

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Dosages de l'activité de liaison du facteur Willebrand aux plaquettes - Nitty S. Mathews
- ✓ Antigène du facteur Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Dosage de la liaison du facteur Willebrand au collagène - Tulasi Geevar
- ✓ Dosage de la liaison au facteur VIII - Tulasi Geevar
- ✓ Multimères du facteur Willebrand - Annette Bowyer
- ✓ Interprétation des tests du facteur Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Variables préanalytiques dans le diagnostic de la maladie de Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Tests à disposition pour le diagnostic de la maladie de Willebrand - Tulasi Geevar
- ✓ Diagnostic de la maladie de Willebrand dans les contextes pauvres en ressources - Tulasi Geevar

Dosages de l'activité de liaison du facteur Willebrand aux plaquettes (dosages de l'activité du facteur Willebrand) : l'ensemble des lignes directrices utilisant le rapport VWF:RCo/VWF:Ag pour déterminer si le patient a une mW de type 1 (quantitative) ou de type 2 (qualitative), le rôle de l'activité de liaison du FW à la glycoprotéine Ib (GPIb) est de la plus haute importance dans la classification de la mW. Un panel de lignes directrices multidisciplinaires, établi par l'*American Society of Hematology* (ASH), la Société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH), la *National Hemophilia Foundation* (NHF, désormais *National Bleeding Disorders Foundation* [NBDF]) et la FMH, suggère des dosages plus récents qui mesurent l'activité de liaison du FW aux plaquettes (par exemple FW:GP1bM et VWF:GP1bR) plutôt que le dosage conventionnel du cofacteur de la ristocétine du FW (VWF:RCo) [recommandation 4] (James et al., 2021). Le panel a jugé que les bénéfices des dosages plus récents étaient modérés, reflétant le CV plus faible et la reproductibilité plus élevée en comparaison du VWF:RCo. Le dosage VWF:GP1bR nécessite la présence de ristocétine ajoutée et peut donc être faire face aux mêmes problèmes que le dosage VWF:RCo en ce qui concerne les polymorphismes de liaison à la ristocétine. Il utilise pourtant un fragment de GP1b recombinante au lieu de plaquettes. En revanche, le dosage VWF:GPIbM utilise une molécule GPIb α recombinante qui comporte plusieurs mutations de gain de fonction ; par conséquent, ce variant GP1b se lie au domaine A1 du FW même en l'absence de ristocétine (Laffan et al., 2014). Dans une étude d'assurance externe de la qualité menée en 2022 par le *College of American Pathologists* sur le programme d'essais d'aptitude du FW (Salazar et al., 2022), le CV global pour le VWF:RCo variait de 14,6 à 23,5 % pour les résultats sur des échantillons normaux et de 24,3 à 44,8 % pour les résultats sur des échantillons à faible activité. Les CV étaient inférieurs pour VWF:GP1bM et VWF:Ab, allant de 8,0 à 34,8 %, incluant à la fois des échantillons normaux et anormaux. Une étude comparant différents dosages d'activité de liaison VWF:GP1b a rapporté que la sensibilité et la spécificité pour différencier le type 1 et le type 2 de la mW, sur la base des rapports activité/antigène en utilisant un seuil de 0,7, étaient de 92 % et 72,4 % pour VWF:RCo, de 84 % et 89,7 % pour GP1bR, et de 92 % et 85,1 % pour GP1bM (Vangenechten et al., 2018).

Tableau 23. Synthèse des dosages automatisés de l'activité du FW disponibles dans le commerce

Activité du FW – nomenclature ISTH	Principe	Dosages	Méthode de détection
VWF:RCo	Agrégation de plaquettes lyophilisées induite par la ristocétine	1. Réactif FW Siemens BC (Siemens, Marbourg, Allemagne) 2. STA-VWF:Rco (Diagnostica Stago, France)	Agglutination de plaquettes lyophilisées
VWF:GP1bR	Liaison induite par la ristocétine du FW à un fragment GPIb recombinant	1. Activité cofacteur de la ristocétine du FW HemosIL 2. Activité cofacteur de la ristocétine du FW HemosIL AcuStar (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, États-Unis)	1. Agglutination de billes de latex 2. Chimiluminescence
VWF:GP1bM	Liaison du FW à un fragment GPIb mutant à gain de fonction sans ristocétine	Siemens INNOVANCE VWF Ac (Siemens, Marbourg, Allemagne)	Agglutination de billes de latex
VWF:Ab	Liaison d'un anticorps monoclonal à un épitope du domaine A1 du FW (site de liaison plaquettaire)	Activité du FW HemosIL (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, États-Unis)	Agglutination de billes de latex

Avertissement d'ordre général : les kits de réactifs/protocoles énumérés ci-dessous ont été validés sur un ou plusieurs analyseurs de coagulation par le fabricant pour optimiser les performances et répondre aux spécifications du produit. Les modifications définies par l'utilisateur peuvent ne pas être prises en charge, car elles sont susceptibles d'affecter les performances du système et les résultats du dosage. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de valider les modifications apportées à ces instructions ou à l'utilisation des réactifs sur des analyseurs autres que ceux inclus dans les fiches d'application ou le mode d'emploi spécifiques du fabricant.

Dosages automatisés de l'activité du FW

Dosage du cofacteur de la ristocétine du FW (VWF:RCo) : des dilutions d'un étalon (dont la valeur du cofacteur de la ristocétine est connue) sont réalisées et mélangées avec des plaquettes lyophilisées, de sorte qu'une quantité connue de cofacteur est ajoutée aux plaquettes. L'agrégation induite par la ristocétine est ensuite mesurée et une courbe standard est tracée. Les échantillons à tester sont traités de manière similaire et la valeur du cofacteur de la ristocétine est calculée à partir du graphique standard. Échantillon primaire : plasma citraté.

Réactifs :

- ✓ Plaquettes fixées lyophilisées (réactif BC von Willebrand⁵, Siemens Healthcare Diagnostics, Marbourg, Allemagne)
- ✓ Solution saline normale
- ✓ Plasma étalon
- ✓ Plasma du patient et plasmas de contrôle (contrôle normal [par exemple N] et un contrôle anormal de bas niveau [par exemple P])
- ✓ Réactif ristocétine (par exemple Revohem, 25 mg/ml ; reconstituer avec 0,625 ml d'eau distillée et bien mélanger)
- ✓ Eau distillée

Préparation du réactif :

- ✓ Commencer par reconstituer le réactif Willebrand avec 4 ml d'eau distillée et diluer avec 7 ml de solution saline. Vérifier la numération plaquettaire ; elle doit être comprise entre ~2 000 000 et 2 050 000/mm³. Ajouter 50,0 µl de réactif ristocétine pour 950 µl de plaquettes.
- ✓ Reconstituer le plasma étalon avec exactement 1 ml d'eau distillée. Laisser le matériau reconstitué reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 30 minutes. Ensuite, faire doucement tourner le flacon avant utilisation. Le matériau est stable pendant huit heures à 15-25 °C. Il peut être congelé et conservé à -80 °C au minimum.
- ✓ Plasma de contrôle anormal (P). Reconstituer le plasma de contrôle P avec exactement 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Agiter soigneusement pour dissoudre sans formation de mousse et laisser reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 15 minutes. Avant utilisation, agiter à nouveau avec précaution.
- ✓ Contrôle normal (N). Reconstituer le plasma de contrôle N avec exactement 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Agiter soigneusement pour dissoudre sans formation de mousse et laisser reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 30 minutes. Avant utilisation, agiter à nouveau avec précaution.

Procédure :

- ✓ Les réactifs nécessaires (plaquettes lyophilisées avec ristocétine), la solution saline normale et l'étalon sont chargés sur l'analyseur de coagulation.
- ✓ La courbe standard est exécutée.
- ✓ Une fois l'étalonnage terminé, la courbe d'étalonnage doit être examinée et validée. La courbe validée est la courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination des résultats.
- ✓ Analyser l'échantillon à tester.

Protocole de CQ :

Analyser le contrôle normal (N) et le contrôle anormal de bas niveau (P).

Remarque : les contrôles et le plasma étalon doivent être achetés séparément.

Interférence possible :

- ✓ Les plaquettes ne sont pas correctement diluées.
- ✓ La concentration de ristocétine est modifiée.

Interprétation des résultats :

Les résultats sont indiqués en pourcentage.

Valeurs attendues (évaluation sur le système BCS ; Siemens, Marbourg, Allemagne) :

Groupe sanguin	% de normalité
Tous (n = 185)	58–172
O	49–142
A+B+AB	66–183

Dosage VWF:GPIbR (activité cofacteur de la ristocétine du FW HemosIL® AcuStar® ; Instrumentation Laboratory, MA, États-Unis) : il s'agit d'un immunodosage en deux temps quantifiant l'activité du VWF:RCo dans du plasma citraté humain, qui fait appel à des particules magnétiques comme phase solide et à un système de détection par chimiluminescence. Dans un premier temps, l'échantillon est mélangé avec le

tampon contenant de la ristocétine et des particules magnétiques enrobées d'un fragment recombinant du récepteur plaquettaire de la glycoprotéine du FW (rGPIIb α) au moyen d'un anticorps monoclonal spécifique, qui orientent le fragment de GPIIb α de manière appropriée pour interagir avec le FW de l'échantillon du patient en présence de ristocétine. Le FW présent dans l'échantillon se lie aux particules magnétiques proportionnellement à son activité cofacteur de la ristocétine. Après séparation magnétique et lavage, un anticorps monoclonal anti-FW marqué à l'isoluminol est ajouté et incubé dans un second temps. Après une nouvelle séparation magnétique et un lavage, deux déclencheurs sont ajoutés. Une réaction de chimiluminescence a lieu et est mesurée par le système optique ACL AcuStar. Le résultat est exprimé en unités de lumière relative (RLU) et proportionnel à la concentration de l'activité VWF:RCo dans l'échantillon.

Échantillon primaire : plasma citraté.

Réactifs (composition du kit) :

- ✓ Cartouche VWF:RCo pour 25 déterminations

Chaque cartouche contient un flacon d'une suspension de particules magnétiques enrobées d'une rGPIIb α au moyen d'un anticorps monoclonal de souris spécifique, un flacon de tampon contenant du sulfate de ristocétine, un flacon d'un traceur contenant un anticorps monoclonal de souris anti-FW marqué à l'isoluminol et un flacon de diluant de l'échantillon. Les réactifs sont dans un tampon citrate ou HEPES contenant de la BSA, de l'IgG de souris, des stabilisants et un conservateur.

- ✓ Étalon 1 VWF:RCo : solution saline HEPES contenant de la BSA, de l'IgG de souris, des stabilisants et des conservateurs.
- ✓ Étalon 2 VWF:RCo : plasma humain lyophilisé contenant un tampon, des stabilisants et des conservateurs.

Préparation/procédure :

- ✓ Retourner délicatement la cartouche à 30 reprises en évitant la formation de mousse.
- ✓ Après la remise en suspension complète des microparticules, placer la cartouche sur une surface solide et retirer délicatement la languette d'expédition de la cartouche.
- ✓ Appuyer sur les deux languettes sur les côtés du capuchon de perforation (couleur grise) et appliquer une pression sur la partie supérieure de la cartouche jusqu'à ce qu'elle se verrouille.
- ✓ Une fois que la cartouche est stable, la charger sur l'instrument.
- ✓ Les flacons d'étalons dilués sont transférés dans les tubes à code-barres en plastique respectifs et chargés dans l'analyseur (ACL AcuStar).
- ✓ La courbe standard est exécutée.
- ✓ Une fois l'étalonnage terminé, la courbe d'étalonnage doit être examinée et validée. La courbe validée est la courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination des résultats.
- ✓ Analyser l'échantillon à tester.

Contrôle qualité :

- ✓ Contrôles (deux niveaux) recommandés (se les procurer à part).
- ✓ Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et son écart type.

Traçabilité des étalons et des contrôles :

Les valeurs rapportées ont été déterminées au cours de plusieurs cycles sur le système ACL AcuStar, à l'aide de lots spécifiques de réactifs et par rapport à un standard interne, dont la valeur a été attribuée par rapport au matériau de référence international actuel pour le facteur Willebrand et le facteur VIII.

Résultats :

Les résultats de VWF:RCo sont rapportés en pourcentage, ce qui équivaut à UI/dl.

Tableau 24. Valeurs attendues pour VWF:RCo

Type ABO	Nombre d'échantillons analysés	VWF:RCo HemosIL AcuStar (VWF:GP1bR)
Tous	287	45,6–176,3 %
O	163	43,8–161,5 %
A+B+AB	124	53,8–210,8 %

Remarque : il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages VWF:RCo normales en fonction de la population concernée et de la technique, de la méthode et de l'équipement utilisés. Linéarité : 0,5 à 200,0 %. Limite de détection : 0,17 %.

Dosage VWF:GPIbM (Innovance®VWF Ac ; Siemens Healthcare Diagnostics, Marbourg, Allemagne) : le principe du dosage fait appel à la liaison du FW à son récepteur GPIb. Les particules de polystyrène sont enrobées d'un anticorps anti-GPIb. Une GPIb recombinante (deux mutations de gain de fonction incluses) est ajoutée et se lie à l'anticorps ainsi qu'au FW de l'échantillon. En raison des mutations de gain de fonction, la liaison du FW à la GPIb ne nécessite pas de ristocétine. Cette liaison induit une agglutination des particules dont le degré d'augmentation de l'extinction peut faire l'objet d'une mesure par turbidimétrie.

Échantillon primaire : plasma citraté.

Tableau 25. Réactifs (composition du kit) Innovance® VWF Ac

Innovance® VWF Ac	Ingrédients	Concentration	Source
RÉACTIF I	Tampon, saccharose, particules de polystyrène enrobées d'anticorps monoclonaux anti-GPIb, amphotéricine B, gentamicine	2,2 g/l	Souris
RÉACTIF II	Solution saline tamponnée, réactif bloquant hétérophile, détergent, polyvinylpyrrolidone, azoture de sodium	< 1 g/l	
RÉACTIF III	Solution saline tamponnée, GPIb recombinante, amphotéricine B, gentamicine	≤ 80 mg/l	

Préparation/procédure :

- ✓ Les réactifs (RI, RII et RIII), le tampon imidazole et l'étalon sont chargés dans l'analyseur.
- ✓ La courbe standard est exécutée.
- ✓ Une fois l'étalonnage terminé, la courbe d'étalonnage doit être examinée et validée. La courbe validée est la courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination des résultats.
- ✓ Analyser l'échantillon à tester.

Étalonnage : une courbe standard est générée par détermination automatique de différentes dilutions de plasma humain standard et du tampon véronal d'Owren. Elle doit être régénérée s'il y a un changement dans l'instrument ou dans le lot d'Innovance® VWF Ac utilisé, ou si les résultats de contrôle sont hors de la plage acceptable. L'étalonnage du dosage est effectué avec du plasma humain standard calibré par rapport à la valeur VWF:RCo de l'étalon international pour le facteur VIII et le facteur Willebrand de coagulation sanguine dans le plasma.

Les échantillons initialement au-dessus de la plage d'étalonnage sont dilués par l'instrument, ce qui donne une plage de mesure allant jusqu'à 600 % de la normale.

Contrôle qualité :

- ✓ Les contrôles (deux niveaux) doivent être achetés séparément
- ✓ Plage normale : plasma de contrôle N
- ✓ Plage pathologique : plasma de contrôle P

Résultats :

- ✓ Les résultats sont rapportés en pourcentage de normalité
- ✓ 100 % = 1 UI/ml

Valeurs attendues : les échantillons de plasma frais provenant de personnes donneuses apparemment saines ont été analysés à l'aide du dosage Innovance® VWF Ac sur le système BCS®/BCS® XP avec des résultats (du 2,5^e au 97,5^e percentile) indiqués au tableau 26.

Tableau 26. Valeurs attendues pour le dosage Innovance® VWF Ac

Groupe sanguin	Nombre d'échantillons analysés	% de normalité
Tous	263	47,8–173,2
O	129	46,3–145,6
A+B+AB	134	61,4–179,1

Remarque : il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages VWF:RCo normales en fonction de la population concernée et de la technique, de la méthode et de l'équipement utilisés.

