

SUJETS ABORDÉS

- ✓ Dosages basés sur le TP (dosage en un temps des facteurs II, V, VII et X)
- ✓ Dosages basés sur le TCA (dosage en un temps du FXI, du FXII, de la PKK ou du KHPM)
- ✓ Facteur XIII : dépistage, activité et antigène

Dosages basés sur le TP (dosage en un temps des facteurs II, V, VII et X) : les déficits en facteurs de coagulation II, V, VII ou X sont des troubles de la coagulation rares (Mumford *et al.*, 2014). Les dosages de l'activité du facteur II, V, VII ou X peuvent être effectués à l'aide d'un dosage en un temps basé sur le TP. Celui-ci compare la capacité des dilutions d'un plasma étalon ou de référence et du plasma d'un patient à corriger le TP d'un plasma totalement déficient en facteur de coagulation à mesurer. Dans le dosage du facteur V par exemple (décrit ci-dessous), le plasma est déficient en facteur V mais contient des quantités normales de tous les autres facteurs de coagulation, y compris II, VII, X, et du fibrinogène. Les facteurs de coagulation II, VII et X peuvent être analysés de manière similaire, en remplaçant le plasma déficient en facteur V dans l'exemple donné ci-dessous par le plasma déficient correspondant, et en utilisant un plasma de référence (étalon) avec une concentration connue du facteur à mesurer (Baker *et al.*, 2020).

Réactifs :

- ✓ Plasma déficient en facteur. Il peut s'agir d'un déficit en facteur V congénital ou artificiel (plasma vieilli).
- ✓ Tampon véronal d'Owren.
- ✓ Plasma à tester citraté pauvre en plaquettes.
- ✓ Pour l'étalon, il est préférable d'utiliser un plasma de référence disponible dans le commerce ou, en cas d'indisponibilité, un pool de plasma normal pauvre en plaquettes de 20 personnes donneuses (maintenu à -70 °C au minimum).
- ✓ Plasma de contrôle interne de qualité, disponible dans le commerce ou d'origine locale (CLSI, 2016).
- ✓ Réactif thromboplastine qui doit contenir du chlorure de calcium. Il est recommandé d'utiliser la même thromboplastine que celle utilisée dans le TP, mais une autre thromboplastine peut être utilisée pour le diagnostic de patients inhabituels.

Méthode : décanter suffisamment de réactif thromboplastine dans un tube en verre de 75 × 12 mm. Laisser réchauffer à 37 °C pendant cinq minutes. Si le réactif thromboplastine ne contient pas de calcium, celui-ci doit être ajouté séparément. Décanter suffisamment de CaCl₂ M/40 dans un tube en verre de 75 × 12 mm. Laisser réchauffer à 37 °C pendant cinq minutes. Pour les plasmas à tester (en double), de CQ et de référence, préparer des dilutions dans des tubes en plastique, comme indiqué dans le tableau 32.

Tableau 32. Préparation des dilutions des plasmas à tester, de CQ et de référence pour le dosage en un temps des facteurs II, V, VII et X

Dilution	Plasma (ml)	TSO (ml)
1/5	0,1	0,4
1/10	0,1	0,9
1/20	0,5 (dilution 1/10)	0,5
1/40	0,5 (dilution 1/20)	0,5

Remarque : bien mélanger la dilution 1/10 avant de l'utiliser pour préparer la dilution 1/20. Bien mélanger la dilution 1/20 avant de l'utiliser pour préparer la dilution 1/40. Les dilutions de plasmas doivent être analysées immédiatement après leur préparation. Si la température du laboratoire dépasse 25 °C, il peut être nécessaire de conserver les dilutions sur de la glace fondante avant de procéder à l'analyse.

Tester chaque dilution du plasma de référence (étalon) comme suit :

- ✓ Pipeter 0,1 ml de la dilution 1/10 dans un tube en verre de 75 × 10 mm.
- ✓ Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en facteur V.
- ✓ Laisser réchauffer à 37 °C pendant deux minutes.
- ✓ Ajouter 0,2 ml de réactif thromboplastine préchauffé.
- ✓ Déclencher le chronomètre et mélanger.

Remarque : si le réactif thromboplastine ne contient pas de calcium, 0,1 ml de thromboplastine est ajouté au mélange de dilution et de plasma déficient en facteur. Après un délai d'une à deux minutes pour le réchauffement à 37 °C, le mélange est coagulé avec 0,1 ml de calcium préchauffé (à 37 °C).

