

Syndrome des Antiphospholipides

Les nouvelles recommandations pour
le diagnostic des Lupus Anticoagulants

Les réactifs Stago

Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de
Groot PG. Update of the guidelines for LA detection

J. Thrombosis and Haemostasis

2009; 7: 1737-40

Nouvelles recommandations

Changements majeurs

- Sélection des patients
- Choix des tests
 - ❖ Choix des tests
 - ❖ Les tests non recommandés
 - ❖ Interprétation des résultats
- Limites

Sélection des patients :

- probabilité significative de SAPL
- TCA allongé dans le cadre d'un bilan de routine



Attention au risque de faux-positifs !

Sélection des patients

Détermination de Probabilités

Ces 3 groupes peuvent être testés

➔ Faible

- ❖ Thrombose veineuse profonde ou artérielle chez des sujets âgés

➔ Modéré

- ❖ TCA allongé découvert par hasard chez patient asymptomatique
- ❖ Pertes fœtales récurrentes en début de grossesse
- ❖ TVP chez le sujet jeune avec cause déclenchante

➔ Fort

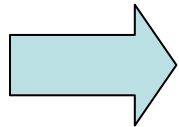
- ❖ thrombose veineuse profonde et artérielle inexplicée chez des sujets jeunes < 50 ans
- ❖ TVP de localisation inhabituelle
- ❖ perte fœtale tardive
- ❖ TVP ou toute pathologie de la grossesse associée à une maladie auto-immune (LES, Polyarthrite rhumatoïde, thrombopénie auto-immune, anémie hémolytique)

Choix des tests

Etape de dépistage



- Aucun test seul sensible à tous les Lupus
 - ❖ Un seul test de dépistage n'est suffisant
- Fort risque de résultats faux-positifs si > 2 tests de dépistage sont utilisés
 - ❖ > 2 tests de dépistage non recommandés



Recommandation:

2 tests basés sur des principes différents

Choix des tests

Nouvelles reco

Les tests de dépistage non-recommandés

➤ TCA avec

❖ **Activateur: Kaolin**

- Insensible aux LA
- Dédié à la recherche des déficits en Facteurs
- Utilisation difficile sur des instruments à détection optique

❖ **Activateur: Acide Ellagique**

- Insensible aux LA

➤ Temps de Prothrombine dilué

❖ **Forte variabilité des thromboplastines**

➤ Temps de Kaolin

❖ **Faible reproductibilité**

➤ Temps d'Ecarin/ Textarin

❖ **Pas de tests standardisés**

Choix des tests

Nouvelles reco

2 tests de dépistage recommandés

➤ dRVVT

- ❖ Utilisé largement (international)
- ❖ spécifique des Lupus chez des patients présentant un risque élevé de thrombose
- ❖ test robuste pour la recherche des LA

➤ TCA sensible

- ❖ Activateur: silice
- ❖ faible concentration de phospholipides (PL)

Choix des tests

Nouvelles reco

2 tests de dépistage recommandés

➤ dRVVT

- ❖ Utilisé largement (international)
- ❖ spécifique des Lupus chez des patients présentant un risque élevé de thrombose
- ❖ test robuste pour la recherche des LA

➤ TCA sensible

- ❖ Activateur: silice
- ❖ faible concentration de phospholipides (PL)

Dépistage des LA - Voie commune

Venin de vipère de Russel dilué

↳ **STA[®] Staclot[®]**
DRVV Screen

DRVVs: Patient plasma + PPL dilué + Venin + CaCl₂ ⇒ Coagulation (temps en sec)

- ❖ RVV = activateur FX
- ❖ PPL: faible concentration de PPL dans le réactif
- ❖ calcium, inhibiteur de l'héparine

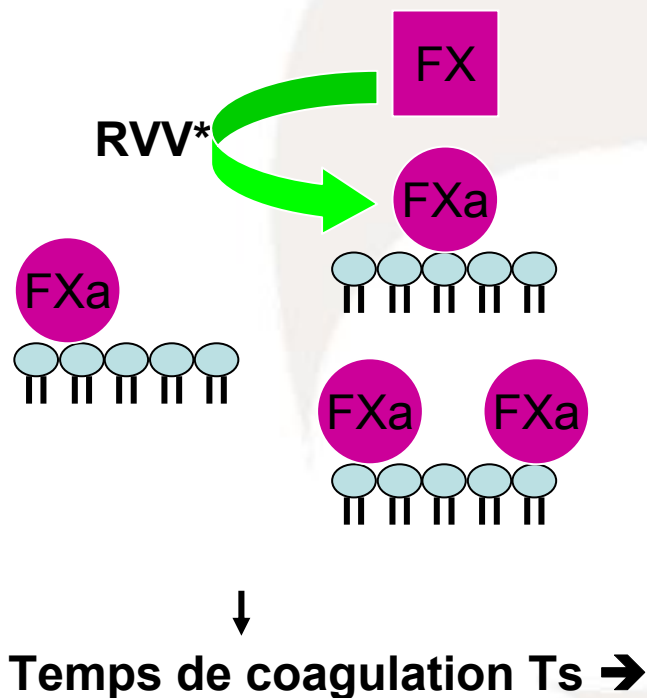
↳ **STA[®] Staclot[®]**
DRVV Confirm

DRVVc: Patient plasma + concentration élevée de PPL + Venin + CaCl₂ ⇒ Coagulation (temps en sec)