Linéarité : 4 à 150 %

Limite de détection : 2,2 %

Dosage VWF:Ab (activité du FW HemosIL®, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, États-Unis) : le kit d'activité du FW est un dosage immunoturbidimétrique renforcé par des particules de latex pour quantifier l'activité du FW dans le plasma. Pour cela, est mesurée l'augmentation de la turbidité produite par l'agglutination du réactif au latex. Un anticorps monoclonal anti-FW spécifique adsorbé sur le réactif au latex, dirigé contre le site de liaison plaquettaire du FW (récepteur GPIb), réagit avec le FW du plasma du patient. Le degré d'agglutination est directement proportionnel à l'activité du FW dans l'échantillon et déterminé en mesurant la diminution de la lumière transmise causée par les agrégats.

Échantillon primaire : plasma citraté.

Réactifs (composition du kit) :

- ✓ Réactif au latex : une suspension lyophilisée de particules de latex de polystyrène enrobées d'un anticorps monoclonal de souris anti-FW purifié, dirigé contre un épitope fonctionnel du FW, contenant de l'albumine de sérum bovin, des stabilisants et un conservateur.
- ✓ Tampon : tampon Tris contenant de l'albumine de sérum bovin, des stabilisants et un conservateur.

Préparation :

- ✓ Tampon : prêt à l'emploi
- ✓ Réactif au latex : dissoudre le contenu de chaque flacon en versant la totalité du contenu d'un flacon de tampon dans un flacon de réactif au latex. Remettre le bouchon en place et faire doucement tourner pendant au moins 20 secondes pour dissoudre complètement le latex lyophilisé. S'assurer de la reconstitution complète du produit. Il doit se présenter sous la forme d'une suspension homogène et légèrement laiteuse. Conserver le réactif à une température comprise entre 15

et 25 °C pendant 30 minutes et le retourner pour le mélanger avant utilisation. Ne pas agiter.
Remarque : éviter la formation de mousse lors de l'homogénéisation des réactifs reconstitués.
Des bulles sur le dessus des liquides peuvent interférer avec les capteurs de l'instrument.

Contrôle qualité : du plasma étalon et des contrôles normaux et anormaux (à acheter séparément) sont recommandés pour un programme de contrôle qualité complet. Le contrôle normal et le contrôle d'essai spécial niveau 1 sont conçus pour ce programme. Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et son écart type.

Résultats : les résultats de l'activité du FW sont rapportés en pourcentage de normalité.

Tableau 27. Valeurs attendues pour l'activité du FW selon le dosage VWF:Ab HemosIL®

Groupe sanguin	Nombre d'échantillons analysés	% d'activité du FW
O	132	40,3–125,9
A+B+AB	134	48,8–163,4

Remarque : en raison de nombreuses variables, qui peuvent affecter les résultats, chaque laboratoire doit établir sa propre plage normale pour l'activité du FW.

- ✓ Linéarité : 19-130 %
- ✓ Limite de détection : 3,2 %

Antigène du facteur Willebrand (VWF:Ag) : il s'agit d'un dosage quantitatif qui mesure la quantité totale de protéine FW présente dans l'échantillon, ce qui englobe les formes à la fois fonctionnelles et dysfonctionnelles. Les taux de VWF:Ag peuvent être quantifiés par des méthodes immunologiques telles qu'ELISA, LIA (automatisée au latex) et, plus récemment, CLIA (chimiluminescence). Les dosages sont généralement très fiables et reproductibles. La limite inférieure de détection varie d'une méthode à l'autre, la LIA ayant tendance à être légèrement plus élevée et la CLIA ayant la limite de détection la plus basse. Le dosage VWF:Ag est essentiel dans le diagnostic de la maladie de Willebrand, mais il comporte des limites puisqu'il évalue uniquement la présence de FW, et non sa fonction. Utilisé seul, le VWF:Ag peut seulement identifier la mW de type 3 lorsqu'il existe des taux indétectables de VWF:Ag, généralement inférieurs à 3 UI/dl. Selon les lignes directrices de la *British Society for Haematology* (BSH) et de la *United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation* (UKHCDO), le diagnostic de la mW de type 3 nécessite un dosage VWF:Ag capable de mesurer des taux < 1 UI/dl. Des dosages supplémentaires de la fonction ou de l'activité du FW avec calcul des rapports entre l'activité du FW et les dosages antigéniques sont requis pour le diagnostic et la différenciation de la mW de type 1 et de type 2. La plage normale de la valeur de VWF:Ag varie selon les laboratoires, mais il est généralement admis qu'elle se situe entre 50 et 200 UI/dl. Les taux inférieurs à 50 UI/dl sont considérés comme faibles, bien que cela doive être corrélé avec les antécédents hémorragiques et d'autres dosages de l'activité du FW pour établir un diagnostic de mW. Il est bien connu que les personnes du groupe sanguin O présentent une baisse de 25 % des taux de FW par rapport aux personnes des autres groupes et sont donc plus susceptibles d'être diagnostiquées avec la mW de type 1. Le phénotype hémorragique des personnes atteintes de mW est cependant similaire, quel que soit le groupe sanguin. Il n'est donc pas nécessaire de disposer de plages de référence spécifiques aux groupes sanguins. Les protocoles pour le dosage VWF:Ag par ELISA, LIA et CLIA est répertorié ci-dessous.

Antigène du facteur Willebrand (VWF:Ag) par ELISA : dosage ELISA pour la détermination quantitative de l'antigène du FW (VWF:Ag) dans le plasma citraté humain. Un puits de microtitration est recouvert d'un anticorps (anticorps de capture) spécifique du FW. Des dilutions du plasma à tester et du plasma de référence sont ajoutées et incubées, période pendant laquelle le FW est lié par l'anticorps de capture sur la plaque. Après lavage, une deuxième enzyme étiquetée anticorps anti-FW (anticorps de détection) est ajoutée et se lie au FW lié à la plaque. La quantité d'anticorps lié, et donc de FW présent dans

l'échantillon, est quantifiée par l'ajout de substrat enzymatique suivi du développement de la couleur.
Échantillon primaire : sang citaté à 3,2 %.

Matériel et réactifs :

- ✓ Plaque de microtitration
- ✓ Anticorps de capture (coating) : anticorps polyclonal de lapin anti-FW humain (Dako, code n° 0082)
- ✓ Anticorps de détection (marqué) : anticorps polyclonal de lapin anti-FW humain/conjugué avec du HRP (Dako, code n° 226)
- ✓ Tampon de coating bicarbonate
- ✓ Tampon de dilution
- ✓ Tampon de lavage
- ✓ Tampon de substrat
- ✓ Substrat : dichlorhydrate d'o-phénylènediamine (OPD) (Sigma P8287)
- ✓ H_2SO_4 1,5 M
- ✓ Étalon : PNP ou plasma standard du commerce
- ✓ PPP du patient citaté
- ✓ Plasma de contrôle normal et anormal
- ✓ Peroxyde d'hydrogène à 30 %
- ✓ Laveur et lecteur de plaques ELISA
- ✓ Pipettes et embouts
- ✓ Bain-marie à 37 °C
- ✓ Dispositifs de scellage des plaques
- ✓ Agitateur-mélangeur vortex

Préparation du réactif :

Tampon de coating bicarbonate :

- a. Carbonate de sodium (Na_2CO_3) : 0,16 g
- b. Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) : 0,294 g
- c. Dissoudre dans de l'eau distillée et compléter jusqu'à 100 ml. Ajuster le pH à 9,6.
- d. Ajouter environ 100 µl de colorant rouge. La durée de conservation est de deux à trois semaines.

Tampon de travail concentré :

- a. Dihydrogéo-orthophosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : 0,975 g
- b. Hydrogéo-orthophosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) : 6,7 g
- c. Chlorure de sodium (NaCl) : 70,55 g

Dissoudre dans de l'eau distillée, bien mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique dans une fiole conique à fond plat, puis compléter jusqu'à 250 ml.

Tampon de lavage : diluer le tampon de travail concentré à 1/10 (c.-à-d. 100 ml de tampon concentré pour 900 ml d'eau distillée). Ajouter 2 ml de Tween 20. Bien mélanger et conserver à 4 °C. La durée de conservation est de deux semaines.

Tampon de détection et de dilution : dissoudre 3 g de PEG dans 100 ml de tampon de lavage à haute teneur en sel. Ajouter 100 µl de colorant vert. La durée de conservation est de deux semaines.

Tampon de substrat : dissoudre 0,73 g d'acide citrique et 2,4 g d'hydrogéo-orthophosphate disodique dans de l'eau distillée et porter le volume à 100 ml. Ajuster le pH à 5,0. La durée de conservation est de deux mois.

Acide sulfurique 1,5 M : ajouter 16,5 ml d'acide sulfurique concentré à 180 ml d'eau. Toujours ajouter de l'acide à l'eau.

Procédure :

Coating de la plaque : Les plaques doivent être enduites la veille de leur utilisation, à savoir entre 16 et 96 heures. Diluer l'anticorps de coating à 1/1000 dans du tampon de coating, soit 12 µl dans 12 ml de tampon. Mélanger délicatement et pipeter 100 µl dans chaque puits. Sceller avec un couvercle en plastique et incuber à 40 °C pendant la nuit.

Procédures analytiques : préparer les dilutions pour la courbe standard comme indiqué :

- ✓ Pour la solution mère : diluer 50 µl du plasma normal poolé dans 3,95 ml de tampon de dilution (1,80). Préparer un éventail d'étalons à partir de cette solution, comme indiqué ci-dessous :
 - a. Solution mère 125 % (S1)
 - b. 0,8 ml de solution mère + 0,2 ml de tampon 100 % (S2)
 - c. 0,6 ml de solution mère + 0,4 ml de tampon 75 % (S3)
 - d. 0,4 ml de solution mère + 0,6 ml de tampon 50 % (S4)
 - e. 0,2 ml de solution mère + 0,8 ml de tampon 25 % (S5)
 - f. 0,1 ml de solution mère + 0,9 ml de tampon 12,5 % (S6)
 - g. solution à 0,05 % + 0,95 ml de tampon 6,25 % (S7)
 - h. 1,00 ml de blanc tampon
- ✓ Diluer les échantillons du patient et de contrôle en deux dilutions, 1/100 et 1/200, dans du tampon de dilution (c'est-à-dire 10 µl dans 990 µl et 500 µl de dilution 1/100 + 500 µl de tampon).
- ✓ Laver à trois reprises avec un tampon de lavage à l'aide du laveur de plaques, en laissant tremper trois minutes entre chaque lavage. Après l'aspiration finale, prélever l'excès de liquide et vérifier qu'il n'y a pas de bulles.
- ✓ Ajouter 100 µl des étalons, tests et blancs, en double, dans les puits de la plaque coatée, selon le format suivant :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
B	S2	S2	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
C	S3	S3	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
D	S4	S4	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
E	S5	S5	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
F	S6	S6	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
G	S7	S7	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2
H	BK	BK	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2

S1-S7 : dilutions de l'étalon ; T : plasma à tester ; BK : blanc

- ✓ Couvrir avec le dispositif de scellage de plaques. Incuber pendant une heure dans un bain-marie à 37 °C.
- ✓ Laver à trois reprises avec un tampon de lavage à l'aide du laveur de plaques, en laissant tremper trois minutes entre chaque lavage. Après l'aspiration finale, prélever l'excès de liquide et vérifier qu'il n'y a pas de bulles.
- ✓ Diluer l'anticorps de détection (marqué) du FW à 1/4000 (c.-à-d. 5 µl dans 20 ml de tampon de détection).

- ✓ Mélanger délicatement et ajouter 100 µl d'anticorps de détection dilué dans chaque puits. Couvrir avec le dispositif de scellage de plaques. Incuber pendant une heure dans un bain-marie à 37 °C.
- ✓ Laver à trois reprises avec un tampon de lavage à l'aide du laveur de plaques, en laissant tremper trois minutes entre chaque lavage. Après l'aspiration finale, prélever l'excès de liquide et vérifier qu'il n'y a pas de bulles.
- ✓ Pendant le lavage, préparer la solution de substrat comme suit : dissoudre un comprimé d'OPD à 10 mg dans 15 ml de tampon de substrat. Porter la solution préparée à température ambiante. Juste avant l'utilisation, ajouter 7 µl de peroxyde d'hydrogène à 30 %.
- ✓ À l'aide d'un chronomètre, ajouter 100 µl de solution de substrat dans chaque puits. Incuber pendant 8 à 10 minutes sur banc.
- ✓ Stopper la réaction en ajoutant 100 µl de H₂SO₄ 1,5 M dans chaque puits, EXACTEMENT dans le même intervalle que l'ajout de substrat.
- ✓ Secouer la plaque pour mélanger.
- ✓ Sélectionner le programme approprié (492 nm) sur le lecteur de plaques Lab Systems et tracer la courbe d'étalonnage à l'aide de papier graphique linéaire. Les plaques doivent être lues dans les 30 minutes. En cas de retard, ranger les plaques dans un placard sombre pendant quatre heures maximum.
- ✓ Pour calculer les résultats : lire la dilution 1/100 directement à partir de l'étalonnage, multiplier la dilution 1/200 par deux et faire la moyenne des résultats. N'inclure que les résultats qui se situent dans la courbe standard.

Protocole de contrôle qualité : analyser le contrôle normal et le contrôle anormal (bas niveau) avec chaque lot. Si disponible, inclure l'échantillon d'un patient atteint de la mW de type 3 comme contrôle.

Interprétation des résultats : les résultats sont rapportés en pourcentage ou en UI/dl.

Antigène du facteur Willebrand automatisé par LIA : la méthode LIA automatisée sert à la détermination quantitative de l'antigène du FW (VWF:Ag) dans le plasma citraté humain. C'est la méthode la plus couramment utilisée pour estimer les taux de VWF:Ag. Le kit VWF:Ag automatisé est un dosage immunoturbidométrique renforcé par des particules de latex pour quantifier le VWF:Ag dans le plasma. Lorsqu'un plasma contenant du VWF:Ag est mélangé au réactif au latex et au tampon de réaction inclus dans le kit, les particules de latex enrobées s'agglutinent. Le degré d'agglutination est directement proportionnel à la concentration de VWF:Ag dans l'échantillon et déterminé en mesurant la diminution de la lumière transmise causée par les agrégats. Plusieurs kits de dosage VWF:Ag reposant sur la technologie LIA sont disponibles dans le commerce. Le protocole ci-dessous concerne le kit VWF:Ag HemosIL d'Instrumentation Laboratories, mais d'autres dosages peuvent également être utilisés. La présentation de cette méthode ne constitue pas une approbation du produit d'une société en particulier. Si un autre kit du commerce est utilisé, il est important de suivre les instructions du fabricant.

Réactifs et matériel :

- ✓ Réactif au latex : deux flacons × 3 ml d'une suspension de particules de latex de polystyrène enrobées d'un anticorps polyclonal de lapin anti-FW contenant de l'albumine de sérum bovin, un tampon, un stabilisant et un conservateur
- ✓ Tampon de réaction : deux flacons × 4 ml de tampon HEPES contenant de l'albumine de sérum bovin, des stabilisants et un conservateur
- ✓ Diluant du facteur (tampon imidazole)
- ✓ Plasma étalon (1 litre)
- ✓ PPP citraté du patient
- ✓ Plasma de contrôle normal et anormal (bas niveau)
- ✓ Eau distillée pour la reconstitution des réactifs

Préparation des réactifs, conservation et stabilité des réactifs :

- ✓ Reconstituer le plasma étalon avec exactement 1 ml d'eau distillée. Laisser le matériau reconstitué reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 30 minutes. Ensuite, faire doucement tourner le flacon avant utilisation. La préparation est stable pendant huit heures à 15-25 °C. Elle peut être congelée et conservée à -80 °C au minimum.
- ✓ Plasma de contrôle anormal (Dade P) : reconstituer le plasma de contrôle P avec exactement 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Agiter soigneusement pour dissoudre sans formation de mousse et laisser reposer à température ambiante (entre 18 et 25 °C) pendant 15 minutes. Avant utilisation, agiter à nouveau avec précaution.
- ✓ Contrôle normal/plasma normal poolé : conserver le PNP au bain-marie à 37 °C pendant cinq minutes, mélanger délicatement avant utilisation.
- ✓ Réactif au latex : ajouter 2 ml de tampon de réaction et bien mélanger sans bulle d'air. Une fois ouvert, il est stable pendant trois mois à 2-8 °C dans le flacon d'origine ou une semaine à 15 °C sur le système de la famille ACL TOP. Ne pas congeler.
- ✓ Tampon de réaction : Une fois ouvert, il est stable pendant trois mois à 2-8 °C dans le flacon d'origine ou une semaine à 15 °C sur le système de la famille ACL TOP. Ne pas congeler.