Noter le temps de coagulation :

- Répéter la dilution 1/10 puis analyser les dilutions 1/20 et 1/40 en double.
- Répéter pour les dilutions du plasma à tester et du CQ. Procéder en double.
- Pour les plasmas à tester censés être normaux, analyser les dilutions 1/10, 1/20 et 1/40. Pour les plasmas à tester dont les taux devraient être réduits, analyser les dilutions 1/5, 1/10 et 1/20.
- Un blanc doit également être analysé comme suit :
 - 0,1 ml de tampon véronal d'Owren
 - 0,1 ml de plasma déficient en facteur V
 - 0,2 ml de réactif thromboplastine/calcium
- Le temps de coagulation du blanc reflète la qualité du plasma déficient et doit être équivalent à moins de 1 UI/dl (0,01 UI/ml).

Résultats : faire une moyenne de chaque résultat en double. Les temps en double doivent être à moins de 10 % les uns des autres pour être acceptables. Sur du papier logarithmique 3 cycles × 2 cycles, tracer les temps de coagulation des plasmas de référence, à tester et de CQ par rapport à la concentration du facteur V en pourcentage. Une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution 1/10, donc la dilution 1/20 est équivalente à 50 %, 1/40 à 25 % et 1/5 à 200 %. Il est aussi possible de tracer la concentration sur une échelle logarithmique et le temps de coagulation sur une échelle linéaire. La quantité relative de facteur V dans le plasma à tester par rapport au plasma de référence est extrapolée à partir des graphiques. Un exemple est présenté à la section sur les dosages basés sur le TCA. Le temps de coagulation équivalent au test à 100 % (le point où la ligne du test coupe l'activité à 100 %) est lu à partir de la ligne de référence (donc, la concentration de la référence qui pourrait donner ce temps de coagulation particulier). On obtient la concentration du test en pourcentage de la référence. Ce pourcentage est multiplié par la valeur de la concentration du facteur de coagulation dans le plasma de référence (en UI/dl) pour donner la concentration dans le test (en UI/dl).

Remarques : de faibles taux d'activité des facteurs II, V, VII ou X peuvent être relevés chez les patients atteints d'une maladie hépatique (Kujovich et al., 2015). La plage de référence chez l'adulte pour chacun de ces facteurs doit être déterminée en local, mais a souvent une limite inférieure de 50 à 70 UI/dl pour les facteurs V, VII et X. La limite de référence inférieure pour le facteur II est plus élevée (Appel et al., 2012 ; Wakeman et al., 2005). L'activité du facteur VII peut augmenter pendant la grossesse (Fu et al., 2022). Les personnes présentant un taux réduit de facteur V devraient également être soumises à un dosage de l'activité du facteur VIII pour exclure le déficit combiné en facteur V et VIII (Zheng et al., 2013). Les facteurs II, VII et X dépendants de la vitamine K peuvent naturellement être réduits à la naissance, augmentant tout au long de l'enfance pour atteindre les taux adultes. Les plages de référence pédiatriques peuvent être

établies en local ou tirées de la littérature en tenant compte de la variation des réactifs (Toulon *et al.*, 2016 ; Attard *et al.*, 2013 ; Di Felice *et al.*, 2022). Dans certains cas de déficit en facteur VII (FVII Padoue, FVII Nagoya, FVII Tondabayashi/Shinjo), il peut y avoir un écart entre les taux de FVII:C obtenus, en fonction de l'origine de la thromboplastine. Il est donc conseillé de recourir à l'utilisation de thromboplastine humaine compte tenu du fait que les résultats sont plus susceptibles de refléter l'activité *in vivo*. Dans de rares cas, le résultat peut être très faible si de la thromboplastine de lapin est utilisée, mais plus élevé ou normal avec de la thromboplastine humaine ou de cerveau de bœuf. Cela peut expliquer pourquoi certains cas de déficit sévère apparent en facteur VII ne présentent pas de symptômes hémorragiques (Balluet *et al.*, 2020 ; Sevenet *et al.*, 2017).