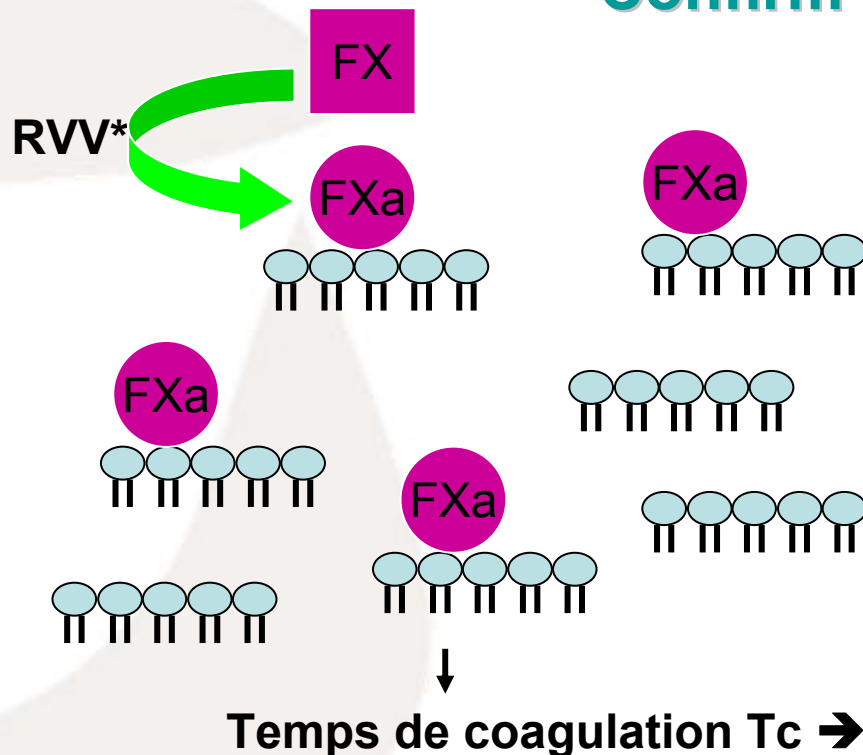
- ❖ RVV = activateur du FX
- ❖ PPL: concentration élevée de PPL dans le réactif
- ❖ calcium, inhibiteur de l'héparine

Principe du test *absence de LA...*

Screen



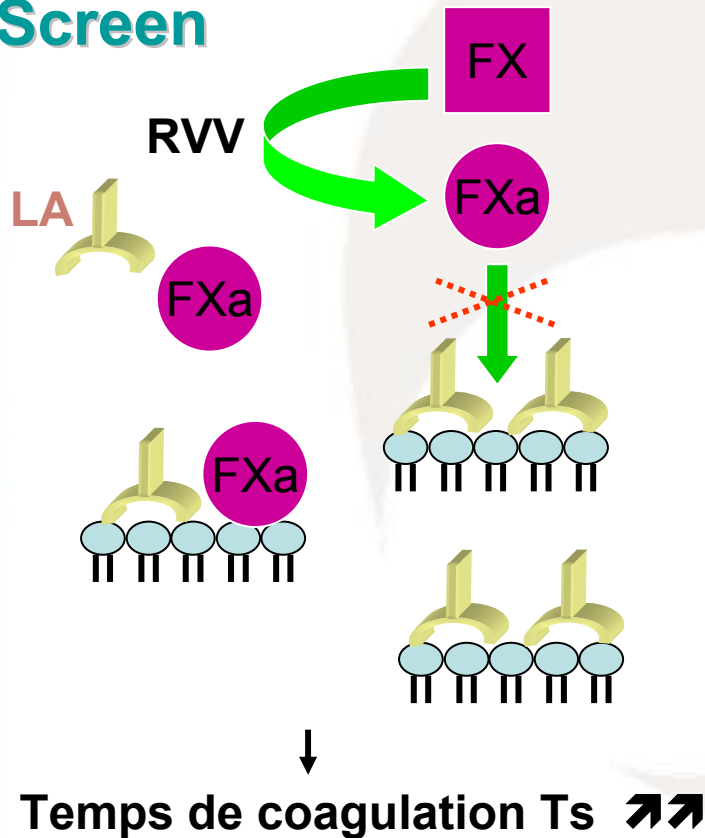
Confirm



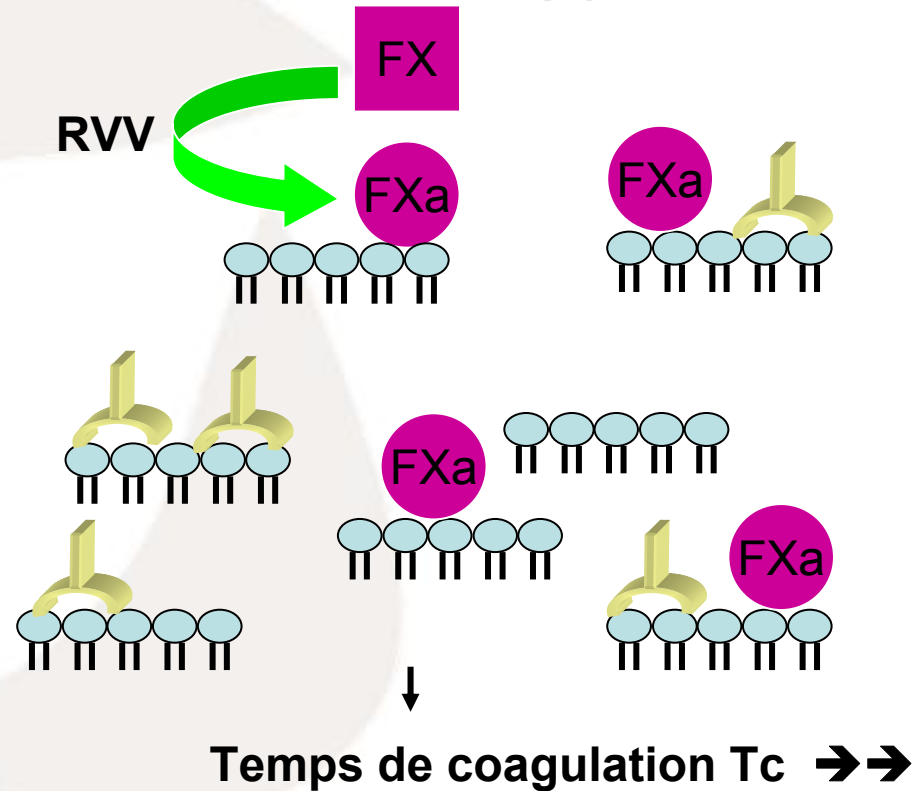
$T_s \cong T_c$ $\text{Ratio } T_s/T_c < 1.2$
→ absence de LA

Principe du test *présence de LA...*

Screen



Confirm



Ts > Tc
Ratio Ts/Tc ≥ 1.2
→ présence de LA

Interprétation des résultats

➔ **Ratio Screen** =
$$\frac{\text{Temps de coag du plasma à tester}}{\text{Temps de coag (screen) Témoin}} > 1.2$$

➔ **Ratio Confirm** =
$$\frac{\text{Temps de coag du plasma à tester}}{\text{Temps de coag (confirm) Témoin}}$$