Détails de l'étalonnage : charger les réactifs appropriés (latex VWF:Ag, tampon VWF:Ag, étalon et diluant de facteur) sur l'analyseur automatisé. Sélectionner et lancer le programme d'étalonnage. Une fois l'étalonnage terminé, examiner les résultats. S'il n'y a pas d'erreurs/défaillances et que l'étalonnage est acceptable, valider la courbe d'étalonnage. L'étalonnage est effectué lorsqu'il y a un changement de numéros de lot de réactifs ou un changement des principaux composants de l'instrument, conformément aux exigences réglementaires locales ou à la discrétion du laboratoire.

Protocole de contrôle qualité : effectuer au moins deux niveaux de contrôle (contrôle normal et contrôle anormal) à chaque cycle. Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et son écart type et élaborer un programme de contrôle qualité.

Procédure : sélectionner le programme approprié sur l'instrument et conserver les réactifs requis (latex VWF:Ag, tampon VWF:Ag et diluant de facteur). Charger les échantillons et analyser conformément aux instructions du fabricant.

Résultats : les résultats sont rapportés en pourcentage ou en UI/dl.

Plage normale :

- ✓ Groupe sanguin O : 42,0–140,8 UI/dl
- ✓ Groupes sanguins A, B et AB : 66,1–176,3 UI/dl

Limite de détection :

- ✓ Famille ACL : 3,5 UI/dl
- ✓ Famille ACL Top/ACL Top série 5 : 2,2 UI/dl

Linéarité :

- ✓ Famille ACL : 10–150 UI/dl
- ✓ Famille ACL Top/ACL Top série 5 : 8,5–250 UI/dl
- ✓ Si la plage linéaire est dépassée, les échantillons doivent être dilués à 1/4 avec un diluant de facteur (100 µl d'échantillon + 300 µl de diluant). Une dilution supplémentaire jusqu'à 1/16 peut être effectuée si nécessaire. Multiplier les résultats par le facteur de dilution respectif.

Antigène du facteur Willebrand automatisé par CLIA : la méthode CLIA automatisée sert à la détermination quantitative du VWF:Ag dans le plasma citraté humain. Il s'agit d'un immunodosage en deux temps quantifiant le VWF:Ag dans du plasma citraté humain qui fait appel à des billes magnétiques comme phase solide et à un système de détection par chimiluminescence. Dans un premier temps, l'échantillon est mélangé avec des particules magnétiques enrobées d'anticorps polyclonaux anti-FW et le tampon du dosage. Le FW présent dans l'échantillon se lie aux particules. Dans un deuxième temps, après séparation magnétique et lavage, un anticorps polyclonal anti-FW marqué à l'isoluminol est ajouté. La réaction chimiluminescente est mesurée en unités de lumière relative qui sont directement proportionnelles à la concentration de VWF:Ag dans l'échantillon. Les études menées à partir des données d'assurance externe de la qualité ont montré que la méthode VWF:Ag CLIA avait le CV le plus bas et la limite de détection la plus basse. Actuellement, le VWF:Ag selon la méthode CLIA n'est proposé que par HemosIL AcuStar VWF:Ag et ne peut être réalisé que sur l'instrument ACL AcuStar.

Composition des réactifs

Le kit VWF:Ag se compose de :

- a. Cartouche VWF:Ag pour 25 déterminations : chaque cartouche contient un flacon de suspension de particules magnétiques lyophilisées enrobées d'un anticorps polyclonal de lapin anti-FW, un flacon de tampon du dosage, un flacon d'un traceur constitué d'un anticorps polyclonal de lapin anti-FW marqué à l'isoluminol et un flacon de diluant d'échantillon. Les réactifs sont dans un tampon phosphate contenant de l'albumine de sérum bovin, des IgG polyclonales de lapin, des stabilisants et des conservateurs.
- b. Étalon 1 VWF:Ag : contient une solution saline avec des conservateurs.
- c. Étalon 2 VWF:Ag : deux flacons de plasma humain lyophilisé contenant un tampon, des stabilisants et un conservateur.

Préparation et procédure

Cartouche VWF:Ag : la première fois que la cartouche est utilisée, la retourner délicatement à 30 reprises en évitant la formation de mousse et vérifier la remise en suspension complète du flacon de microparticules. Si les microparticules ne sont pas totalement en suspension, continuer à retourner la cartouche jusqu'à remise en suspension complète. Suivre les instructions fournies pour ouvrir la cartouche et la charger sur le système ACL AcuStar.

Étalon 1 VWF:Ag : est liquide et doit être délicatement mélangé par plusieurs inversions avant utilisation pour assurer son homogénéité.

Étalon 2 VWF:Ag : dissoudre le contenu du flacon avec 1 ml d'eau de qualité réactif de laboratoire clinique (CLR) ou équivalent. Remettre le bouchon en place et faire doucement tourner. S'assurer de la reconstitution complète du produit. Conserver l'étalon à une température comprise entre 15 et 25 °C pendant 30 minutes et le retourner délicatement pour le mélanger avant utilisation. Ne pas agiter. Une fois reconstitué, verser la totalité du contenu du flacon de l'étalon dans le tube en plastique à code-barres vide étiqueté de manière appropriée pour une utilisation sur le système ACL AcuStar.

Conservation et stabilité des réactifs

Les réactifs et les étalons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes des cartouches et des flacons lorsqu'ils sont conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Cartouche VWF:Ag : la stabilité après ouverture à 2-8 °C dans le système ACL AcuStar est de huit semaines. Les cartouches ouvertes doivent rester à l'intérieur du système ACL AcuStar.

Étalons 1 et 2 VWF:Ag : la stabilité après ouverture et/ou reconstitution à l'intérieur de l'ACL AcuStar est de quatre heures. Pour une stabilité optimale, retirer les étalons du système et les stocker à une température comprise entre 2 et 8 °C dans des tubes en plastique à code-barres fermés.

Protocole de contrôle qualité : effectuer au moins deux niveaux de contrôle (contrôle normal et contrôle anormal) à chaque cycle. Chaque laboratoire doit établir sa propre moyenne et son écart type et élaborer un programme de contrôle qualité.

Procédure : sélectionner le programme approprié sur l'instrument et conserver les réactifs requis. Charger les échantillons et analyser conformément aux instructions du fabricant.

Résultats : les résultats sont rapportés en pourcentage ou en UI/dl.

Plage normale :

Tous les groupes sanguins : 52,2-177,9 UI/dl

Groupe sanguin O : 48,2-157,2 UI/dl

Groupes sanguins A, B et AB : 59,6-210,5 UI/dl

Limite de détection :

ACL AcuStar : 0,13 UI/dl

Linéarité :

Famille ACL : 0,3-400 UI/dl

Lorsque la capacité de réexécution est activée sur l'instrument, celui-ci effectue une dilution automatique et corrige le résultat final pour le facteur de dilution ($\times 20$), élargissant ainsi la plage de 8000 UI/dl. Le dosage n'est pas affecté par l'effet de prozone.

Dosage de la liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF:CB) : le FW est une protéine plasmatique aux fonctions et activités multiples. Il agit comme un pont adhésif entre les plaquettes et la paroi vasculaire. Il se lie aux plaquettes, principalement par l'intermédiaire du récepteur GPIb en utilisant son domaine A1, et au collagène sous-endothélial, principalement par l'intermédiaire du domaine A3, provoquant l'adhésion plaquettaire. La capacité de liaison plaquettaire du FW peut être évaluée à l'aide du dosage du cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) ou d'autres tests de liaison à la GPIb plus récents. Il s'agit du dosage de l'activité du FW le plus couramment utilisé. Le VWF:RCo et le VWF:CB évaluent toutefois différentes fonctions du FW. Le VWF:CB repose sur la capacité du FW à adhérer au collagène et dépend de la présence de multimères de haut poids moléculaire (HPM) et d'un site de liaison au collagène intact. Le collagène a une faible affinité pour les domaines de liaison du FW uniques et nécessite un FW multimère important pour une association étroite avec le collagène. Cette propriété du VWF:CB sert à détecter la perte de multimères de HPM, ce qui peut différencier le type 2A/2B (perte de multimères de HPM) du type 2M (distribution normale des multimères). Les lignes directrices de 2021 sur la mW suggèrent d'avoir recours à l'analyse des multimères ou au VWF:CB pour discriminer le type 2M du type 2A/2B. Le VWF:CB est le plus souvent réalisé à l'aide d'une méthode reposant sur ELISA. Plusieurs dosages ELISA sont disponibles dans le commerce. Il faut veiller à choisir le dosage optimisé pour détecter de préférence le FW de HPM. Plus récemment, ce dosage peut aussi être pratiqué dans l'analyseur automatisé AcuStar, qui utilise une méthode CLIA. Le dosage AcuStar VWF:CB est un dosage immunologique en deux temps, dans lequel des particules magnétiques font office de phase solide et sont enduites d'un peptide à triple hélice de collagène de type III. La liaison du FW présent dans l'échantillon aux particules magnétiques est proportionnelle à sa capacité de liaison au collagène, qui est mesurée par un système de détection chimiluminescente.

Nous décrivons ici une méthode ELISA interne pour le VWF:CB : ce dosage évalue la capacité de liaison du FW dérivé du plasma du patient au collagène préalablement appliqué sur des plaques de microtitration à 96 puits. Le FW adsorbé sur le collagène immobilisé est détecté à l'aide d'un anticorps polyclonal marqué à l'enzyme et de la réaction subséquente du substrat, soumise à une surveillance photométrique au moyen d'un lecteur ELISA. Il est préférable d'utiliser un mélange d'environ 95 % de collagène de type I (faible liaison au FW) et d'environ 5 % de collagène de type III (bonne liaison au FW) afin d'obtenir une bonne sélectivité pour le FW de HPM. Sinon, une concentration plus faible de collagène de type III (1 à 5 µg/ml) peut également être utilisée. Des taux réduits de VWF:CBA seront présents chez les personnes présentant soit des anomalies quantitatives, soit des anomalies qualitatives. Étant donné que ce dosage à lui seul ne permettra pas la classification de la mW, il est important que ce test fonctionnel soit exécuté en même temps que le VWF:Ag et le VWF:RCo.

Échantillon primaire : sang citraté.

Matériel et réactifs :

- ✓ Collagène à un mélange d'environ 95 % de collagène de type I et 5 % de collagène de type III (collagène Horm, collagène ICN)
- ✓ Tampon de dilution et tampon de lavage (PBS avec Tween 20)
- ✓ Tampon de substrat : acétate de sodium/acide citrique 0,1 M
- ✓ Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 30 %
- ✓ Antigène polyclonal de lapin anti-FW humain conjugué à de l'HRP (Dako)
- ✓ Plaques de microtitration pour dosage immuno-enzymatique 96 puits
- ✓ PPP citraté du patient, PNP et plasmas de contrôle anormal
- ✓ H_2SO_4 2 M
- ✓ Substrat : dichlorhydrate d'o-phénylènediamine (OPD)

Préparation du réactif :

PBS (pH 7,4) avec Tween 20 :

- d. Chlorure de sodium (NaCl) : 8,0 g
- e. Chlorure de potassium (KCl) : 0,20 g
- f. Hydrogène-orthophosphate disodique ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) : 2,90 g
- g. Dihydrogénophosphate de potassium ($KH_2PO_4 \cdot H_2O$) : 0,20 g
- h. Compléter jusqu'à 1,0 l et ajuster le pH à 7,4. Ajouter 500 µl de Tween 20.

Tampon de substrat :

Tampon acétate de sodium/acide citrique 0,1 M

Dissoudre 13,6 g d'acétate de sodium dans 100 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 6,0 à l'aide d'acide citrique 1 M (52,14 g pour 250 ml d'eau distillée).

H_2SO_4 2 M :

Ajouter 10,65 ml d' H_2SO_4 concentré à 89,35 ml d'eau distillée.

Procédure :

- ✓ Recouvrir les plaques ELISA de collagène. Avant utilisation, mélanger délicatement le collagène par inversion. Diluer 200 µl de la solution mère de collagène dans 20 ml de PBS, bien mélanger, puis dispenser 200 µl dans chaque puits. Sceller et conserver dans une boîte humide pendant 24 à 48 heures.

- ✓ Laver la plaque avec du PBS à trois reprises. (Intervalle de trois minutes entre chaque lavage.) Prélever l'excès de tampon et vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air.
- ✓ Effectuer une prédilution 1/10 de chaque échantillon à tester (c.-à-d. ajouter 20 µl d'échantillon à 180 µl de PBS dans des tubes à essai). Inclure également des contrôles dans l'analyse.
- ✓ La courbe d'étalonnage s'étend de 400 à 0 %. Étiqueter les tubes de A à H. Prendre 180 µl de tampon dans un tube à essai et ajouter 120 µl de PNP (il s'agit du tube A). Ajouter 150 µl de tampon des tubes B à G. Procéder à des dilutions en série en prélevant 150 µl du tube A vers le tube B, et ce jusqu'au tube G.
- ✓ Le tube H sert de blanc. Ajouter seulement 200 µl de tampon.
- ✓ Ajouter 180 µl de tampon dans tous les puits après avoir lavé les plaques revêtues de collagène à trois reprises (comme décrit à l'étape 2).
- ✓ Ajouter 20 µl d'étalon dilué en série de A à G.
- ✓ Ajouter 20 µl d'échantillon prédilué et les contrôles en trois exemplaires.
- ✓ Sceller et incuber à 22 °C (température ambiante dans une boîte humide) pendant deux heures.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du PBS et ajouter un anticorps conjugué à une peroxydase prédilué (dilution 1/1000, soit 22 µl d'anticorps VWF HRP-TAG dans 22 ml de PBS). Ajouter 200 µl à chaque puits.
- ✓ Incuber pendant deux heures à température ambiante.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du PBS.
- ✓ Ajouter 200 µl de substrat. Pour cela, dissoudre un comprimé d'OPD 10 mg dans 22,5 ml d'eau distillée et 2,5 ml de tampon de substrat de travail. Juste avant l'utilisation, ajouter au substrat 15,0 µl d'H₂O₂ à 30 %.
- ✓ Attendre 15 à 20 minutes pour le développement de la couleur et ajouter 50 µl d'H₂SO₄ 2 M pour stopper la réaction. Lire à l'aide d'un lecteur ELISA avec le filtre de longueur d'onde de 492 nm.

Protocole de contrôle qualité : analyser le contrôle normal (PNP) et le contrôle anormal de bas niveau (Dade P) avec chaque cycle. Le cas échéant, un échantillon d'un patient connu atteint de la maladie de Willebrand peut également être inclus. Limite de détection : 0 à 400 %.

Interprétation des résultats : le VWF:CB permet un diagnostic plus exact de la mW et réduit les erreurs de classification et le risque de passer à côté d'un diagnostic. Des études ont montré que les taux d'erreur de diagnostic de la mW baissaient de 50 % par l'ajout du VWF:CB dans un panel de quatre tests (c.-à-d. facteur VIII, dosage VWF:RCo ou à base de GPIb, VWF:Ag et VWF:CB) par rapport au panel de trois tests le plus courant (facteur VIII, dosage VWF:RCo ou à base de GPIb et VWF:Ag).