Dosages basés sur le TCA (dosage en un temps du FXI, du FXII, de la PKK ou du KHPM) : le déficit en facteur XI est un trouble rare de la coagulation (Mumford *et al.*, 2014), alors que les déficits en facteurs de contact FXII, PKK et KHPM ne sont pas associés à des saignements (Maas *et al.*, 2018), mais provoquent un TCA significativement allongé. Le test de coagulation en un temps basé sur le TCA pour le facteur XI est décrit dans cette section. Celui-ci s'appuie sur la comparaison de la capacité des dilutions d'un plasma de référence et du plasma d'un patient à corriger le TCA d'un plasma totalement déficient en facteur XI, mais contenant tous les autres facteurs nécessaires à une coagulation normale. Pour le facteur XII, la PKK et le KHPM, le dosage est essentiellement le même que celui du facteur XI en un temps, en remplaçant le plasma déficient en facteur XI par un plasma déficient dans le facteur que l'on veut doser et en sélectionnant le plasma de référence approprié. Le réactif de TCA utilisé pour le dosage de la PKK ne peut pas utiliser l'acide ellagique comme activateur.

Réactifs :

- ✓ Plasma à tester citraté pauvre en plaquettes.
- ✓ Plasma étalon (de référence).
- ✓ Le plasma étalon (de référence) utilisé doit être soit un pool de plasma préparé en local et conservé à une température de -40 °C au minimum, soit un plasma du commerce. Dans un cas comme dans l'autre, ce plasma doit être calibré par rapport à l'étalon de référence international pour le facteur IX dans le plasma. Il n'est pas acceptable de présumer qu'un plasma normal poolé contient 100 UI/dl de facteur XI.

Plasma de contrôle interne de qualité (Baker *et al.*, 2020) :

- ✓ Plasma déficient en facteur XI.
- ✓ Ce type de plasma est disponible dans le commerce ou peut être recueilli auprès d'une personne donneuse présentant un déficit sévère dans les conditions suivantes :
- ✓ Le taux de facteur XI est inférieur à 1 UI/dl, aucun antécédent d'anticorps anti-FXI, aucun traitement n'a été reçu pendant deux semaines, plus tests de la fonction hépatique normaux.
- ✓ Une fonction hépatique anormale pourrait entraîner une réduction des autres facteurs de coagulation, ce qui nuit à la spécificité du dosage. Ce plasma peut être conservé en aliquotes à -20 °C au minimum pendant environ trois mois (Zhao *et al.*, 2018 ; Woodhams *et al.*, 2001).
- ✓ Il est préférable d'utiliser du plasma déficient en facteur XI produit par immunodéplétion du facteur XI d'un plasma normal au moyen d'un anticorps monoclonal. Ce type de produit est disponible dans le commerce et présente l'avantage d'améliorer la sécurité virologique par rapport au plasma provenant de patients traités avec des produits issus du plasma.
- ✓ Toutefois, tous les plasmas immunodéplétés n'ont pas < 1 UI/dl de facteur et il faut prendre soin de le vérifier avant utilisation.
- ✓ Réactif pour la détermination du TCA sensible aux déficits en facteurs (CLSI, 2016). À noter que les réactifs du TCA qui sont activés par l'acide ellagique sont insensibles au déficit en prékallikréine.
- ✓ Solution tampon saline d'Owren (TSO ou glyoxaline).
- ✓ CaCl₂ 25 mM (à noter que le CaCl₂ Werfen fourni avec Synthasil est à 20 mM)

Méthode :

- ✓ **Pour les facteurs XI et XII et le KHPM :** Préparer dans des tubes en plastique des dilutions 1/10 des plasmas de référence, de CQ et du patient dans une solution tampon saline. (Commencer par une dilution 1/5 s'il est prévu que le plasma du patient aura une très faible teneur en facteur.) En utilisant des volumes de 0,2 ml, dans des tubes en plastique, préparer dans de la solution TSO des dilutions géométriques de plasma de référence, de CQ et à tester allant de 1/10 à 1/40. (Bien mélanger chaque dilution avant de faire le transfert vers le tube suivant.) Les dilutions de plasmas doivent être analysées immédiatement après leur préparation. Si la température du laboratoire dépasse 25 °C, il peut être nécessaire de conserver les dilutions sur de la glace fondante avant de procéder à l'analyse.
- ✓ **Pour la prékallicréine uniquement,** des dilutions plus élevées de 1/100, 1/200 et 1/400 sont généralement requises. Analyser d'abord le plasma de référence. Pipeter 0,1 ml de chaque dilution du plasma de référence dans un tube en verre de 75 × 10 mm. Ajouter 0,1 ml de plasma déficient en facteur XI, mélanger et transférer dans un bain-marie à 37 °C. Ajouter 0,1 ml de réactif de TCA, mélanger et incuber pendant deux à cinq minutes en fonction du temps d'incubation recommandé pour le réactif. À la fin du temps d'incubation, ajouter 0,1 ml de CaCl_2 , mélanger en retournant le tube jusqu'à ce qu'un caillot soit visible. Noter le temps de coagulation. Répéter les étapes 4 à 7 en utilisant le CQ, puis le plasma du patient. Un blanc doit aussi être préparé en utilisant 0,1 ml de TSO à la place du plasma à tester. Le temps de coagulation du blanc doit être supérieur au temps correspondant à un taux de 1 % d'activité en facteur XI de l'étalon selon le graphique de l'étalonnage. Si le temps obtenu lui est inférieur, ceci indique que le plasma déficient n'est pas entièrement déficient en facteur XI et par conséquent ne convient pas.