➔ **Ratio Normalisé** =
$$\frac{\text{Ratio Screen}}{\text{Ratio Confirm}}$$

- ❖ Ratio Normalisé < 1.2 ⇔ Négatif → inhibiteur anti-facteur ?
- ❖ Ratio Normalisé ≥ 1.2 ⇔ Positif → présence de LA

STA[®] Staclot[®] DRVV Screen & Confirm

Description des réactifs

- STA[®] Staclot[®] DRVV Screen 2 or 5 ml
(Cat n°00339 & 00333)
- STA[®] Staclot[®] DRVV Confirm 2 ml
(Cat n°00334)
- STA[®] Control LA 1+2 (Cat n°00201)
 - ❖ **Contrôles spécifiques négatifs et positifs**
 - Plasmas humains lyophilisés
 - ❖ **Applicables au:**
 - STA[®]-Staclot[®] DRVV Screen & Confirm
 - Staclot[®] LA

STA[®] Staclot[®] DRVV Screen

STA[®] Staclot[®] DRVV Confirm

- Très spécifiques des LA
- Insensibles aux déficits en facteurs VII, XII, XI, IX et VIII
- Insensible aux inhibiteurs du F.VIII
- Insensible aux traitements par l'héparine
 - ❖ Préférable d'administrer la dernière dose d'héparines (HNF ou HBPM) > 12 heures avant le diagnostic des LA
 - ❖ Les tests Staclot DRVV sont insensibles aux taux de HNF jusqu'à 0.8 UI/mL

STA[®] Staclot[®] DRVV Screen

STA[®] Staclot[®] DRVV Confirm

➤ Utilisation

❖ Identification automatique sur gamme STA[®]

- Numéro de lot
- Gestion du volume
- Stabilité à bord (72 heures avec Cap + Reducer)
- Date d'expiration

➤ Sécurité

❖ Contrôles spécifiques

- STA[®] Control LA 1+2 (négatif et positif)

Détermination d'une fourchette de Référence

Détermination du Temps Témoin

En Pratique

➤ Fourchette de Référence

- ❖ A chaque nouveau lot, sur au moins 20 plasmas individuels normaux → *reflet de la population locale*

➤ Temps Témoin (# Pool Norm)

- ❖ Doit être dans la fourchette de référence locale
- ❖ Doit être vérifié pour chaque série
- ❖ Permet le calcul du Ratio Normalisé

Procédure opératoire

En Pratique

- Avec un nouveau lot de STA Staclot® DRVV S&C
 - ❖ Scanner le code barre du flacon
 - ❖ Entrer de façon temporaire une fourchette de valeurs de référence
 - ex: Screen ~ 39 sec / Confirm ~ 35 sec
 - ❖ Tester les contrôles (STA Control LA 1+2)
 - ❖ Tester 20 plasmas normaux individuels avec le STA Staclot® DRVV Screen & Confirm pour établir la fourchette de référence
 - ❖ Tester le pool témoin (calcul des Ratios)
 - If nécessaire, ajuster la fourchette de référence dans le menu calibration avec cette nouvelle valeur
 - ❖ Tester les plasmas des patients

Procédure opératoire

En Pratique

- Avec un lot identique de STA Staclot[®] DRVV S&C
 - ❖ Tester les contrôles (STA Control LA 1+2)
 - ❖ Tester 20 plasmas normaux individuels avec le STA Staclot[®] DRVV Screen & Confirm pour établir la fourchette de référence
 - ❖ Tester le pool témoin (calcul des Ratios)
 - If nécessaire, ajuster la fourchette de référence dans le menu calibration avec cette nouvelle valeur
 - ❖ Tester les plasmas des patients

Choix des tests

Nouvelles reco

2 tests de dépistage recommandés

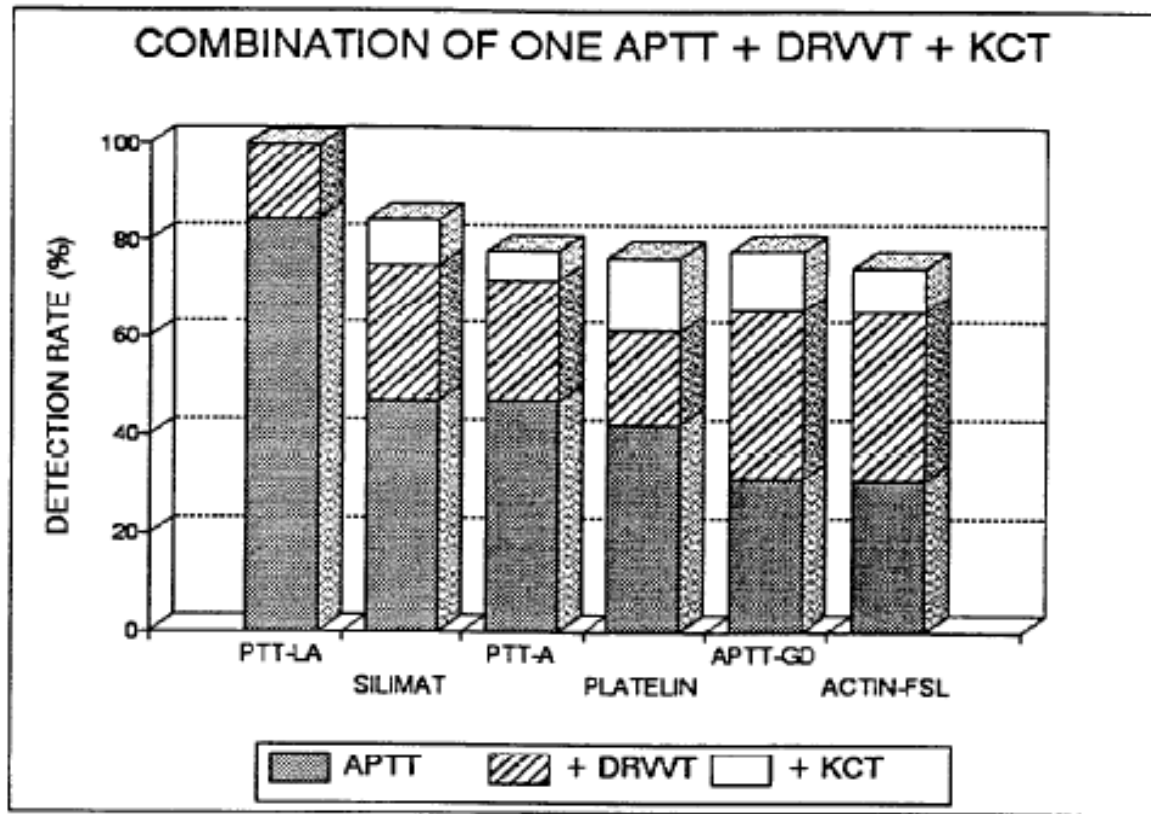
➤ dRVVT

- ❖ Utilisé largement (international)
- ❖ spécifique des Lupus chez des patients présentant un risque élevé de thrombose
- ❖ test robuste pour la recherche des LA