- ✓ Maladie de Willebrand de type 1 versus type 2 : la mW de type 1 présente des taux de VWF:Ag réduits sans divergence entre les dosages de l'activité et de l'antigène. Par conséquent, les rapports VWF:CB/VWF:Ag et VWF:RCo/VWF:Ag sont tous deux normaux. Un rapport de 0,6 ou 0,7 peut servir à déterminer la divergence entre les différents dosages de l'activité et de l'antigène du FW. Des études ont montré que le VWF:CB permettait de mieux différencier le type 1 du type 2A/2B que le dosage VWF:RCo.
- ✓ Maladie de Willebrand de type 2A/2B versus 2M : le VWF:CB peut être utilisé comme substitut à l'analyse des multimères pour différencier la mW de type 2A/2B du type 2M, conformément aux lignes directrices sur la mW de 2021. Un moindre rapport VWF:CB/VWF:Ag suggère une perte de multimères de HPM, observable dans les types 2A et 2B de la mW. Ces patients auront également un rapport VWF:RCo/VWF:Ag plus faible. La mW de type 2M présentera un rapport VWF:CB/VWF:Ag normal, mais le rapport VWF:RCo/VWF:Ag sera réduit. Un sous-ensemble du type 2M avec un défaut du site de liaison au collagène peut avoir un rapport VWF:CB/VWF:Ag normal. Bien que le VWF:CB reposant sur la méthode CLIA puisse discriminer avec exactitude le type 1 du type 2, il est moins utile pour discriminer le type 2M du type 2A selon des études préliminaires, qui en nécessitent d'autres pour confirmer ces résultats. Il conviendrait pour cela d'avoir recours à un VWF:CB optimisé basé sur la méthode ELISA.

- ✓ Maladie de Willebrand de type 3 *versus* type 1 sévère : le VWF:CB a une meilleure limite de détection inférieure que le VWF:RCo. Il peut mieux détecter l'absence de FW dans la mW de type 3 et la présence de très faibles taux de FW dans la mW de type 1 sévère.
- ✓ Le VWF:CB est un outil important dans le diagnostic de la maladie de Willebrand. Il convient cependant d'utiliser un test de liaison au collagène approprié et optimisé. La source et la concentration de collagène peuvent affecter les résultats. Lorsque des dosages internes sont utilisés, il est préférable d'utiliser un mélange de collagène de type I/III (95 %/5 % environ), ou bien un collagène de type III à de faibles concentrations. Rapport coût-efficacité : le VWF:CB peut être pratiqué au moyen de dosages internes faisant appel à la méthode ELISA, ce qui en fait un dosage de l'activité du FW d'un bon rapport coût-efficacité. Conjointement avec un dosage VWF:Ag ELISA interne, il constitue une méthode peu coûteuse et efficace pour identifier les sous-types de la mW (à l'exception des types 2M et 2N) dans un contexte où les ressources sont limitées.

Test de liaison au facteur VIII pour le diagnostic de la maladie de Willebrand de type Normandie : le variant Normandie (type 2N) de la mW est un trouble autosomique récessif rare, identifié pour la première fois en 1989. La maladie est caractérisée par une anomalie du FW qui résulte en une capacité de liaison réduite au facteur VIII, ce qui entraîne une augmentation de la clairance du facteur VIII non lié dans la circulation. Les manifestations cliniques et biologiques chez les patients atteints de la mW de type 2N peuvent ressembler à celles des patients atteints d'hémophilie A mineure/modérée ou des personnes porteuses de l'hémophilie A. Il est probable que certains des patients de type 2N soient mal diagnostiqués à moins qu'un test de liaison au facteur VIII (VWF:FVIII) ne soit effectué pour confirmation. La distinction est importante, car le traitement de substitution avec du FW purifié sera beaucoup plus efficace chez ces patients que le traitement avec facteur VIII de remplacement. Le mode de transmission des deux maladies est également très différent : récessif autosomique dans la mW de type 2N et récessif lié au chromosome X dans l'hémophilie A. Les patients de type 2N sont soit homozygotes (mêmes mutations de type 2N) soit hétérozygotes composites (deux mutations de type 2N différentes ou une combinaison d'une mutation 2N et d'autres mutations de la mW). Les mutations sont fréquemment observées dans le domaine D'D3 du FW. Les taux de facteur VIII sont légèrement à modérément réduits, généralement entre 5 et 40 UI/dl. Les rapports FVIII/VWF:Ag sont réduits, généralement < 0,7. Les paramètres du FW (VWF:Ag, VWF:RCo, VWF:CB et analyse des multimères) sont habituellement normaux, sauf en cas d'hétérozygote composite pour d'autres mutations de la mW. Dans ce dernier cas, les patients ont tendance à être plus symptomatiques. Les hétérozygotes de type 2N sont généralement asymptomatiques et présentent des taux de facteur VIII normaux ou légèrement réduits. Deux tests internes ont été décrits pour le VWF:FVIII (Nesbitt *et al.*, 1996 ; Casonato *et al.*, 1998). Les deux tests montrent une bonne concordance et diffèrent en fonction de la détection du point final du facteur VIII résiduel. Dans les deux tests, la plaque de microtitration est recouverte d'anticorps anti-FW. Le complexe FW-FVIII dans l'échantillon du patient est immobilisé sur la plaque et le facteur VIII endogène est éliminé avec du chlorure de calcium. Est ajoutée une préparation recombinante de facteur VIII pur (rFVIII) à une concentration de 100 UI/dl. La quantité de rFVIII lié au FW immobilisé est mesurée par un dosage chromogénique (Nesbitt *et al.*, 1996) ou en utilisant un anticorps polyclonal anti-FVIII conjugué (Casonato *et al.*, 1998). Un seul test de liaison au facteur VIII est disponible dans le commerce (Asserachrom:FVIII, Diagnostica Stago). Nous décrivons ici la méthode interne reposant sur la méthode ELISA similaire à celle décrite par Casonato *et al.* (1998).

Échantillon primaire : sang citraté.

Matériel et réactifs :

- ✓ Anticorps de capture (coating) : polyclonal de lapin anti-FW humain (Dako)
- ✓ Anticorps primaire : IgG d'ovin purifiée anti-FVIII humain, 10 mg/ml
- ✓ Anticorps de détection (marqué) : IgG de singe anti-ovin conjuguée à la peroxydase AffiniPure (Jackson Immunoresearch)

Sinon, le cas échéant, il est possible d'utiliser l'anticorps anti-FVIII conjugué à de l'HRP en remplacement direct des anticorps primaire et de détection.

- ✓ Chlorure de calcium 0,4 M
- ✓ Tampon de coating bicarbonate
- ✓ Tampon TBS et tampon de dilution
- ✓ Tampon de lavage
- ✓ Tampon de substrat
- ✓ Substrat : dichlorhydrate d'o-phénylènediamine (OPD)
- ✓ Acide sulfurique (H_2SO_4) 2 M
- ✓ Acide chlorhydrique
- ✓ Concentré de facteur VIII (Recombine)
- ✓ Plasma citraté pauvre en plaquettes à tester
- ✓ Plasma normal poolé, contrôles

Préparation du réactif

Tampon de coating bicarbonate :

- a. Carbonate de sodium (Na_2CO_3) : 0,16 g
- b. Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) : 0,294 g
- c. Compléter jusqu'à 100 ml. Ajuster le pH à 9,6. La durée de conservation est de deux à trois semaines.
- d. Ajouter environ 200 µl de colorant rouge.

Préparer du tampon TBS 150 mM comme indiqué :

- a. Chlorure de sodium (NaCl) : 11,68 g
- b. Base TRIZMA : 12,12 g
- c. Dissoudre dans 1800 ml d'eau. Compléter jusqu'à 2000 ml. Ajuster le pH à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique.

Tampon de dilution : dissoudre 1 g d'albumine de sérum bovin (BSA) dans 100 ml de tampon TBS et Tween 20 à 0,2 %. Environ 100 ml par plaque sont nécessaires.

Tampon de lavage : ajouter du Tween 20 à 0,2 % au TBS. Ajouter 2 ml de Tween 20 à 1000 ml de TBS.

Chlorure de calcium 0,4 M : dissoudre 0,588 g de CaCl_2 dans 10 ml de tampon de dilution.

Tampon de substrat :

- a. Acide citrique. H_2O : 0,73 g
- b. Hydrogène-orthophosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) : 2,4 g
- c. Compléter jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée. Ajuster le pH à 5,0. La durée de conservation est de deux mois.

Substrat : dissoudre un comprimé d'OPD à 10 mg dans 15 ml de tampon de substrat.

Acide sulfurique 2 M : ajouter 10,65 ml d' H_2SO_4 concentré à 89,35 ml d'eau distillée.

Concentré de facteur VIII dilué (Recombine) : reconstituer Recombine dans 1 ml d'eau désionisée, aliquoter 500 µl en flacons et conserver congelé à -80 °C.

Procédure :

Coating de la plaque :

- ✓ Diluer l'anticorps de capture à 1/1000.
- ✓ Ajouter 100 µl/puits. Incuber à 4 °C pendant la nuit. Les plaques peuvent être enduites 16 à 96 heures avant leur utilisation.

Dilution des étalons :

- ✓ Pour préparer la solution mère, diluer 50 µl de PNP dans 3,95 ml de tampon de dilution (1/80).
- ✓ Préparer un éventail d'étalons à partir de cette solution.

a.	Solution mère	125 % (S1)
b.	0,8 ml de solution mère + 0,2 ml de tampon	100 % (S2)
c.	0,6 ml de solution mère + 0,4 ml de tampon	75 % (S3)
d.	0,4 ml de solution mère + 0,6 ml de tampon	50 % (S4)
e.	0,2 ml de solution mère + 0,8 ml de tampon	25 % (S5)
f.	0,1 ml de solution mère + 0,9 ml de tampon	12,5 % (S6)
g.	0,05 ml de solution mère + 0,95 ml de tampon	0,25 % (S7)
h.	1,00 ml de tampon	Blanc

Dilution des échantillons des patients et des contrôles : diluer les échantillons des patients et les contrôles à 1/100 dans le tampon de dilution (10 µl d'échantillon + 990 µl de tampon).

Procédure analytique :

- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec le tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon et vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air.
- ✓ Ajouter 100 µl des étalons et des blancs en double et des tests en triple, dans les puits des plaques, selon le format suivant.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T1	T9	T9	T9	T17	T17	T17	-
B	S2	S2	T2	T2	T2	T10	T10	T10	T18	T18	T18	-
C	S3	S3	T3	T3	T3	T11	T11	T11	T19	T19	T19	-
D	S4	S4	T4	T4	T4	T12	T12	T12	T20	T20	T20	-
E	S5	S5	T5	T5	T5	T13	T13	T13	T21	T21	T21	-
F	S6	S6	T6	T6	T6	T14	T14	T14	T22	T22	T22	-
G	S7	S7	T7	T7	T7	T15	T15	T15	T23	T23	T23	-
H	BK	BK	T8	T8	T8	T16	T16	T16	T24	T24	T24	-

S1-S7 : dilutions de l'étalon ; T : plasma à tester ; BK : blanc

- ✓ Sceller la plaque. Incuber pendant une heure dans un bain-marie à exactement 37 °C.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec le tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon et vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air.
- ✓ Pour éliminer le facteur VIII endogène, incuber avec 100 µl/puits de CaCl₂ 0,4 M pendant une heure au bain-marie à 37 °C. Il n'est pas nécessaire d'agiter.
- ✓ Laver à nouveau la plaque à trois reprises avec du tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon.
- ✓ Décongeler l'un des flacons congelés de concentré de facteur VIII (Recombinante). Ajouter 400 µl de concentré de facteur VIII à 9,6 ml de tampon de dilution (concentration d'environ 100 UI/dl).
- ✓ Ajouter 100 µl de facteur VIII dilué dans chaque puits. Incuber pendant une heure à 37 °C.

- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon.
- ✓ L'anticorps primaire est aliquoté en quantités de 25 µl et stocké à -80 °C. Préparer une dilution 1/2000 de l'anticorps primaire dans le tampon de dilution (5 µl dans 10 ml). Remettre immédiatement l'aliquote d'anticorps dans le congélateur pour utilisation ultérieure.
- ✓ Ajouter 100 µl d'anticorps primaire dilué dans chaque puits. Incuber pendant une heure à 37 °C.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon.
- ✓ L'anticorps marqué est aliquoté en quantités de 10 µl et stocké à -80 °C. Préparer une dilution 1/5000 de l'anticorps marqué dans le tampon de dilution (2 µl dans 10 ml). Remettre immédiatement l'aliquote d'anticorps dans le congélateur pour utilisation ultérieure.
- ✓ Ajouter 100 µl d'anticorps marqué dilué dans chaque puits. Incuber pendant une heure à 37 °C.
- ✓ Laver la plaque à trois reprises avec du tampon de lavage. Prélever l'excès de tampon.
- ✓ La solution de substrat est préparée uniquement lors de la dernière étape de lavage. Juste avant l'utilisation, ajouter à cette solution 7 µl d'H₂O₂ à 30 %.
- ✓ Ajouter 100 µl de la solution ci-dessus dans chaque puits. Déclencher le chronomètre. Incuber pendant 8 à 10 minutes.
- ✓ Stopper la réaction en ajoutant 50 µl d'H₂SO₄ 2 M dans chaque puits, exactement dans le même intervalle que l'ajout de substrat.
- ✓ Sélectionner le programme approprié (492 nm) sur le lecteur de plaques ELISA. Procéder aux relevés de la densité optique.

Protocole qualité : analyser le contrôle normal (PNP) et le contrôle anormal de bas niveau (Dade P). Si des contrôles de mW Normandie connue sont disponibles, ajouter un échantillon en tant que contrôle avec chaque lot.

Interprétation des résultats : les résultats sont exprimés en UI/dl. Limites de détection : moins de 6,25 % à plus de 175 %.

- ✓ Homozygotes ou hétérozygotes composites pour le type 2N : absence ou réduction prononcée de VWF:FVIIIb (< 15 %) et très faibles rapports VWF:FVIIIb/VWF:Ag (< 0,3). Les taux de FVIII:C sont légèrement à modérément réduits, généralement compris entre 5 et 40 UI/dl. Les rapports FVIII:C/VWF:Ag sont également réduits, généralement < 0,7. Ce rapport peut être normal, en particulier chez les hétérozygotes composites avec un type 2N et des mutations du FW quantitatives/nulles. En conséquence, un dosage VWF:FVIIIb ou un test génétique peut être nécessaire si la suspicion clinique est forte.
- ✓ Hétérozygotes pour le type 2N : le VWF:FVIIIb est modérément réduit, voire normal, mais le rapport VWF:FVIIIb/VWF:Ag est moindre (< 0,7). Les taux de FVIII:C sont habituellement normaux ou légèrement réduits.
- ✓ Hémophilie A mineure ou porteuses de l'hémophilie : les taux de FVIII:C sont réduits ou normaux. Le dosage de VWF:FVIIIb est normal, de même que le rapport VWF:FVIIIb/VWF:Ag (> 0,7).

Multimères du facteur Willebrand : le FW est une grosse glycoprotéine multimérique qui circule dans le plasma sous la forme d'une série de sous-unités polymères identiques appelées « multimères ». Les multimères peuvent être libérés par les cellules endothéliales de manière régulière ou stockés dans les corps de Weibel-Palade des plaquettes. Ils comprennent un nombre variable de sous-unités (poids moléculaire de 500 kDa à plus de 10 000 kDa) liées par des liaisons disulfure. Ils sont classés en fonction de leur taille en multimères de poids moléculaire bas (1 à 5 multimères), moyen (6 à 10 multimères), haut (11 à 20 multimères) et très haut (20 multimères) (MBPM, MPMI, MHPM et MTHPM) (Stockschlaeder et al., 2014 ; James et al., 2021). Les multimères de haut poids moléculaire (MHPM) sont importants pour la liaison au collagène et aux récepteurs plaquettaires pendant l'hémostase primaire de manière à faciliter l'agrégation plaquettaire. Des anomalies dans l'assemblage ou le nombre de multimères peuvent entraîner des complications hémostatiques. L'analyse des multimères est utile pour la classification de la maladie de Willebrand qui, à son tour, peut éclairer la prise en charge des patients. La mW de type 1 est un déficit quantitatif partiel démontrant une réduction quantitative des multimères normaux. Le

sous-type 1C présente une survie moindre et une clairance accrue du FW, entraînant des saignements allongés (Platton *et al.*, 2024).