Résultats : le tracé des résultats est identique à celui des dosages basés sur le TP (décrits ci-dessus), nécessitant du papier log/log ou du papier log/linéaire. Pour les facteurs XI et XII et le KHPM, une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution 1/10, une valeur de 50 % à la dilution 1/20 et une valeur de 25 % à celle de 1/40. La dilution 1/5, si elle est utilisée, a une valeur de 200 %. Pour la PKK, une valeur de 100 % est arbitrairement assignée à la dilution 1/100, une valeur de 50 % à la dilution 1/200 et une valeur de 200 % à celle de 1/400. La dilution 1/50, si elle est utilisée, a une valeur de 200 %. On doit obtenir des lignes droites, parallèles entre elles. Lire la concentration du CQ et de l'échantillon à tester comme pour les dosages basés sur le TP (décrits ci-dessus). Dans cet exemple, la concentration en facteur XI dans l'échantillon à tester est de 7 % de celle de l'étalon. Si l'étalon a une concentration de 85 UI/dl, le calcul est de $85 \text{ UI/dl} \times 7 \% =$ l'échantillon à tester a une concentration de 6 UI/dl. Si les droites ne sont pas parallèles, le dosage doit être répété. Vérifier les temps de coagulation de l'échantillon à tester. S'ils sont très longs, analyser une dilution 1/5 (ou 1/50 pour la PKK). Des droites non parallèles peuvent résulter d'erreurs techniques. Si l'erreur technique est exclue, il est possible que ces droites soient dues à la présence d'un inhibiteur qui peut agir spécifiquement contre le facteur XI, ou qui peut être de « type lupique », donnant une image convergente. Des droites divergentes sont typiques d'un échantillon activé (Baker et al., 2020).

Remarques : les déficits en facteur XII, PKK ou KHPM ne sont pas associés à une augmentation du risque hémorragique. Les réactifs du TCA activés par l'acide ellagique sont insensibles au déficit en prékallicréine. Si la concentration en facteur XI ou XII, en PKK ou en KHPM dans le plasma à tester est proche de zéro (c'est-à-dire que les temps de coagulation de toutes les dilutions sont semblables au blanc), des droites non parallèles peuvent être obtenues. La plage de référence normale doit être établie localement, mais a souvent une limite inférieure comprise entre 50 et 70 UI/dl pour chacun de ces facteurs. Des unités internationales ont maintenant été établies pour les facteurs XI et XII dans le plasma, mais il n'est pas prévu d'établir des unités internationales pour la PKK ou le KHPM.