➤ TCA sensible

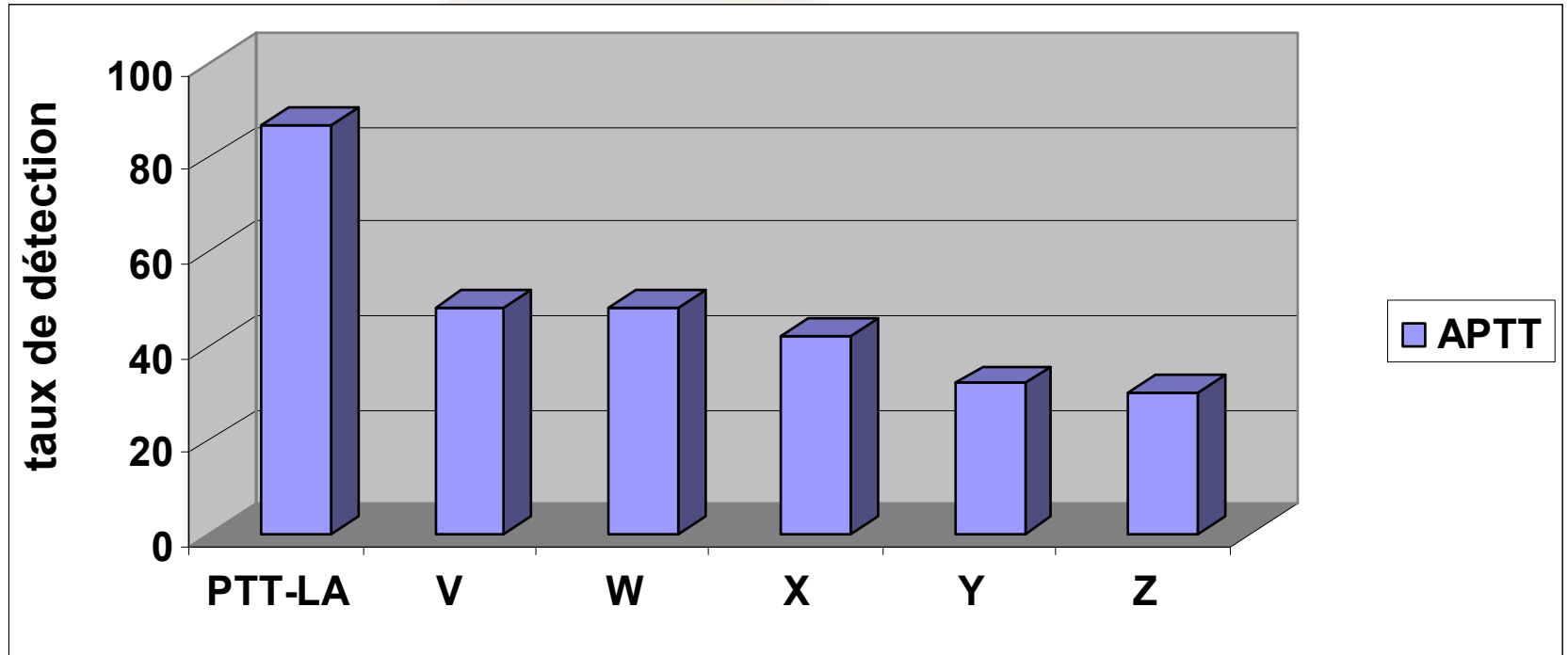
- ❖ **Activateur: silice**
- ❖ **faible concentration de phospholipides (PL)**

Procédure optimale de dépistage des LA



Même si aucun des réactifs de dépistage n'est sensible à 100% et spécifique à 100%, la combinaison du PTT-LA et des DRVVT donne les meilleurs résultats (taux de capacité de détection)

Procédure optimale de détection des LA



" PTT-LA est le réactif de TCA le plus sensible pour la détection des LA"

P. Cauchie. High sensitivity of a new APTT reagent in Lupus anticoagulant detection. XIVth congress of the ISTH, Thromb Haemost, 1993, 69, N°6.

Sensibilité des réactifs du TCA

Voie intrinsèque

- ↳ Origine et concentration des phospholipides
- ↳ Nature de l'activateur

	Déficit en facteurs	Suivi héparine standard	Lupus Anticoagulant
STA [®] - Cephascreen [®]	+++	++	++
STA [®] - C.K Prest [®]	+++	++	+
STA [®] - PTT Automate	+++	+++	+++
PTT- LA	-	-	++++

Choix des tests



Test du Mélange

Préparation du Pool Témoin

- Si Pool de plasma Maison
 - ❖ $< 10^7$ ml⁻¹ plaquettes résiduelles
 - ❖ ~100% activité pour tous les facteurs de coagulation
 - ❖ Petits aliquots congelés conservés à -70°C

- Si Pool de plasma Commercial
 - ❖ Doit être validé pour la détection des Lupus
 - ❖ Doit remplir les spécifications internationales

Choix des tests



Test du Mélange Détection

- Mélange proportion 1:1 plasma patient/pool témoin
- Tester dans les 30 min après le mélange
- Pas de pré-incubation

Choix des tests



Test de Confirmation

- Même principe que le test de dépistage
 - ❖ Avec une concentration plus forte de Phospholipides
 - ❖ PL de structure hexagonale ou en bicouche
 - ❖ L'utilisation des plaquettes décongelées n'est pas recommandée (faible reproductibilité lot à lot)

Choix des tests

Etapes de Dépistage & Confirmation

Interprétation des résultats

- Détermination des valeurs seuils (cut-off)
 - ❖ Tester 40 plasmas de sujets sains de façon consécutive
 - ❖ La présence de Lupus est confirmée si le résultat patient $>$ cut-off

Choix des tests

Etapes de Confirmation



Interprétation des résultats - 2nd possibilité

- Utilisation d'un test intégré
 - ❖ dRVVT screen & confirm
- Expression des résultats selon un Ratio
 - ❖ **Ratio Normalisé** = Ratio Screen / Ratio confirm