La mW de type 2 est due à des déficits qualitatifs du FW, et la mW de type 3 est une absence totale de FW. La mW de type 2 est subdivisée en quatre sous-types :

- Type 2A dans lequel l'assemblage des multimères présente un défaut, la sensibilité au clivage AAMMTS13 est plus forte ou la synthèse diminuée, entraînant une réduction ou une absence de MHPM.
- Le type 2B est dû à une mutation de gain de fonction qui augmente la liaison du FW aux plaquettes. Une perte de MHPM est signalée dans la plupart des cas, mais pas tous.
- Le type 2M présente une diminution de l'adhérence plaquettaire ou collagénique dépendante du FW, avec un profil normal des multimères du FW.
- Le type 2N a pour origine une affinité réduite de liaison au facteur VIII en raison de mutations dans le site de liaison au facteur VIII du FW ; il est fait état d'un profil normal des multimères du FW.

Il y a quelques exceptions ; des profils normaux ont été signalés dans certains cas de type 2B et, inversement, une perte de MHPM a été signalée dans quelques cas de variantes de type 2M. Des multimères du FW de grande taille peuvent être observés dans la mW de type 1C, dans le purpura thrombocytopénique thrombotique (PTT) et occasionnellement dans les cas de mW de type 2M.

Les méthodes traditionnelles de visualisation des multimères sont complexes, laborieuses et chronophages et impliquent une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du dodécylsulfate de sodium, suivie d'une visualisation par western blot, immunodétection colorimétrique, autoradiographie, chimiluminescence ou fluorescence. L'évaluation des multimères peut être effectuée par inspection visuelle ou par quantification à l'aide de la densitométrie (Platton *et al.*, 2024).

Au moment de la rédaction du présent document, la technique la plus largement utilisée, basée sur la participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité, est un test semi-automatique disponible dans le commerce, qui est nettement plus rapide que les méthodes manuelles au gel d'agarose contenant du dodécylsulfate de sodium. Cette méthode de détection et d'analyse de la distribution des multimères du FW dans le plasma humain par électrophorèse sur gel d'agarose et immunofixation avec l'instrument semi-automatique Sebia Hydrasys 2 est décrite ci-dessous (Bowyer *et al.*, 2018).

Analyse des multimères du FW à l'aide de l'instrument Sebia Hydrasys : H5VWM et H11VWM sont des dosages à base de gel d'agarose destinés à la séparation des protéines plasmatiques en fonction de leur poids moléculaire. La séparation électrophorétique des multimères du FW est réalisée après traitement de l'échantillon avec un détergent anionique. Par un excès de ce détergent anionique, les protéines sont converties en complexes protéine-détergent anionique. Dans ces complexes, la conformation native des protéines est perturbée et elles prennent toutes la même conformation et la même charge négative par unité de masse. Lorsque ces protéines sont soumises à électrophorèse sur un milieu présentant des propriétés de criblage appropriées, tel que les gels H5VWM ou H11VWM, elles se séparent en fonction de leur poids moléculaire. Sur les gels H5VWM ou H11VWM, les multimères du FW sont séparés et immunoprécipités avec un antisérum anti-FW spécifique. Les différentes bandes sont ensuite visualisées dans le gel avec un anticorps marqué à la peroxydase et un substrat spécifique. Le dosage est réalisé en deux temps : (1) électrophorèse sur gel d'agarose pour séparer les protéines contenues dans les échantillons de plasma, et (2) immunofixation avec un antisérum anti-FW pour visualiser les différents multimères.

Équipement requis :

- Pipettes et embouts de 10 ml, 100 µl et 10 µl
- Tubes Eppendorf
- Bain-marie

- Minuterie
- Agitateur-mélangeur vortex
- Papier absorbant
- Lingettes imbibées d'alcool
- Analyseur Hydrasys (Sebia, Lisses, France)

Tableau 28. Réactifs pour l'analyse des multimères du FW à l'aide de l'instrument Sebia Hydrasys

Réactif	Réf. catalogue	Stabilité
Kit 5 ou 11 multimères du FW Sebia Hydragel	4359	Jusqu'à la date de péremption indiquée
Kit de visualisation des multimère du FW Sebia Hydragel	4747	Jusqu'à la date de péremption indiquée
Peroxyde d'hydrogène à 30 %	Sigma-Aldrich 216763 100 ml	Jusqu'à la date de péremption indiquée
Solution de décoloration Diluer 5 ml dans 5 l d'eau	4540 (10 flacons de 100 ml)	Solution de travail : 1 semaine à température ambiante
Solution de lavage Hydrasys Diluer 1 flacon dans 5 l d'eau (8 ml dans 500 ml)	4541 (10 flacons de 80 ml)	Solution de travail stable jusqu'à la date de péremption indiquée
CQ normal		

La méthode pour Hydragel 5 et Hydragel 11 ne varie qu'en termes de volumes de réactif et de taille des caches/papier buvard.

Préparation de l'échantillon :

- ✓ Chauffer le petit bain-marie Grant à 45 °C.
- ✓ Décongeler le plasma à tester et le CQ à 37 °C. Hydragel 5 est prévu pour quatre patients et un CQ. Hydragel 11 est prévu pour neuf patients et deux CQ (mais seul le flacon CQ 1 est requis).
- ✓ S'assurer que le résultat VWF:Ag est connu avant de commencer.
- ✓ Étiqueter les tubes Eppendorf pour les patients et le CQ.
- ✓ Agiter les échantillons avant utilisation. Diluer les échantillons avec le diluant du kit de multimères dans les tubes Eppendorf conformément au VWF:Ag de l'échantillon. La limite de détection des multimères du FW est de 0,05 UI/ml, la limite d'interprétation est de 0,11 UI/ml.

VWF:Ag (UI/ml)	Dilution	Diluant de l'échantillon (µl)	Plasma (µl)
< 0,20	1/4	30	10
0,20-1,50	1/6	50	10
1,50-3,00	1/10	90	10
> 3,00	1/20	95	5

- ✓ Agiter pendant cinq secondes.
- ✓ Incuber pendant exactement 20 minutes à 45 °C dans le bain-marie.
- ✓ Retirer les tubes Eppendorf du bain-marie, **agiter** et les laisser à température ambiante pendant 10 minutes. Pendant ces 10 minutes, préparer la migration.

Configuration de la migration

- 1) Mettre l'Hydrasys 2 et le dispositif de visualisation sous tension. Sélectionner le programme Phoresis : nom d'utilisateur adm mot de passe sebia.
- 2) Remplir une feuille de travail. Consigner les numéros de lot des kits, des mèches et du gel.

- 3) Sélectionner « 5 VWF » (programme de migration n° 57) ou « 11 VWF » (programme n° 58) dans le menu de l'instrument (écran de gauche).

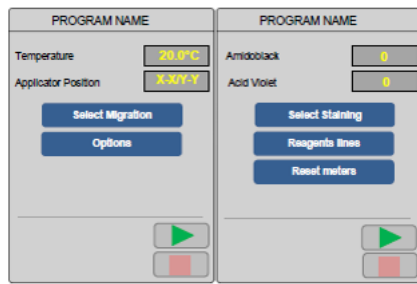


Figure 10. Analyseur Hydrasys

- 4) Ouvrir le couvercle du module de migration, retirer le porte-applicateur et soulever le porte-électrode. *****Ne jamais fermer le couvercle lorsque le support est levé***.**
- 5) À l'aide des extrémités en plastique, retirer les bandes de mèche tamponnées de leur emballage (vérifier l'excès d'eau). Les fixer au support par les trous, la protection en plastique touchant le support (figure 11).

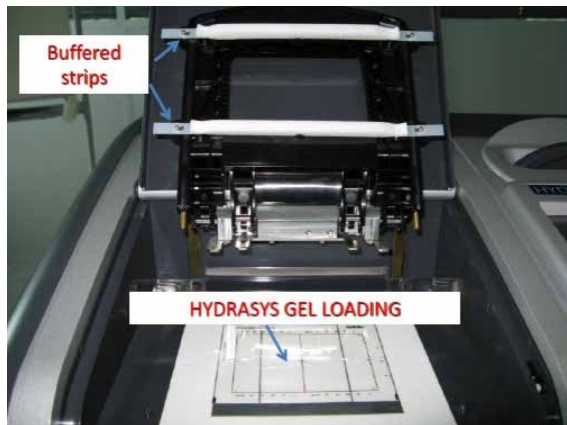


Figure 11. Analyseur Hydrasys

- 6) Hydrigel 5 : ajouter 100 µl d'eau distillée jusqu'au tiers inférieur du cadre sérigraphié sur le module de migration.
- 7) Hydrigel 11 : ajouter 200 µl d'eau distillée jusqu'au tiers inférieur du cadre sérigraphié sur le module de migration.
- 8) Ouvrir le gel et essuyer le support de gel en plastique avec du papier absorbant pour éliminer l'excès d'eau.
- 9) Placer le gel vers le haut sur le cadre sérigraphié (figure 12), les puits au bord le plus proche.
- 10) Rouler un cache plastique sur le gel (tailles différentes pour Hydrigel 5 et 11), aligné avec les marqueurs sur le gel (figure 12). Éliminer les bulles d'air ; retirer et réappliquer immédiatement, le cas échéant.

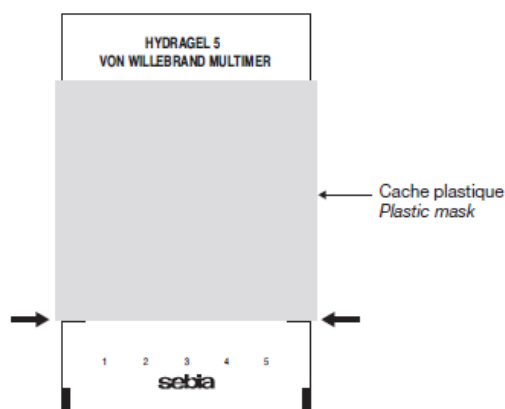


Figure 12. Analyseur Hydrasys

- 11) Abaisser doucement le porte-électrode sur le gel et fermer le module de migration.
- 12) À l'écran, appuyer sur START (▶), puis confirmer. Cela prend cinq minutes.
- 13) Le bip signale la fin. Ouvrir le module de migration, soulever le support.
- 14) À l'aide d'une pipette de 10 µl à embout fin, sans toucher le côté ou le fond du puits, réinjecter 5 µl d'échantillon dans chaque puits. Hydragel 5 : ajouter le CQ normal au puits 5. Hydragel 11 : ajouter le CQ normal aux puits 1 et 11.
- 15) ****Éviter les bulles.**** Cela devrait être fait dans les deux minutes.
- 16) Abaisser doucement le porte-électrode et fermer le module de migration.
- 17) Appuyer sur START (▶) à l'écran. Cela prend une centaine de minutes.
- 18) Sortir TTF1 et TTF2 du réfrigérateur et laisser liquéfier à température ambiante.

Immunofixation 1 (60 minutes)

- 19) Lorsque le bip retentit, le message ↓ANTISERUM VWF s'affiche.
- 20) Ouvrir le module, puis soulever et retirer le porte-électrode. Jeter les mèches et essuyer les électrodes avec un chiffon doux humidifié.
- 21) Hydragel 5 : dans un Z5, mélanger 2,5 ml de diluant pour antisérum avec 60 µl d'antisérum anti-FW.
- 22) Hydragel 11 : dans un Z5, mélanger 5 ml de diluant pour antisérum avec 135 µl d'antisérum anti-FW.
- 23) Retirer le masque et le jeter. Placer le masque AS VWF jaune sur le gel.
- 24) Tenir la pipette verticalement. Appliquer progressivement et soigneusement le mélange antisérum en une seule fois. ****Éviter les bulles.****
- 25) Fermer le module de migration et appuyer sur START (60 minutes).
- 26) Lorsque le bip retentit, ouvrir le couvercle et retirer l'antisérum.
- 27) Tenir la pipette verticalement, appuyer légèrement et retirer l'antisérum puis le jeter.
- 28) Retirer le masque et le nettoyer sous l'eau ; une petite brosse est recommandée. Laisser sécher.

Buvardage 1 (10 minutes)

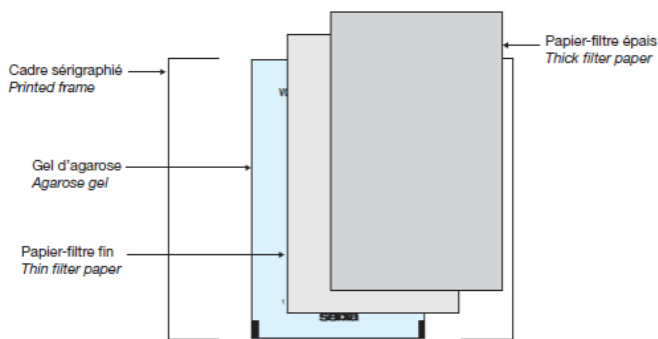


Figure 13. Analyseur Hydrasys

- 29) Appliquer un papier filtre fin et un papier filtre épais (côté lisse vers le bas) sur le gel (figure 13). Ajouter le verre puis le poids.
- 30) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Lavage du gel 1 (20 minutes)

- 31) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 32) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de lavage **rouge** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 33) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de lavage **rouge** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 34) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 2 (10 minutes)

- 35) Retirer la solution de lavage **rouge**, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 36) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 37) Laver le masque.

Lavage intermédiaire du gel puis buvardage sur papier fin (10 minutes + 5 secondes)

- 38) Ouvrir le couvercle. Retirer les papiers filtres et ajouter le masque de lavage/réhydratation orange.
- 39) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de lavage intermédiaire **verte**.
- 40) Hydragel 11 : ajouter 4,5 ml de solution de lavage intermédiaire **verte**.
- 41) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 42) Ouvrir le couvercle et retirer la solution de lavage intermédiaire verte. N'appliquer qu'un papier filtre **fin**. Appuyer sur START. Après cinq secondes, retirer le papier fin.

Immunofixation 2 (30 minutes)

- 43) Hydragel 5 : mélanger 4 ml de diluant pour antisérum avec 2 µl d'anti-IgG-PER dans un Z5.
- 44) Hydragel 11 : mélanger 8 ml de diluant pour antisérum avec 4 µl d'anti-IgG-PER dans un Z5.
- 45) Appliquer le masque IgG-PER orange puis ajouter le mélange anti-IgG-PER.
- 46) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 3 (10 minutes)

- 47) Ouvrir le couvercle, retirer l'anti-IgG-PER et le jeter. Retirer et laver le masque. Ajouter les papiers filtres fin et épais, le verre et le poids.
- 48) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Lavage du gel 2 (20 minutes)

- 49) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 50) Hydragel 5 : Ajouter 4,5 ml de solution de lavage **rouge** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 51) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de lavage **rouge** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 52) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 4 (10 minutes)

- 53) Retirer la solution de réhydratation, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 54) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 55) Laver le masque.

Réhydratation du gel 1 (10 minutes)

- 56) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 57) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 58) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 59) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 5 (10 minutes)

- 60) Retirer la solution de réhydratation, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 61) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 62) Laver le masque.