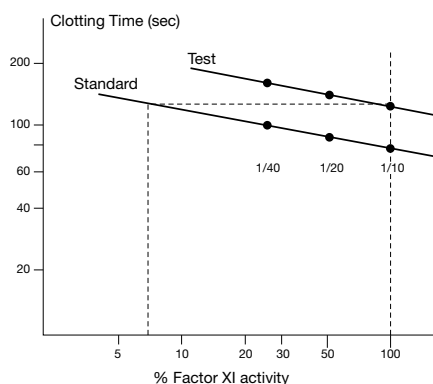


Figure 20. Graphique du dosage du facteur XI

Facteur XIII : dépistage, activité et antigène

Dépistage du facteur XIII (tests de solubilité du caillot) : le facteur XIII est impliqué dans la réticulation des chaînes α et γ de la fibrine. Le déficit en facteur XIII est classé comme un trouble rare de la coagulation et peut être dû à des mutations soit dans les sous-unités catalytiques FXIII-A, soit dans les sous-unités porteuses FXIII-B (Karimi et al., 2018). Les analyses qualitatives de la solubilité du caillot de fibrine ne sont actuellement pas recommandées en raison de l'absence de standardisation et d'une sensibilité médiocre. Il est recommandé de diagnostiquer le déficit en facteur XIII au moyen d'un dosage de l'activité fonctionnelle du facteur XIII plutôt que la solubilité du caillot (Mumford et al., 2014 ; Palla et al., 2015 ; Kohler et al., 2011), mais dans certaines régions du monde, seuls les tests de solubilité du caillot sont disponibles. Ceux contenant de l'urée 5 M sont plus spécifiques que ceux contenant de l'acide acétique, cependant, l'hypofibrinogénémie et la dysfibrinogénémie peuvent donner des résultats faussement positifs dans le test à base d'urée (Dorgalaleh et al., 2016). Les tests de solubilité du caillot contenant de l'acide chloroacétique à 1 % sont plus sensibles et plus rapides que les tests à base d'urée (Dorgalaleh et al., 2016). Il a été suggéré d'effectuer en parallèle les tests à base d'urée et d'acide acétique pour optimiser le diagnostic (Dorgalaleh et al., 2016). Un résultat positif ne sera observé qu'en cas de déficit sévère en facteur XIII, à une activité factorielle < 5-10 UI/dl, en fonction de la méthode utilisée.

Méthode : la thrombine et le calcium sont nécessaires pour activer le facteur XIII de manière à ce qu'il réticule la fibrine sous une forme stable. Dans cette méthode, malgré l'utilisation de plasma citraté, suffisamment d'ions calcium sont encore disponibles pour l'activation du facteur XIII. Un plasma normal anticoagulé à l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) est utilisé comme témoin. Dans ce plasma, l'EDTA entraîne une chélation complète des ions calcium, ce qui signifie que le facteur XIII n'est pas capable de réticuler la fibrine. L'ajout d'acide acétique 2 % ou d'urée 5 M entraîne la lyse des caillots non réticulés, alors que le plasma citraté avec > 10 U/dl d'activité du FXIII présente un caillot insoluble. Le test est généralement plus sensible avec de l'acide acétique (plutôt que de l'urée), car le caillot se dissoudra à des taux plus élevés de facteur XIII en présence d'acide acétique (Jennings et al., 2003).

Matériel et réactifs :

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

Méthode : ajouter 0,2 ml de plasma à tester citraté à 0,2 ml de solution saline 0,9 % dans un tube en verre. Pour un contrôle positif, répéter l'opération avec 0,2 ml de plasma EDTA. Pour un contrôle négatif, répéter avec 0,2 ml de plasma normal citraté. Ajouter 0,1 ml de thrombine 30 U/ml, mélanger. Laisser

30 minutes à 37 °C. Agiter les tubes pour détacher les caillots des parois. Ajouter 5 ml d'acide acétique 2 % et boucher le tube. Laisser à température ambiante pendant 12 heures.

Résultats : le plasma EDTA ne doit pas présenter de caillot visible. Il doit y avoir un caillot intact visible dans le plasma citraté normal. Si le caillot n'est pas visible, le sujet présente un déficit en facteur XIII.

Plage normale : chez les sujets normaux, un caillot est visible après 12 heures dans de l'acide acétique 2 %.

Remarques : l'urée 5 M peut être utilisée à la place de l'acide acétique 2 %. Le temps d'incubation pour la dissolution du caillot est alors de 18 heures. Cette méthode est moins sensible mais plus spécifique que l'acide acétique (décrit ci-dessus). La coagulation avec du calcium et la lyse avec de l'urée ne produisent des résultats anormaux que lorsque les taux de facteur XIII sont inférieurs à 5 U/dl. Par comparaison, la coagulation avec de la thrombine 30 U/ml suivie d'une lyse avec de l'acide acétique 2 % produit des résultats anormaux à des taux inférieurs à 10 U/dl (Jennings *et al.*, 2003). Les patients dont le taux de facteur XIII est supérieur à 5 U/dl peuvent parfois présenter des saignements (voir Bolton-Maggs *et al.*, 2004 pour une revue de la littérature). Les patients atteints d'hypofibrinogénémie ou d'afibrinogénémie doivent être exclus de ces tests.