Limites - expression des Résultats

Nouvelles recommandations:

1. Cut-off pour les étapes de Dépistage et de Confirmation

- ❖ cut-off = 99° percentile de la distribution des valeurs
- ❖ au moins 40 sujet adultes sains (< 50 ans)

Interprétation des résultats :

- ❖ difference entre le Temps patient et le Temps du cut-off

2. Interprétation des résultats avec le Ratio Normalisé

↪ Pool Norm pour le calcul du Ratio Normalisé avec le STA Staclot® DRVV Screen & Confirm



Limites

➔ Grossesse

- ❖ Fourchette de Référence spécifique doit être déterminée

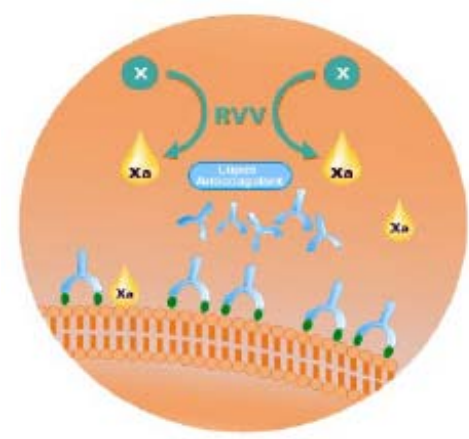
➔ Présence d'héparines

- ❖ Vérifier avec le Temps de Thrombine

➔ Patients sous AVK

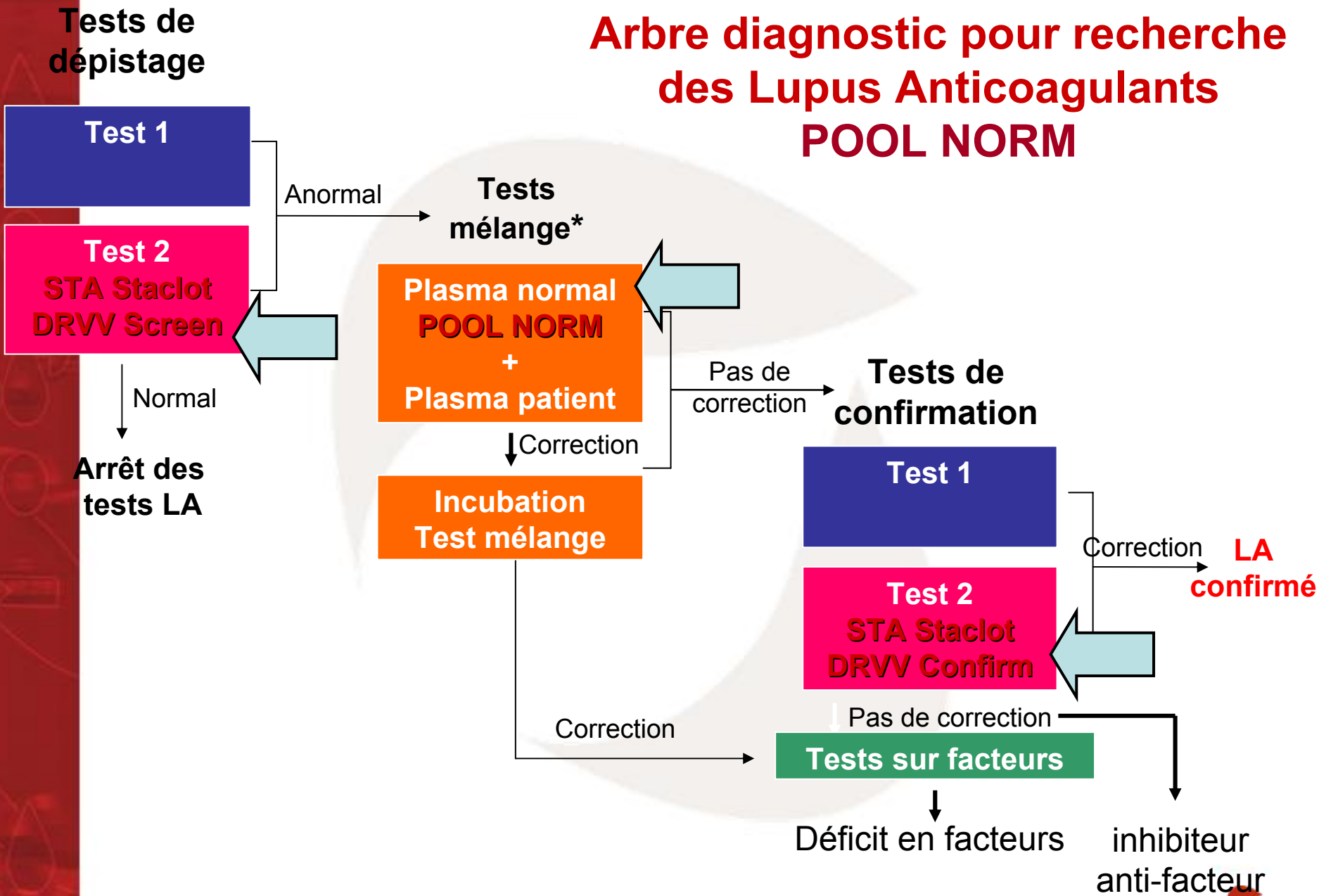
- ❖ Stopper le traitement 2 semaines avant le test si possible (switcher aux UFH ou HBPM)
- ❖ Procédure Normale si $INR < 1.5$
- ❖ $1.5 < INR < 3$: dilution 1:1 avec le pool Témoin
- ❖ Pas de test LA si $INR > 3$

➔ Effets de la thrombine directe ou inhibiteurs directs FXa inconnus



Pool Norm

Arbre diagnostic pour recherche des Lupus Anticoagulants POOL NORM



Pool Norm

Recommandations d'utilisation

- Test du mélange : Indice de Rosner avec TCA

$$\frac{\text{TCA mélange} - \text{TCA Pool Norm}^{**}}{\text{TCA Malade}} \times 100$$

- Ratio Screen

$$\frac{\text{Patient plasma time with Screen}}{\text{Pool Norm}^{**} \text{ time with Screen}}$$

- Ratio Confirm

$$\frac{\text{Patient plasma time with Confirm}}{\text{Pool Norm}^{**} \text{ time with Confirm}}$$