Réhydratation du gel 2 (10 minutes)

- 63) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 64) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 65) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 66) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 67) Agiter TTF1 et TTF2.
- 68) Hydragel 5 : ajouter 75 µl de TTF1 à 3,0 ml de solvant TTF dans un Z5. Retourner pour mélanger. Ajouter 75 µl de TTF2, retourner pour mélanger. Ajouter 3 µl de peroxyde d'hydrogène (30 %), retourner pour mélanger.
- 69) Hydragel 11 : ajouter 150 µl de TTF1 à 6,0 ml de solvant de visualisation TTF dans un Z5. Retourner pour mélanger. Ajouter 150 µl de TTF2, retourner pour mélanger. Ajouter 6 µl de peroxyde d'hydrogène (30 %), retourner pour mélanger.

Visualisation (10 minutes)

- 70) Éliminer la solution de réhydratation du masque. Placer le masque TTF1/TTF2 orange sur le gel.
- 71) Hydragel 5 : appliquer 2,5 ml de mélange TTF. ****Éviter les bulles.****
- 72) Hydragel 11 : appliquer 5 ml de mélange TTF. ****Éviter les bulles.****
- 73) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 6 (5 minutes)

- 74) Retirer la solution TTF, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 75) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 76) Laver le masque avec de l'eau et une lingette imbibée d'alcool.

Réhydratation du gel 3 (5 minutes)

- 77) Retirer les papiers filtres et ajouter le masque orange de lavage/réhydratation.
- 78) Hydragel 5 : ajouter 4,5 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 79) Hydragel 11 : ajouter 9,0 ml de solution de **réhydratation** au masque. ****Éviter les bulles.****
- 80) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Buvardage 7 (5 minutes)

- 81) Retirer la solution de réhydratation, puis le masque et ajouter les papiers filtres épais et fin, le verre et le poids.
- 82) Fermer le couvercle et appuyer sur START.
- 83) Laver le masque.

Séchage sur gel (10 minutes)

- 84) Ouvrir le couvercle et retirer les papiers filtres.
- 85) Fermer le couvercle et appuyer sur START.

Lavage et traitement final (25 minutes)

- 86) Ouvrir le couvercle et retirer le gel.
- 87) Le gel doit être immédiatement lavé dans le compartiment de coloration.
- 88) Ouvrir le support du gel et positionner le gel comme indiqué à la figure 14.

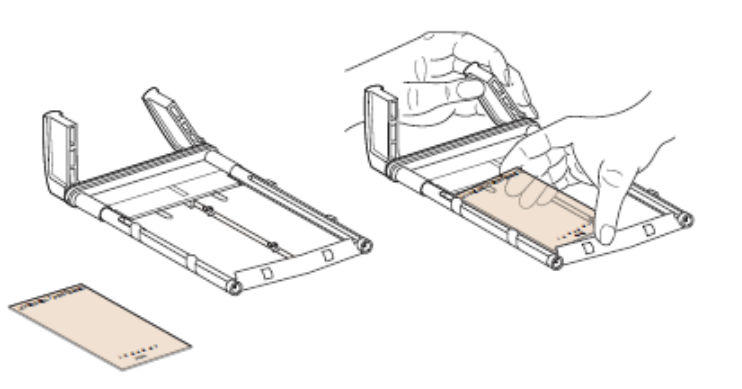


Figure 14. Analyseur Hydrasys

- 89) Fermer le support et le placer dans le module de traitement/coloration du gel.
- 90) S'assurer qu'au moins 400 ml de solution de décoloration sont présents et que le conteneur à déchets est vide.
- 91) Sélectionner le programme de lavage du FW dans le menu de l'instrument (écran RHS) et appuyer sur START.

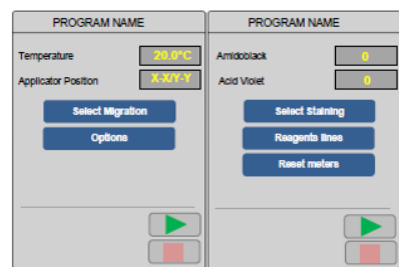




Figure 15. Analyseur Hydrasys

S'assurer que tous les masques sont lavés. Le masque TTP, l'unité de migration Hydrasys et les électrodes doivent être soigneusement nettoyés avec des lingettes alcoolisées.

Analyse du gel

- 92) Retirer le gel et le support du module de traitement/coloration du gel et les placer dans le module d'analyse.
- 93) Dans le programme Phoresis, créer une liste de travail en regard de l'icône de tableau . Commencer par le numéro 1 et ajouter les détails du patient, y compris l'identifiant unique (SID), le nom, la date de naissance, la date de l'échantillon, le numéro de l'hôpital et l'hôpital demandeur (pour le RHH, ajouter le consultant).
- 94) Hydrigel 5 : l'échantillon 5 est le contrôle normal (CQ).
- 95) Hydrigel 11 : les échantillons 1 et 11 sont le contrôle normal (CQ).
- 96) Cliquer sur  pour ouvrir la fenêtre d'analyse des gels et des échantillons.
- 97) La fenêtre suivante s'ouvrira :

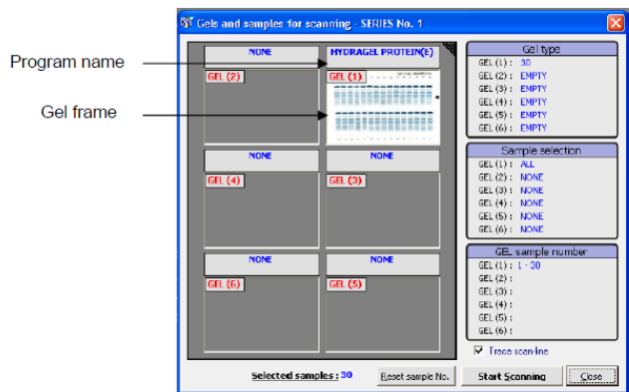



Figure 16. Analyseur Hydrasys

- 98) Sélectionner le programme du premier gel analysé en position 1. Appuyer sur la partie supérieure de l'écran RHS une fois pour Hydrigel 5 et deux fois pour Hydrigel 11 (une troisième pression ramène à 5).
- 99) Appuyer sur START.
- 100) Vérifier que le scanner a correctement identifié toutes les bandes. Dans certains cas, il passe à côté de la première bande des MBPM. Dans ce cas, choisir « Conservative gel localization mode to rescan the image », puis analyser à nouveau.
- 101) Lorsque les images apparaissent, cliquer sur l'analyse de la vue, puis sur la mosaïque  de courbes pour accéder à la densitométrie.
- 102) Les tracés de densitométrie individuels apparaîtront dans les cases :

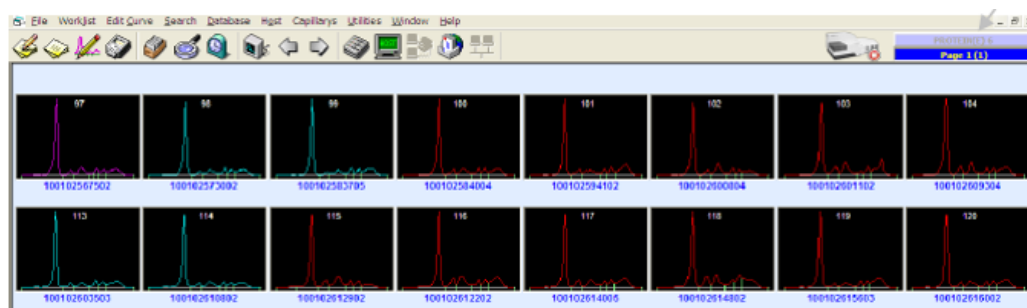


Figure 17. Analyseur Hydrasys

Cliquer sur la première pour l'ouvrir. **Commencer par le puits de CQ 5** pour Hydragel 5 ou 1/11 pour Hydragel 11. Les résultats du CQ apparaissent :

NB : si les résultats ne peuvent pas être évalués le jour du test, ils peuvent être obtenus de manière rétrospective. Ouvrir le programme Phoresis et sélectionner la date du test où se trouve la flèche noire sur la figure 18, puis procéder comme suit.

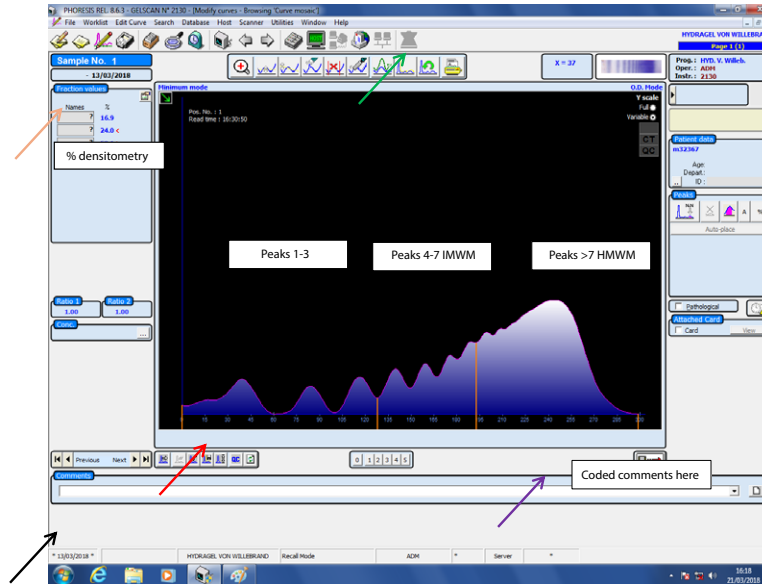


Figure 18. Analyseur Hydrasys

Définir le profil Reference en cliquant sur la 4^e icône sous la densitométrie (flèche **rouge**). Définir la courbe actuelle comme profil de référence. NB : choisir uniquement l'un des résultats de CQ pour Hydragel 11.

- 103) Cliquer sur la courbe de densitométrie pour définir les MBPM (pics 1–3), MPMI (pics 4–7) et MHPM (pics > 7).
- 104) Le pourcentage des pics apparaîtra et nécessitera un étiquetage (flèche **orange**).
- 105) Vérifier si les résultats du CQ se situent dans les plages attendues. Si ce n'est pas le cas, ne pas communiquer les résultats aux patients et prendre contact avec un spécialiste des tests. Enregistrer les résultats (icône de disquette) et passer aux patients suivants.
- 106) Répéter 101+102 avec chaque patient. Pour les résultats, cliquer pour superposer le schéma de CQ de référence (flèche **verte**).
- 107) À l'aide des plages de référence pour les adultes, décider si la densitométrie est normale ou anormale et choisir les commentaires appropriés dans la liste déroulante des commentaires (flèche **violet**). À noter qu'un seul commentaire peut être ajouté à chaque résultat. Le taux de MHPM est cliniquement le plus pertinent.

Tableau 29. Taux de MHPM et commentaire pouvant être ajouté aux résultats

Commentaires	Valeur
SRHMWM (légère réduction des multimères de haut poids moléculaire)	MHPM 30 %-bas de la plage normale
RHMWM (réduction des multimères de haut poids moléculaire)	MHPM 15-30 %
GRHMW (réduction brute des multimères de haut poids moléculaire)	MHPM < 15 %
SIHMWM (légère augmentation des multimères de haut poids moléculaire)	MHPM > haut de la plage normale
SILMWM (légère augmentation des multimères de bas poids moléculaire)	MHPM haut de la plage normale jusqu'à 26 %
ILMWM (augmentation des multimères de bas poids moléculaire)	MBPM > 26 %
QNORM/QNORM avec des quantités réduites	MBPM et MHPM dans les plages normales

- 108) Des tests répétés peuvent être nécessaires pour les échantillons avec des multimères très hauts ou très faibles. Parler à un expert en sciences biomédicales formé à ce dosage.
- 109) Une fois la fin de la liste des patients atteinte, cliquer sur l'onglet Edit curve, puis imprimer les rapports dans un fichier PDF via PDF Creator.
- 110) Cela exportera tous les résultats vers un dossier sur le Bureau (raccourci PDF). Trouver la date actuelle et la copier (ou l'envoyer) sur la clé USB.
- 111) Une copie JPEG du gel est également enregistrée dans les images. Copier (ou envoyer) sur la clé USB.
- 112) S'assurer que le gel est étiqueté avec la date d'analyse, le coller sur la feuille de travail et le classer dans le dossier des résultats.
- 113) S'assurer que les résultats de CQ normaux se situent dans les limites acceptables.
- 114) Effectuer et consigner le nettoyage mensuel au besoin.

Tableau 30. Plage de référence adulte pour les MBPM, MPMI et MHPM

	N	Moyenne (%)	Plage en % (IC à 95 %)
MBPM	51	17,3	11,8–23,6
MPMI	51	33,0	24,6–42,0
MHPM	51	49,9	35,0–58,5

Interprétation des tests du facteur Willebrand : la mW est le plus fréquent des troubles de la coagulation héréditaires avec une prévalence estimée pouvant atteindre 1 %. Seulement 10 % de ces personnes sont symptomatiques et 10 % des personnes symptomatiques se présentent à l'hôpital. Une estimation prudente de la prévalence est de 100 par million de personnes, dont environ 80 % dans le monde en développement. La mW est due à une déficience quantitative et/ou qualitative en FW, une protéine du plasma. Contrairement à la plupart des autres facteurs de coagulation, le FW est une protéine qui adhère à différents ligands incontournables dans la cascade de la coagulation. Il se lie au récepteur GPIIb des plaquettes et du collagène sous-endothélial, entraînant une adhésion plaquettaire. Il agrège également les plaquettes en se liant au récepteur GPIIb/IIIa. L'autre fonction importante du FW est d'agir en tant que protéine porteuse du facteur VIII et de prévenir la dégradation protéolytique du facteur VIII. En l'absence de FW, la demi-vie du facteur VIII est réduite de 8 à 12 heures à deux heures. La mW peut être classée en trois principaux sous-types, en fonction des anomalies quantitatives (type 1 et 3) et qualitatives (type 2). La mW de type 2 est en outre subdivisée en quatre sous-types, 2A, 2B, 2M et 2N. Les phénotypes biologiques des différents sous-types sont repris dans le tableau 31.

- 1) mW de type 1 : anomalie quantitative partielle du FW.
- 2) mW de type 2 : anomalie qualitative. Une ou plusieurs fonctions du FW sont anormales, comme l'indique le dosage de l'activité du FW (décrit ci-dessous)..
 - a. mW de type 2A : perte ou déficit sélectif des MHPM. Les multimères les plus grands sont les formes les plus actives sur le plan fonctionnel. La perte sélective de ces multimères entraîne une diminution de l'adhésion plaquettaire dépendante du FW et de la capacité de liaison au collagène.
 - b. mW de type 2B : affinité accrue du FW pour le récepteur plaquettaire GPIIb conduisant à une liaison spontanée du FW aux plaquettes qui est éliminée de la circulation, entraînant une perte de MHPM et une thrombocytopénie. De grosses plaquettes et des amas de plaquettes peuvent en outre apparaître sur le frottis périphérique. La mW de type plaquettaire (pseudo-mW) peut également présenter un phénotype similaire.
 - c. mW de type 2M : diminution de l'adhésion plaquettaire dépendante du FW sans perte de MHPM. Répartition multimérique normale.
 - d. mW de type 2N : moindre affinité de liaison du FW pour le facteur VIII.
- 3) TmW de type 3 : absence totale/taux indétectables de FW, généralement VWF:Ag < 3 UI/dl.

Variables pré-analytiques dans le diagnostic de la mW : les problématiques pré-analytiques peuvent considérablement influencer le diagnostic de la maladie de Willebrand. Le facteur Willebrand et le facteur VIII sont des réactifs de la phase aiguë qui peuvent augmenter après une inflammation, un traumatisme, un stress, une grossesse et une activité physique, masquant potentiellement un diagnostic de mW. Le prélèvement d'échantillons doit être évité à ces moments, ou le test doit être répété à un autre moment, avant d'exclure un diagnostic de mW. Une collecte, un transport et un traitement inadéquats des échantillons (tubes sous-remplis, échantillon ou sérum coagulé, retard dans le transport des échantillons ou transport d'un échantillon de sang total réfrigéré ou dans de la glace, gel-dégel inefficace ou cycles de gel-dégel répétés, etc.) peuvent compromettre le diagnostic de mW. Les échantillons de FW doivent idéalement être collectés et traités sur le même site pour éviter de telles erreurs.