Dosage de l'activité du facteur XIII : le facteur XIII est impliqué dans la réticulation des chaînes α et γ de la fibrine. Le déficit en facteur XIII est classé comme un trouble rare de la coagulation et peut être dû à des mutations soit dans les sous-unités catalytiques FXIII-A, soit dans les sous-unités porteuses FXIII-B (Karimi *et al.*, 2014 ; Mumford *et al.*, 2014). Les méthodes actuellement disponibles pour les diagnostics cliniques de déficit en facteur XIII en laboratoire comprennent les dosages de solubilité du caillot, les dosages quantitatifs de l'activité du facteur XIIIa, les dosages de l'antigène du facteur XIII spécifiques au complexe FXIII-A₂B₂, à FXIII-A₂ ou à FXIII-B₂, et les tests génétiques (Palla *et al.*, 2015). Il est recommandé de diagnostiquer le déficit en facteur XIII au moyen d'un dosage de l'activité fonctionnelle du facteur XIII plutôt que la solubilité du caillot (Mumford *et al.*, 2014 ; Palla *et al.*, 2011 ; Kohler *et al.*, 2016). La plupart des dosages de l'activité du facteur XIII ne sont sensibles qu'aux déficits de la sous-unité FXIII-A. Tapisser de fibrinogène les puits d'une microplaque. Des liaisons non spécifiques sont évitées par l'utilisation d'un agent bloquant spécial. Le facteur XIII présent dans l'échantillon est activé par la thrombine en présence d'ions calcium. Lors de l'étape d'incorporation, en présence de calcium, le facteur XIIIa dans le plasma du patient lie le substrat, la 5-biotinamidopentylamine (BAPA), au fibrinogène du substrat du facteur XIII qui tapisse la plaque. La quantité de BAPA liée est proportionnelle à l'activité du facteur XIII de l'échantillon du patient. À l'étape suivante, de la streptavidine conjuguée à de la phosphatase alcaline est ajoutée. Le conjugué se lie au BAPA immobilisé sur le fibrinogène. La phosphatase alcaline convertit le substrat synthétique de para-nitrophénylphosphate (pNPP) en phosphate et p-nitrophénol, qui peuvent être mesurés à 405 nm. Les réactifs pour la méthode décrite ci-dessous sont disponibles dans le commerce sous forme de trousse (dosage d'incorporation du facteur XIII Pefakit, Pentapharm, Suisse). À noter que d'autres dosages de l'activité sont disponibles auprès d'autres fabricants, notamment la trousse Berichrom FXIII (Siemens, Marbourg, Allemagne) qui repose sur le principe de la libération d'ammoniaque, et le dosage fluorogénique Technofluor (Technoclone, Vienne, Autriche).

Réactifs : tous les réactifs requis sont contenus dans la trousse disponible dans le commerce.

Méthode :

Jour 1

- ✓ Laisser les composants de la trousse atteindre la température ambiante pendant 30 minutes.
- ✓ Reconstituer le réactif de coating (R2) dans de l'eau distillée, selon le volume recommandé par le fabricant.
- ✓ Ajouter 100 μ l de réactif de coating dans les puits vides de la microplaque.

- ✓ Congeler tout surplus de réactif de coating pour usage ultérieur. Il reste stable pendant six mois à -20 °C.
- ✓ Obturer les puits utilisés avec des feuilles plastiques adhésives fournies et incubé pendant la nuit (14 à 16 heures) à une température de 20 à 25 °C.

Jour 2

- ✓ Diluer 50 ml de TBS R1 (solution saline tamponnée Tris) concentrée 20× dans 950 ml d'eau distillée ou volume moindre, au besoin.
- ✓ Diluer 3 ml de réactif bloquant R3 dans 27 ml de TBS R1 dilué. Congeler l'excédent de R3.
- ✓ Jeter le réactif de coating de la microplaque, retourner la microplaque et la tapoter sur du papier absorbant pour éliminer les résidus.
- ✓ Ajouter 300 µl de réactif bloquant dilué dans chaque puits.
- ✓ Incuber pendant 60 à 90 minutes à 37 °C dans un incubateur.
- ✓ Reconstituer le R10 d'étalonnage dans 0,5 ml d'eau distillée et les trois contrôles, R11, R12 et R13, dans 0,2 ml d'eau distillée.
- ✓ Décongeler les plasmas à tester congelés pendant cinq minutes à 37 °C avant l'analyse.
- ✓ Préparer un mélange de quelques centaines de millilitres d'eau et de glace afin de faire un bain de glace fondante.
- ✓ Préparer des dilutions de tous les plasmas à tester et de contrôle, 10 µl de plasma et 1 ml de TBS R1 dilué (dilution 1/101). Agiter-mélanger (vortex).
- ✓ Préparer les dilutions suivantes pour l'étalon :