- Normalised Ratio (NR) to be calculated with the LIS

$$\frac{\text{Screen Ratio}}{\text{Confirm Ratio}}$$

Réactifs du kit

- Pool de plasmas normaux rigoureusement sélectionnés
 - ❖ Au moins 20 plasmas normaux citratés d'individus sains
 - TP > 80%
 - TCA 30-34 sec
 - Fibrinogène 2-4 g/L
 - Facteurs 80-120% / ATIII 80-120%
 - Sans LA/APA et APC-R négatif dans les plasmas sélectionnés
 - Pas de PPL dans les plasmas sélectionnés
- Validés avec réactifs de TCA et réactifs Screen et Confirm des LA

Réactifs validés

➤ Pool Norm a été validé pour les réactifs Stago suivants :

❖ Dépistage multiple

➤ STA[®]-PTT A (PTT Automate)

❖ Dépistage pré-opératoire

➤ STA[®]-Cephascreen[®]

➤ STA[®]-CK Prest[®] (CK Prest[®])

❖ Dépistage des LA

➤ PTT-LA

➤ STA[®]-Staclot[®] DRVV Screen

➤ STA[®]-Staclot[®] DRVV Confirm

Gamme Stago TCA

Gamme de produits LA

Pool maison: contraintes

➤ **Contraintes réglementaires :**

- ❖ Potential presence of HBs, HIV 1&2, HBc

➤ **Prélèvement des plasmas :**

- ❖ Patients sous antibiotiques, anticoagulants ou antiinflammatoires doivent être exclus
- ❖ Femmes enceintes, patients avec hypertension artérielle ou patients avec des problèmes cardiaques doivent être exclus
- ❖ Pas de plasmas hémolysés ou lactescent
- ❖ Pas de TP < 70% ; TCA < 0,8 et > 1,2 ; Fib < 2 et > 4 g/L
- ❖ Pas de patients avec LA et/ou APA et rPCA positif
- ❖ Pas de plasmas contenant des PPL

➤ **Conservation**

- ❖ -80°C

↪ Pas validés, contraintes réglementaires

↪ Faible standardisation

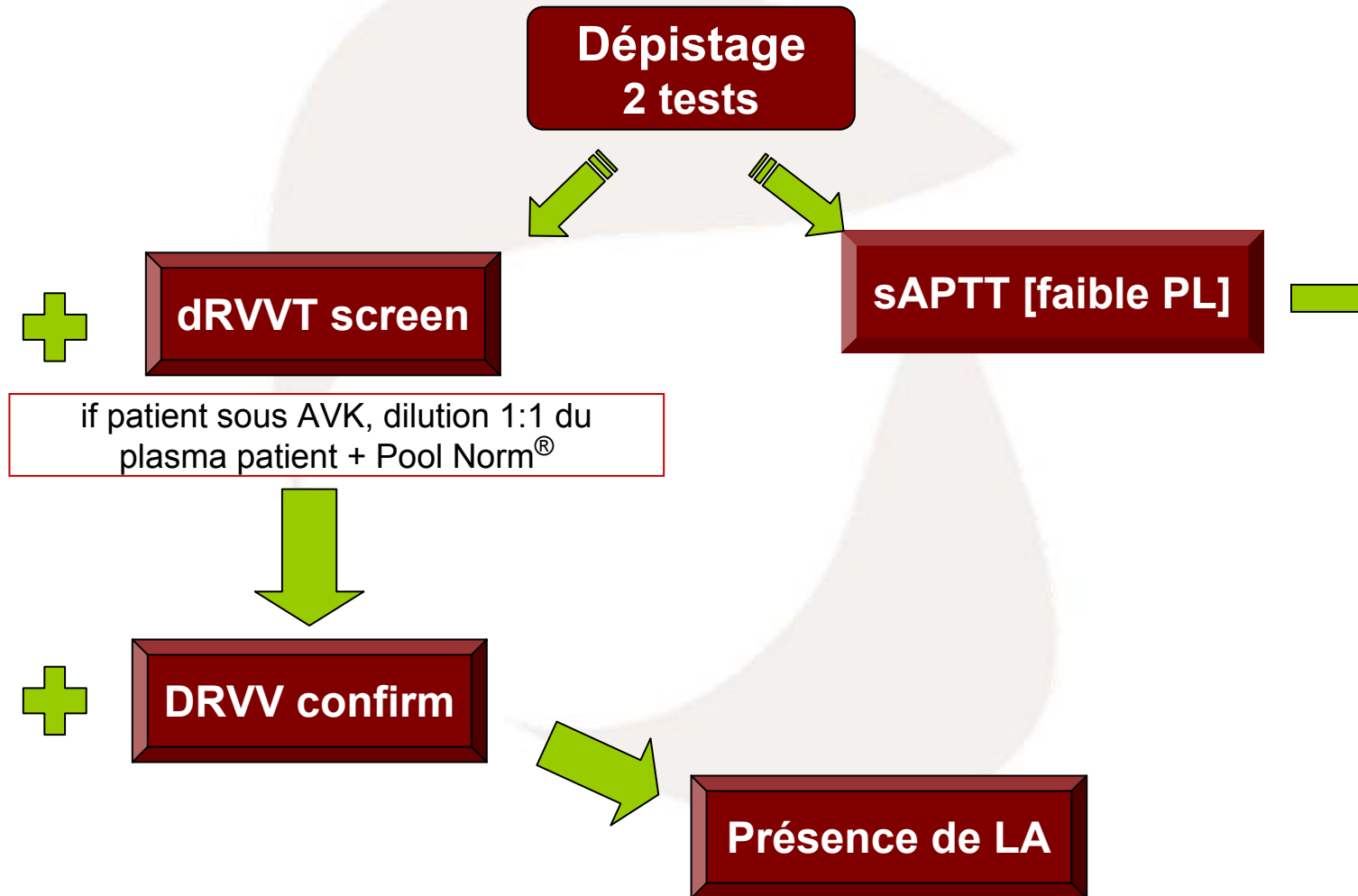
↪ Demande beaucoup de temps aux laboratoires