Tests à disposition pour le diagnostic de la mW :

Tests de dépistage

Antécédents hémorragiques et outil d'évaluation des saignements (BAT pour *bleeding assessment tool*) : les antécédents hémorragiques peuvent être considérés comme le premier test de dépistage dans l'évaluation d'un patient présentant des symptômes hémorragiques. Un recueil minutieux quant à la nature et à la fréquence des saignements, associé aux antécédents familiaux, peut donner des indices importants sur le diagnostic. Les saignements cutanéomuqueux (p. ex. saignements cutanés, saignements des gencives, épistaxis, saignements de plaies mineures, saignements gastro-intestinaux et ménorragies) sont le schéma typique des saignements observés dans la mW. L'hémarthrose est rare et n'est généralement observée que dans la mW de type 3 lorsque le facteur VIII est considérablement abaissé. Les nouvelles lignes directrices soulignent l'importance des antécédents hémorragiques et de l'utilisation des BAT. Il existe de nombreux BAT : Vicenza, MCMDM-1, grille d'évaluation illustrée des pertes sanguines (*Pictorial Blood Loss Assessment Chart*, PBAC) et questionnaire sur les saignements pédiatriques. En 2010, l'ISTH a proposé un nouveau BAT comprenant 14 symptômes hémorragiques, chacun classé de 0 à 4. La plage de référence pour le BAT de l'ISTH, dérivée de 1040 adultes sains et 330 enfants, était < 3 pour les enfants, < 4 pour les hommes adultes et < 6 pour les femmes adultes. La principale valeur clinique du BAT est d'exclure un trouble de la coagulation. Dans un contexte de faible prévalence, Tosetto *et al.* ont constaté qu'un score ≤ 3 avait une valeur prédictive négative de 99,2 %, ce qui fondamentalement exclut un trouble de la coagulation. L'ISTH recommande d'utiliser un BAT validé pour dépister les patients ayant une faible probabilité de mW (en contexte de soins primaires notamment). Il n'est toutefois pas fiable d'utiliser un BAT lorsque la probabilité de mW est intermédiaire (p. ex. personnes orientées vers un hématologue) ou élevée (personnes dont un apparenté au premier degré est affecté entre autres).

Temps de saignement (TS) : le TS est un test *in vivo* pour l'hémostase primaire décrit pour la première fois en 1901 par le médecin français Milian, puis modifié par Duke en 1910. La sensibilité globale du TS pour le diagnostic de la maladie de Willebrand se situe autour de 60 % (21 à 72 %), mais elle est très bonne pour la forme sévère (100 % pour le type 3). Par conséquent, cela reste un test utile dans un contexte de ressources limitées pour différencier l'hémophilie A de la mW sévère.

Analyseur de la fonction plaquettaire 200 : l'analyseur PFA100/200 (Siemens, Dade Behring, Allemagne) est un appareil conçu pour mesurer l'hémostase primaire en cas de forces de cisaillement élevées. Il enregistre le temps qu'il faut au sang total d'un patient pour former un bouchon plaquettaire stable au niveau de l'ouverture de l'appareil, ce qui l'obstrue. Ce temps est consigné sous le nom de « temps d'occlusion ». Le PFA100/200 a montré une sensibilité globale d'environ 85 à 90 %, avec une sensibilité de près de 100 % à la mW de types 2 et 3. La sensibilité de la mW de type 1 variait en fonction des taux de FW. Le PFA100/200 est un instrument coûteux, qui n'est pas disponible dans la plupart des pays à revenu faible et intermédiaire.

Temps de céphaline activée (TCA) : le TCA n'est allongé que dans les cas de mW sévère lorsque le facteur VIII est également abaissé, généralement dans le type 3, le type 2N et certains sous-types du type 1 et 2, en fonction des taux de VWF:Ag.

Dosages spécifiques du facteur Willebrand pour le diagnostic de la maladie de Willebrand : la classification de la mW nécessite des tests pour à la fois quantifier la protéine FW et évaluer la fonction du FW. Le FW se lie (1) aux plaquettes et au collagène sous-endothélial pour favoriser l'adhésion plaquettaire, (2) aux plaquettes activées pour favoriser l'agrégation plaquettaire et (3) au facteur VIII pour prévenir sa dégradation prématurée. Les dosages fonctionnels pour la mW évaluent une ou plusieurs de ces fonctions du FW. Un écart entre le dosage fonctionnel et le dosage de l'antigène suggère une anomalie qualitative, vérifiée par le calcul du rapport entre le dosage de l'activité du FW et l'antigène. Un rapport < 0,6 ou < 0,7 peut être utilisé selon la préférence du laboratoire.

Antigène du facteur Willebrand (VWF:Ag) : le dosage mesure la quantité totale de protéine FW présente dans l'échantillon, sous les formes à la fois fonctionnelles et non fonctionnelles. La méthodologie la plus couramment utilisée est le LIA automatisé. Il est également possible de faire appel aux méthodes basées sur ELISA et, plus récemment, CLIA dans l'instrument HemosIL AcuStar.

Dosages de l'activité du facteur Willebrand dépendante des plaquettes ou de la GP1b : ils mesurent spécifiquement la capacité du FW à se lier aux plaquettes, et sont donc utilisés pour différencier la mW de type 1 de la mW de type 2A/2B/2M.

- 1) *Dosage du cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) :* en l'absence de contrainte de cisaillement, la ristocétine agit comme un substitut pour induire des altérations du FW et provoquer une agglutination plaquettaire-FW. Le degré d'agglutination est proportionnel à la quantité de FW fonctionnel présente dans le plasma, qui peut être mesurée soit à l'aide d'un agrégomètre, soit par l'augmentation de la turbidité par des méthodes automatisées. Le dosage VWF:RCo automatisé a montré une précision et une limite de détection améliorées par rapport aux méthodes basées sur l'agrégométrie.

Le dosage VWF:RCo présente des limites importantes, dont un CV inter- et intra-laboratoire élevé, avec un potentiel de résultats faussement élevés ou faussement faibles. En outre, la limite de détection inférieure est élevée, généralement comprise entre 8 et 20 UI/dl, ce qui pose un problème pour identifier les variants de type 2 lorsque les taux de VWF:Ag sont faibles. Certains polymorphismes couramment observés dans la population africaine peuvent conduire à des taux de VWF:RCo faussement bas, même en l'absence de mW.

- 2) **VWF:GP1R** : ce dosage est similaire au VWF:RCo, les plaquettes étant remplacées par des microparticules (billes de latex dans le LIA [HemosIL] et particules magnétiques dans le CLIA [AcuStar]), enrobées de fragments de GP1b de type sauvage recombinante. Le CV est moindre et les limites de détection sont inférieures à celles du dosage VWF:RCo original. Son utilité clinique dans la mW a été démontrée dans diverses études.
- 3) **VWF:GP1M** : contrairement aux autres dosages du FW dépendant des plaquettes, celui-ci ne fait pas appel à la ristocétine. Les plaquettes sont remplacées par des fragments de GP1b recombinante avec des mutations de gain de fonction auxquelles le FW se liera « spontanément ». Le VWF:GP1bM peut être mesuré par LIA (Siemens Innovance VWF Ac) ou même par quelques méthodes non commerciales basées sur ELISA. Le test bénéficie d'une bonne reproductibilité et d'une faible limite de détection et fournit des informations comparables aux tests VWF:RCo et VWF:GP1bR pour le diagnostic de mW de type 2.
- 4) **VWF:Ab** : ce test est basé sur des anticorps monoclonaux dirigés contre le site de liaison plaquettaire (c'est-à-dire GP1b) du FW. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un véritable test fonctionnel, il peut être considéré comme un substitut de l'activité de liaison plaquettaire. Plusieurs études ont démontré l'utilité du test VWF:Ab automatisé (activité du FW HemosIL, IL, Bedford, Massachusetts) dans l'évaluation initiale et la sous-classification de la mW.

De nouvelles lignes directrices recommandent d'utiliser des dosages plus récents de l'activité de la fonction plaquettaire du FW, tels que VWF:GP1bR et VWF:GP1bM par rapport au VWF:RCo (automatisé ou non automatisé).

Dosage de la liaison au collagène (VWF:CB) : il évalue la capacité du FW à se lier au collagène et dépend de la présence de MHPM et d'un site de liaison au collagène intact. Il peut être utilisé en remplacement de l'analyse des multimères pour différencier le type 2A du type 2M. Le rapport VWF:CB/antigène est normal dans le type 2M et réduit dans le type 2A/2B. Le dosage VWF:CB s'est avéré plus efficace pour distinguer la mW de type 1 du type 2 (sauf 2M) que le dosage VWF:RCo. Il peut être utilisé pour distinguer la mW de type 1 sévère de la mW de type 3 en raison de sa meilleure limite de détection. Le VWF:CB peut être mesuré par divers tests ELISA commerciaux et non commerciaux, et plus récemment par la méthode CLIA.

Agglutination plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA) : la réaction d'agglutination à des doses de ristocétine normales (> 1 mg/ml) et faibles (< 1 mg/ml) est l'un des tests utilisés dans le diagnostic de la mW. Bien que l'absence de réaction puisse être observée dans le type 3 et les sous-types de la mW sévère, sa principale utilité réside dans l'identification de la mW de type 2B et de type plaquettaire, où la réaction est observée même à de faibles doses de ristocétine. La différenciation entre type 2B et type plaquettaire peut être établie par provocation avec du cryoprécipité ou études de mélange avec du plasma normal et/ou des plaquettes témoins. Le cas échéant, il convient d'avoir recours à des tests génétiques.

Dosage de la liaison au facteur VIII : il s'agit ici d'évaluer la capacité du FW à se lier au facteur VIII. Un dosage VWF:FVIIIb faible et un moindre rapport VWF:FVIIIb/VWF:Ag suggèrent une mW de type 2N.

Analyse des multimères : l'évaluation des multimères du FW est un test établi dans l'évaluation de la mW, essentiellement pour différencier le type 2A du type 2M. Le test est toutefois très laborieux et techniquement exigeant et disparaît rapidement de la plupart des laboratoires.

Test à la desmopressine : le type 1C (Vicenza) est un sous-type de la mW de type 1 associé à une clairance accrue du FW. Les patients présentent une réponse exagérée à la desmopressine, mais avec une durée de vie raccourcie. Un rapport propeptide du FW/VWF:Ag supérieur à la normale est aussi observé chez ces patients.

Tableau 31. Phénotype biologique des différents sous-types de mW

Type de mW	FVIII	Antigène du facteur Willebrand (VWF:Ag)	Dosages de l'activité du FW dépendante des plaquettes*	Dosage de la liaison au collagène (VWF:CB)	Dosage de la liaison au facteur VIII (VWF:FVIIIIB)	Rapport activité de la fonction plaquettaire du FW/Ag [§]	Rapport VWF:CB/Ag [§]	Analyse des multimères	Agglutination plaquettaire induite par la ristocétine (RIPA)	Commentaires
mW type 1	Abaissé ou normal	Abaissé	Abaissé	Abaissé	Normal	Normal	Normal	Normal	Abaissé ou normal	Les taux de FW < 30 UI/dl ou compris entre 30 et 50 UI/dl avec saignement anormal correspondent à une mW de type 1 selon les nouvelles lignes directrices. Sinon, les taux de FW de 30 à 50 UI/dl peuvent être classés comme faibles avec léger risque de saignement.
mW type 2A	Abaissé ou normal	Abaissé ou normal	Abaissé	Abaissé	Normal	Abaissé	Abaissé	Perte des multimères de poids moléculaire haut et intermédiaire	Généralement abaissé	2A et 2B peuvent être distingués par RIPA.
mW type 2B	Abaissé ou normal	Abaissé ou normal	Abaissé	Abaissé	Normal	Abaissé	Abaissé	Perte des MHPM	Réaction observée à faible dose de ristocétine	Distinction type 2B versus plaquettaire par études de mélange RIPA ou tests génétiques
mW type 2M	Abaissé ou normal	Abaissé ou normal	Abaissé	Abaissé	Normal	Abaissé	Généralement normal	Normal	Abaissé ou normal	La mW de type 2M avec anomalie de liaison au collagène peut avoir un rapport VWF:CBA/Ag réduit.
mW type 2N	Abaissé (rapport FVIII/VWF:Ag généralement < 0,7)	Généralement normal [#]	Généralement normal [#]	Généralement normal [#]	Abaissé	Normal	Normal	Normal	Normal	Phénotype similaire à l'hémophilie A mineure/modérée ou au porteur ou à la porteuse. Confirmé avec dosage VWF:FVIIIIB ou test génétique.
mW type 3	Abaissé, généralement 1-10 UI/dl	Abaissement prononcé < 2 UI/dl	Abaissement prononcé	Abaissement prononcé	S/O	S/O	S/O	Absent	Absence de réaction qui se corrige lors de l'ajout de cryoprécipité	Les rapports activité du FW/antigène ne doivent pas être calculés.

*Les dosages du FW dépendant des plaquettes comprennent VWF:RCO, VWF:GP1M, VWF:GP1R ou VWF:Ab.

[#] Les dosages du VWF:Ag ou de l'activité peuvent être réduits dans la mW de type 2N, lorsqu'ils sont observés dans un état hétérozygote composite associé à des mutations nulles/quantitatives du FW.

[§] Pour déterminer une anomalie qualitative, le rapport entre le dosage de l'activité du FW et le dosage de l'antigène est calculé. Un rapport inférieur à 0,6 ou 0,7 peut être utilisé (selon la préférence du laboratoire) pour classer la mW de type 2.

Diagnostic de la maladie de willebrand dans les contextes pauvres en ressources : la mW est le plus fréquent des troubles de la coagulation héréditaires avec une prévalence estimée de 1 %. Une estimation prudente de la prévalence est de 100 par million de personnes, dont environ 80 % dans le monde en développement. Seuls 2,6 % du total des cas de mW déclarés sont originaires d'Asie du Sud et d'Afrique

subsaharienne, bien qu'ils représentent environ 40 % de la population mondiale totale. La mW comporte trois sous-types principaux. La mW de type 3 est due à un déficit quantitatif sévère en FW dû à des taux indétectables de FW. Le type 1 est dû à un déficit quantitatif partiel. La mW de type 2 est une anomalie qualitative et se subdivise en quatre sous-types, 2A, 2B, 2M et 2N. Il existe une grande disparité dans la répartition des sous-types de mW dans les différentes régions du monde. Dans la plupart des pays à revenu élevé et intermédiaire de la tranche supérieure (PRE et PRITS), le type 1 est le sous-type le plus courant (60 à 80 %), suivi du type 2. La mW de type 3 est rare et représente généralement moins de 5 % des cas. En revanche, la mW de type 3 est plus fréquente dans de nombreux pays à revenu faible et intermédiaire de la tranche inférieure (PRF et PRITI), atteignant 64 % dans certaines régions, ce qui est bien résumé dans un article de synthèse de Favaloro *et al.* Cette différence frappante dans la distribution peut s'expliquer par le fait que la plupart des données des PRITI proviennent de dossiers hospitaliers où seuls les patients les plus sévères sont susceptibles de se présenter, les cas plus légers n'étant pas détectés. Un autre facteur est une consanguinité accrue et les mariages au sein de petites communautés, ce qui augmente l'incidence de la mW de type 3, une maladie héréditaire autosomique récessive. La sous-déclaration de la maladie de Willebrand est considérable, en particulier dans les PRF et PRITI. Stonebraker *et al.* ont signalé que la prévalence moyenne de la mW dans les PRE, les PRITS, les PRITI et les PRF était de 60,3, 12,6, 2,5 et 1,1 par million, respectivement, ce qui était significativement différent par rapport à la classification des revenus, souvent < 1 par million dans de nombreux PRF. Cependant, la variabilité de la prévalence de la mW de type 3 est moins prononcée, ce qui suggère que les patients atteints du type 3 ont été diagnostiqués plus fréquemment que les autres sous-types dans ces pays.

