 2024: A glorious past and current challenges. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 517-519.
- Vandiver JW, Vondracek TG. Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for monitoring unfractionated heparin. *Pharmacotherapy* 2012; 32(6): 546-558.
- Vinholt PJ. The role of platelets in bleeding in patients with thrombocytopenia and hematological disease. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1808-1817.
- Williams B, Lin Z, Pittet JF, Chao W. Sepsis-induced coagulopathy: a comprehensive narrative review of pathophysiology, clinical presentation, diagnosis, and management strategies. *Anesth Analg* 2024; 138(4): 696-711.