Avantages Pool Norm

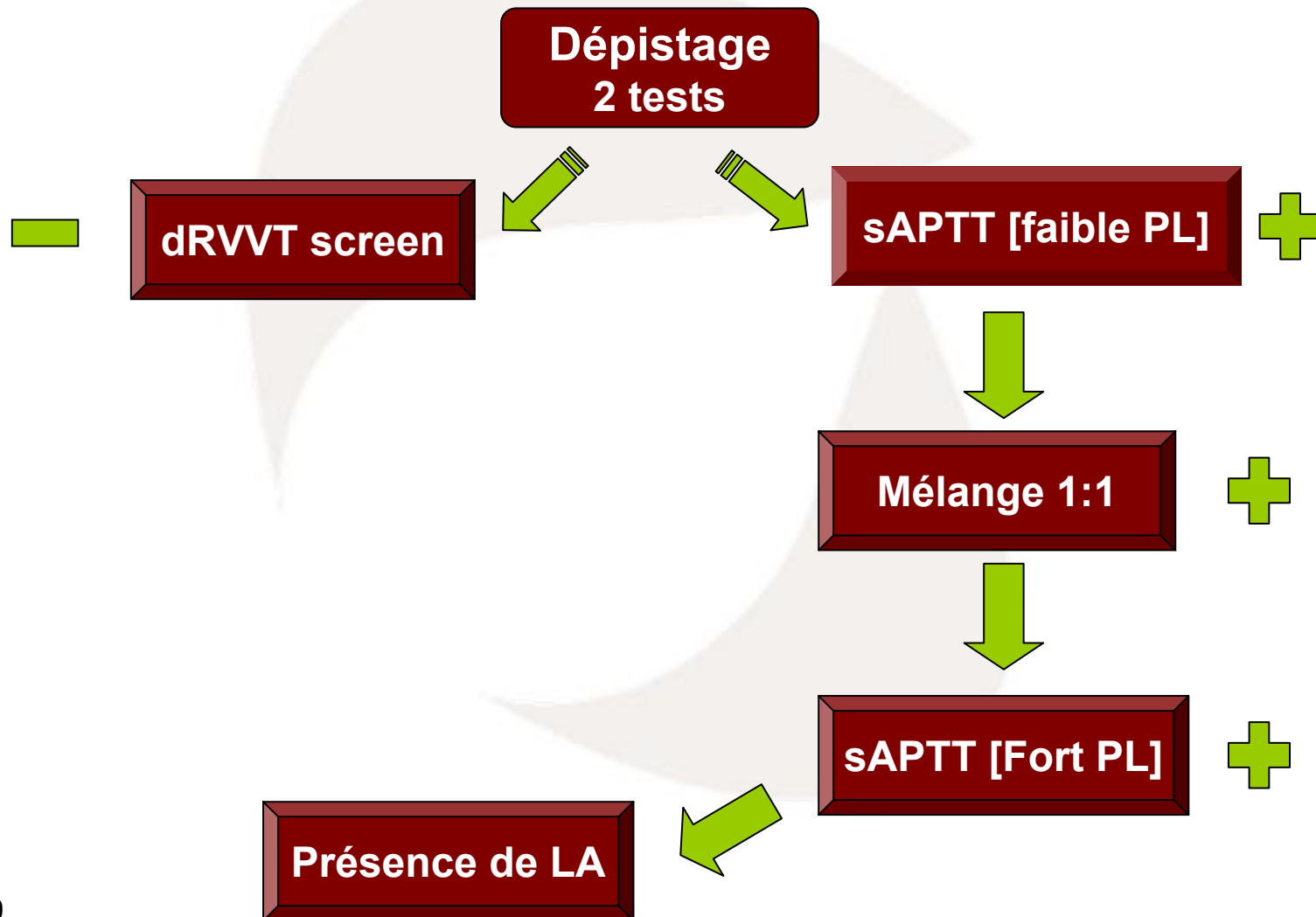
Caractéristiques	Avantages	Bénéfices
Lyophilisé	<ul style="list-style-type: none"> ↘Practicabilité Prêt à l'emploi après reconstitution (30 min.)	<ul style="list-style-type: none"> ↘Manipulation facile - prêt à l'emploi après reconstitution Par rapport aux pools maison <ul style="list-style-type: none"> ↘Meilleure standardisation Reproductibilité de lot à lot
Volume = 1 mL (x12 flacons)	<ul style="list-style-type: none"> ↘Adapté au travail en série Test du mélange /Quotidien Test du DRVV /hebdomadaire	<ul style="list-style-type: none"> ↘Économie de réactif ↘Bon rapport qualité/prix
Sample selection	<ul style="list-style-type: none"> ↘Pas d'interférences ↘Sécurité de manipulation 	<ul style="list-style-type: none"> ↘Résultats fiables ↘Pas de risque de bactéries ou de virus pour le personnel du labo (pool maison)
Validé cliniquement	<ul style="list-style-type: none"> ↘Marqué CE 	<ul style="list-style-type: none"> ↘Confiance dans le rendu de résultats