Étalon 1 : 30 µl R10 + 970 µl TBS R1

Étalon 2 : 20 µl R10 + 980 µl TBS R1

Étalon 3 : 75 µl R10 + 25 µl TBS R1

Étalon 4 : 25 µl R10 + 75 µl TBS R1

Étalon 5 : 10 µl R10 + 90 µl TBS R1

Remarque : les dilutions 1 et 2 sont prêtes à l'emploi. Diluer ensuite 10 µl des dilutions 3 à 5 dans 1 ml de TBS R1. Laver la microplaque trois fois avec 300 µl/puits de TBS R1. Retourner et tapoter sur du papier absorbant pour éliminer l'excès de liquide. Reconstituer la partie A (R4) et la partie B (R5) du réactif activateur dans 5 ml d'eau distillée chacun. Conserver dans le bain de glace pendant 30 minutes maximum. Ajouter 25 µl de plasma étalon, de contrôle ou à tester dans les puits appropriés. Inclure un blanc de TBS R1. Mélanger les parties A et B du réactif activateur (R4 et R5) pour former le réactif d'incorporation final. Ajouter 75 µl du réactif d'incorporation final dans chaque puits, y compris le puits à blanc. Incuber pendant 30 minutes à 37 °C dans l'incubateur. Ajouter 200 µl/puits de solution R6 pour arrêter l'incorporation. Mélanger délicatement pendant 10 minutes sur l'agitateur. Reconstituer le réactif de détection R7 en ajoutant 12 ml d'eau distillée. Congeler le R7 dilué non utilisé. Laver la plaque quatre fois avec 300 µl de TBS par puits. Tapoter pour éliminer l'excès de liquide. Ajouter 100 µl/puits de réactif de détection R7. Incuber pendant 15 minutes à 37 °C dans l'incubateur. Laver la plaque quatre fois avec 300 µl de TBS par puits. Tapoter pour éliminer l'excès de liquide. Préparer la solution de substrat immédiatement avant de l'utiliser :

- ✓ Pour 96 puits (microplaque entière), ajouter 9 comprimés R8b à 22,5 ml de tampon diéthanolamine R8a
- ✓ Pour 64 puits (8 barrettes), ajouter 6 comprimés à 15 ml de diéthanolamine
- ✓ Pour 32 puits (4 barrettes), ajouter 3 comprimés à 7,5 ml de diéthanolamine
- ✓ Pour 24 puits (3 barrettes), ajouter 2 comprimés à 5 ml de diéthanolamine

Ajouter 180 µl/puits de la solution de substrat. Incuber pendant 11 minutes à 37 °C dans l'incubateur. Ajouter 50 µl/puits de la solution d'arrêt R9 (NaOH 4 M). Faire la lecture des densités optiques dans les 15 minutes à 405 nm dans un lecteur de microplaques.

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

Calcul des résultats : les dilutions de l'étalon et les valeurs des contrôles sont fournies avec chaque trousse. À l'aide d'un logiciel de traitement de données approprié ou de papier graphique, dessiner une courbe d'étalonnage en traçant la concentration en fonction de la densité optique (DO) des dilutions des étalons après soustraction de la densité optique du blanc. Utiliser une échelle linéaire/linéaire. Soustraire la DO du blanc de la DO des dilutions de l'échantillon à tester/de contrôle et convertir les DO en activité de facteur XIII au moyen de la courbe d'étalonnage. Les résultats du patient peuvent être validés si les valeurs de l'échantillon de contrôle se situent dans la plage acceptable.

Références

Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini S, Shamsizadeh M. Guidelines for laboratory diagnosis of factor XIII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2016; 27(4): 361-364.

Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini MS, Farshi Y, Roshanzamir F, Naderi M, Kazemi A, Zaker F, Aghideh AN, Shamsizadeh M. Diagnosis of factor XIII deficiency. *Hematology* 2016; 21(7): 430-439.

Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: A UK NEGAS study. *J Thromb Haemost* 2003; 1(12): 2603-2608.

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.

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.

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