Obstacles au diagnostic de la maladie de Willebrand dans un environnement pauvre en ressources

Priorité moindre pour les soins de santé et les troubles de la coagulation : les soins de santé sont très peu prioritaires, sur le plan social et politique, dans la plupart des pays en développement où seulement 1 à 2 % du produit intérieur brut leur est alloué. Sur ce budget limité, les questions plus urgentes d'importance pour la santé publique, telles que les maladies infectieuses, la mortalité infantile et maternelle et la malnutrition, prévalent sur des affections relativement plus rares comme les troubles héréditaires de coagulation, dont la mW.

Accès limité aux établissements de soins et coûts élevés des soins : dans de nombreux pays en développement, l'infrastructure des soins de santé est peu développée et les hôpitaux, moins nombreux, ne sont pas facilement accessibles à tous. Cela pourrait être la raison de l'incidence plus élevée de la mW sévère dans les pays en développement où seules les personnes à tendance hémorragique les plus sévères se présentent à l'hôpital. Le coût élevé des investigations, la non-prise en charge des frais de déplacement, l'obligation de cesser tout recrutement pour les investigations et la couverture minimale de l'assurance maladie contribuent tous au sous-diagnostic des cas de mW mineure.

Non-disponibilité des réactifs du FW et manque d'infrastructures de laboratoire : les nouvelles lignes directrices de 2021 pour la maladie de Willebrand suggèrent l'utilisation de dosages de l'activité plaquettaire, tels que VWF:GP1R et VWF:GP1M, pour le diagnostic de la maladie de Willebrand. Pourtant, ces kits ne sont pas disponibles ni utilisés dans la plupart des PRITI et PRF. D'autres problématiques, comme les retards d'approvisionnement en réactifs, le mauvais entretien des infrastructures de transport, la faible sous-traitance des échantillons, la courte durée de conservation des réactifs et le nombre réduit de centres de référence, contribuent également à la rareté des installations de test du FW.

Comment surmonter les obstacles au diagnostic de la maladie de Willebrand dans un environnement pauvre en ressources

Amélioration de l'identification des cas de maladie de Willebrand à l'aide de BAT et de tests de dépistage peu coûteux et facilement accessibles : les tests de dépistage de la mW comprennent le temps de saignement (TS) et le temps d'occlusion sur l'analyseur de la fonction plaquettaire (PFA200). Dans notre centre, nous avons soumis à analyse une vaste cohorte de patients (n = 444) présentant un FW abaissé

< 50 UI/dl parmi les patients évalués pour une suspicion de troubles de la coagulation sur une période de sept ans, de janvier 2012 à mars 2019. Le phénotype de la majorité des patients était de type 3 (48,3 %), conformément à d'autres études publiées en Inde. En fonction de la sévérité sur la base des taux VWF:RCo, les patients ont également été sous-classés comme étant des cas sévères (< 10 %), modérés (10-30 %) et légers (30 %), selon la classification proposée par Federici *et al.* (2014). La sensibilité globale du TS et du PFA200 était de 72 % et 95 %, comme le montre la figure 19. Il est important de noter que le TS présentait une sensibilité de 100 % dans l'identification de la mW de type 3 et une sensibilité très élevée de 92 % dans la mW sévère, y compris les cas de type 1 et de type 2 sévères. Le TS était comparable au PFA200 dans ces deux catégories. Dans l'ensemble, un score anormal du BAT de l'ISTH a été observé dans 75 % des cas de mW.

Depuis l'apparition du PFA200 en 1995, de nombreuses publications soutiennent son utilisation pour le diagnostic et le suivi de la mW, et il a remplacé le temps de saignement comme test de dépistage de la mW dans la plupart des pays développés. L'ensemble des lignes directrices découragent également l'utilisation du TS dans le bilan diagnostique de la mW. La sensibilité du TS et du PFA100/200 est similaire pour les dysfonctions plaquettaires et pour la mW sévère. Bien que le PFA100/200 ait une bonne sensibilité à la mW, il s'agit d'un instrument coûteux que la plupart des laboratoires des pays en développement ne peuvent pas utiliser et qui ne peut donc pas remplacer le TS dans ce contexte. La majorité des cas de mW dans les PRF et les PRITI se présentent avec une forme sévère dont le diagnostic souvent n'est pas établi ou est établi à tort comme une hémophilie A. En conditions de ressources limitées, où l'infrastructure de laboratoire, les installations et la disponibilité des réactifs sont restreintes, le temps de saignement est un test de dépistage d'un bon rapport coût-efficacité pour identifier la mW sévère chez les patients ayant des antécédents hémorragiques/familiaux importants. Les cas potentiels doivent de préférence être identifiés à l'aide d'un BAT, tel que celui de l'ISTH. Il est important de noter que le TS ne doit être utilisé que chez les patients suspectés d'avoir des troubles de la coagulation et non comme test de dépistage préopératoire ou pour évaluer la réaction aux médicaments antiplaquettaires. En outre, les cas plus légers de mW peuvent avoir un TS normal et ne pas être détectés.

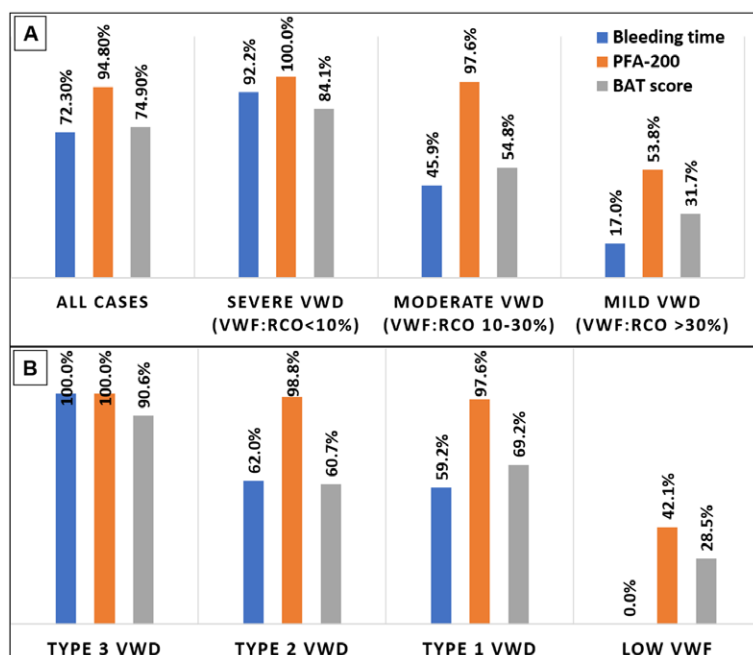


Figure 19. Sensibilité globale du TS et du PFA200

Approche d'un bon rapport coût-efficacité pour effectuer les dosages du FW : l'un des principaux revers des tests de la mW est que la plupart des kits du commerce sont coûteux et inabordables pour la plupart des laboratoires des PRF et PRITI. Cependant, de nombreux tests (antigène du FW, liaison au collagène et

liaison au facteur VIII notamment) peuvent également être effectués selon des méthodes ELISA internes manuelles qui réduisent considérablement le coût. L'utilisation d'un panel minimaliste comprenant TS, TCA, FVIII, VWF:Ag et VWF:CBA peut identifier la plupart des sous-types de mW (à l'exception du type 2M) et un diagnostic provisoire peut être posé avec une confiance raisonnable. Le diagnostic du type 2M nécessite un dosage de l'activité plaquettaire, tel que le dosage du cofacteur de la ristocétine, et le recours à ce seul panel risquerait de passer à côté du diagnostic.

Le dosage manuel du cofacteur de la ristocétine par agrégométrie est un test très laborieux et très chronophage, présentant le défaut d'un CV élevé et d'une limite de détection très élevée. L'automatisation du VWF:RCo en a nettement amélioré le CV et abaissé la limite de détection. Un autre avantage de l'automatisation est l'utilisation de volumes d'échantillons et de réactifs moins importants (la ristocétine est un réactif coûteux), ce qui réduit le coût par test. Cependant, l'utilisation continue de ce test nécessite suffisamment d'adressages de patients et de demandes de test. Peu d'études ont été publiées sur l'utilisation de méthodes ELISA non commerciales pour le FW:GP1bR et le FW:GP1bM, qui sont par ailleurs des options à explorer. Cela nécessite toutefois une expertise technique, la disponibilité de réactifs et un personnel motivé.

Étant donné que les tests manuels peuvent être sujets à erreurs, il est nécessaire de suivre des mesures de contrôle qualité strictes, telles que l'exécution en double ou en triple dans les analyses ELISA, l'analyse d'échantillons normaux (PNP) et anormaux en parallèle à chaque cycle, et le respect de la procédure d'assurance externe de la qualité pour assurer l'exactitude des résultats.

Récemment, un dispositif basé sur une carte de biologie délocalisée a été développé par l'*Indian Council of Medical Research (ICMR)–National Institute of Immunohematology (NIIH)*, Mumbai, pour le diagnostic de la mW sévère et de l'hémophilie sévère/modérée avec des taux de FVIII et de FW inférieurs à 5 UI/dl. Il s'agit d'un test rapide, d'un bon rapport coût-efficacité pouvant être utilisé dans les zones desservies par des unités mobiles pour un diagnostic provisoire d'hémophilie A sévère/modérée et de mW de type 3. Le dispositif est actuellement en attente d'études de validation avant utilisation sur le marché.

Conclusion : on estime que 80 % des cas de mW proviennent de pays en développement. Dans de nombreux PRF et PRITI, plus de 99 % des cas de maladie de Willebrand ne sont pas identifiés et/ou signalés. Les lignes directrices applicables dans le reste du monde pourraient ne pas être appropriées dans ce contexte en raison du manque de réactifs, de centres de formation et d'infrastructures de laboratoire. La première étape pour améliorer le signalement des cas consiste à accroître la sensibilisation à l'utilisation d'outils simples, allant du BAT pour identifier les patients présentant d'éventuels troubles de la coagulation au dépistage de cas suspects à l'aide de tests facilement disponibles tels que le TS et le TCA. D'autres tests (antigène du FW et/ou CBA) peuvent faire appel à la méthode ELISA, ou les patients peuvent, dans la mesure du possible, être orientés vers un centre tertiaire pour des tests plus spécialisés.

Références

- Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: Age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Balluet R, Bourguignon A, Geay-Baillat MO, Le Quellec S. [Discrepancies in FVII:C levels depending on the thromboplastin: About a case]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2020; 78(2): 198-200.
- Bowyer AE, Goodfellow KJ, Seidel H, Westhofen P, Stufano F, Goodeve A, Kitchen S, Makris M. Evaluation of a semi-automated von Willebrand factor multimer assay, the Hydragel 5 von Willebrand multimer, by two European Centers. *Res Pract Thromb Haemost* 2018; 2(4): 790-799.

- Casonato A, Galletta E, Sarolo L, Daidone V. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia* 2018; 24(1): 134-140.
- Casonato A, Pontara E, Zerbinati P, Zucchetto A, Girolami A. The evaluation of factor VIII binding activity of von Willebrand factor by means of an ELISA method: Significance and practical implications. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(3): 347-352.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Determination of coagulation factor activities using the one-stage clotting assay, 2nd edition. CLSI standard H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.
- Di Felice G, Vidali M, Parisi G, Pezzi S, Di Pede A, Deidda G, D'Agostini M, Carletti M, Ceccarelli S, Porzio O. Reference intervals for coagulation parameters in developmental hemostasis from infancy to adolescence. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12(10): 2552.
- Durda MA, Wolberg AS, Kerlin BA. State of the art in factor XIII laboratory assessment. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(6): 700-704.
- Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): Detection of von Willebrand's disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost* 2000; 83(1): 127-135.
- Favaloro EJ. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(8): 709-733.
- Favaloro EJ. Von Willebrand disease: Local diagnosis and management of a globally distributed bleeding disorder. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 440-455.
- Favaloro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Hematol* 2017; 92(1): 114-118.
- Favaloro EJ. The role of the von Willebrand factor collagen-binding assay (VWF:CB) in the diagnosis and treatment of von Willebrand disease (VWD) and way beyond: A comprehensive 36-year history. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(1): 43-80.
- Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S. Evaluating performance of contemporary and historical von Willebrand factor (VWF) assays in the laboratory identification of von Willebrand disease (VWD): The Australasian experience. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 711-731.
- Favaloro EJ, Pasalic L. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease in the age of the new guidelines: Considerations based on geography and resources. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(5): 102143.
- Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Mazzucconi MG, Morfini M, Rocino A, Schiavoni M, Peyvandi F, Rodeghiero F, Mannucci PM. The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease. *Blood* 2014; 123(26): 4037-4044.
- Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Christopherson PA, Jacobi PM, Hoffmann RG, Montgomery RR, Haberichter SL. Collagen binding provides a sensitive screen for variant von Willebrand disease. *Clin Chem* 2013; 59(4): 684-691.
- Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 329-339.
- Fu M, Liu J, Xing J, Dai Y, Ding Y, Dong K, Zhang X, Yuan E. Reference intervals for coagulation parameters in non-pregnant and pregnant women. *Sci Rep* 2022; 12(1): 1519.
- James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021; 5(1): 280-300.
- Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Factor XIII deficiency diagnosis: Challenges and tools. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.
- Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.
- Kujovich JL. Coagulopathy in liver disease: A balancing act. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015; 2015: 243-249.

Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, Millar CM, Keeling DM. The diagnosis and management of von Willebrand disease: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *British J Haematol* 2014; 167(4): 453-465.

Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood* 2018; 131(17): 1903-1909.

Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.

Nair SC, Viswabandya A, Srivastava A. Diagnosis and management of von Willebrand disease: A developing country perspective. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 587-594.

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(6): 959-964.

Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: Diagnosis and treatment. *Blood* 2015; 125(13): 2052-2061.

Platton S, Baker P, Bowyer A, Keenan C, Lawrence C, Lester W, Riddell A, Sutherland M. Guideline for laboratory diagnosis and monitoring of von Willebrand disease: A joint guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation and the British Society for Haematology. *Br J Haematol* 2024; 204(5): 1714-1731.

Rodgers SE, Lerda NV, Favaloro EJ, Duncan EM, Casey GJ, Quinn DM, Hertzberg M, Lloyd JV. Identification of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia: A cross-laboratory investigation using different methods. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(2): 269-276.

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2000; 84(2): 160-174.

Salazar E, Long TA, Smock KJ, Wool GD, Rollins-Raval M, Chen D et al. Analysis of College of American Pathologists von Willebrand Factor Proficiency Testing Program. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 690-699.

Seidizadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Von Willebrand disease type 2N: An update. *J Thromb Haemost* 2021; 19(4): 909-916.

Sevenet PO, Kaczor DA, Depasse F. Factor VII deficiency: From basics to clinical laboratory diagnosis and patient management. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017; 23(7): 703-710.

Srivastava A, Rodeghiero F. Epidemiology of von Willebrand disease in developing countries. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(5): 569-576.

Stonebraker JS, Iorio A, Lavin M, Rezende SM, Srivastava A, Pierce GF, Coffin D, Tootoonchian E, Makris M. Reported prevalence of von Willebrand disease worldwide in relation to income classification. *Haemophilia* 2023; 29(4): 975-986.

Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Pooter N. Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations. Results of a multicentre study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost* 2016; 116(1): 9-16.

Vangenechten I, Mayger K, Smejkal P, Zapletal O, Michiels JJ, Moore GW, Gadisseur A. A comparative analysis of different automated von Willebrand factor glycoprotein Ib-binding activity assays in well typed von willebrand disease patients. *J Thromb Haemost* 2018; 16(7): 1268-1277.

Wakeman L, Munro R, Dorward N, Benton A, Gibb A, Al-Ismaïl S. New coagulation assays reference ranges for healthy adults using the modern Sysmex CA-1500 Coagulometer. *Blood* 2005; 106(11): 4025.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Zheng C, Zhang B. Combined deficiency of coagulation factors V and VIII: An update. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(6): 613-620.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Effects of pre-analytical storage time, temperature, and freeze-thaw times on coagulation factors activities in citrate-anticoagulated plasma. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.