Suggestion d'algorithme pour la détection des LA

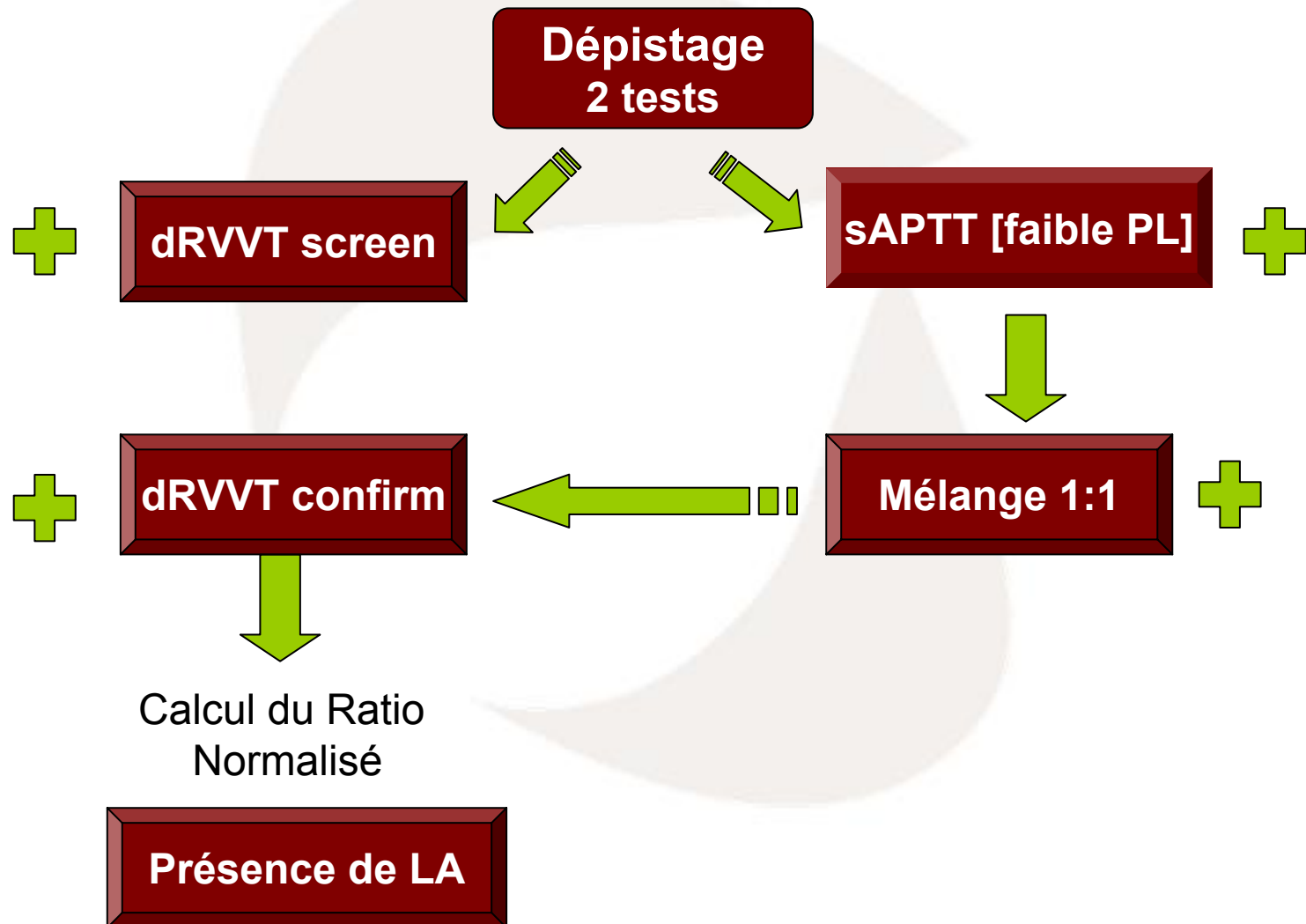
Suggestion d'algorithme pour la détection des LA



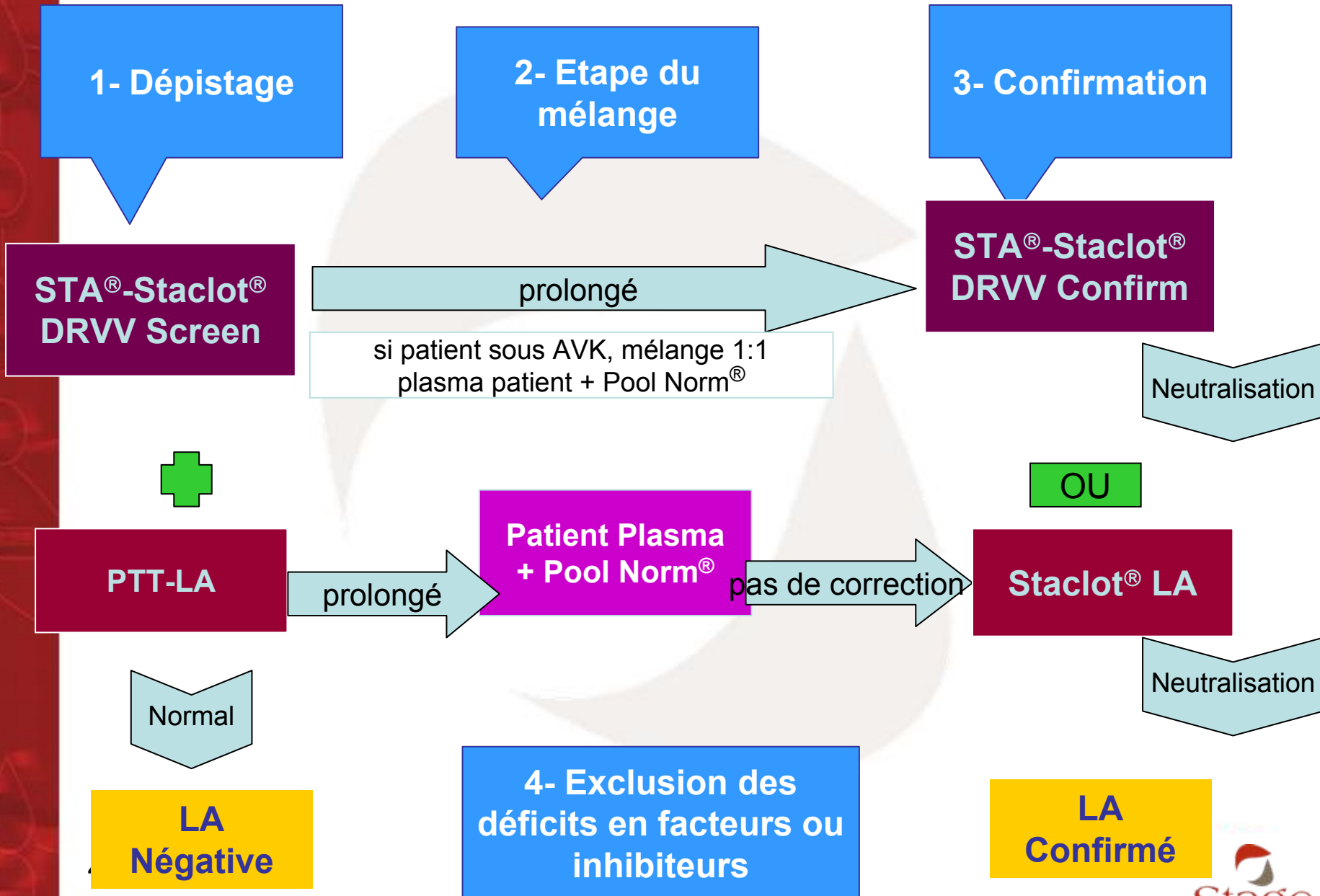
Suggestion d'algorithme pour la détection des LA



Suggestion d'algorithme pour la détection des LA



Suggestion d'algorithme pour la détection des LA



Merci de votre attention !