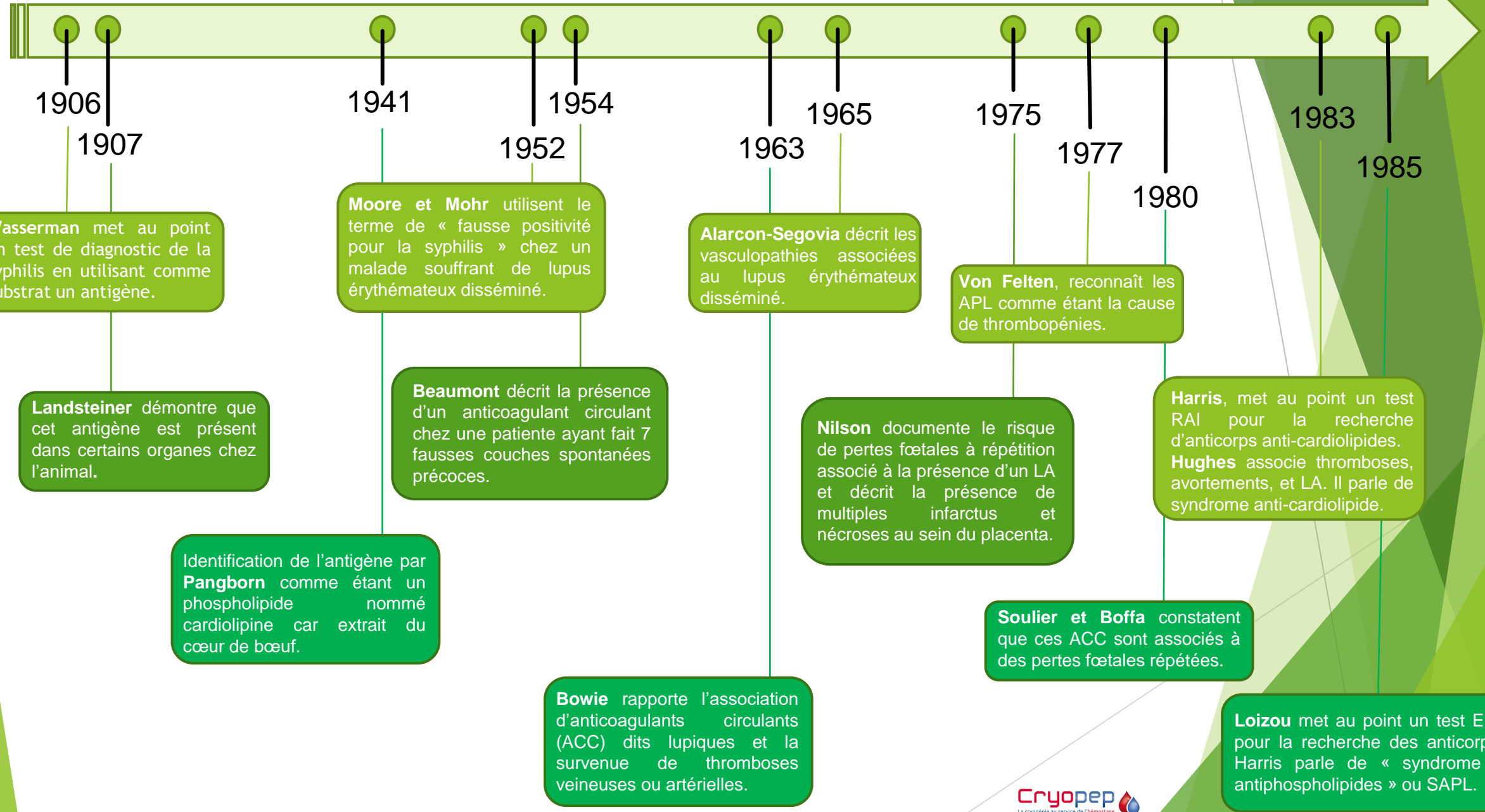


# LES LUPUS ANTICOAGULANTS



*Des généralités  
aux  
méthodes de diagnostic*



## Les SAPL (Syndrome des antiphospholipides) :

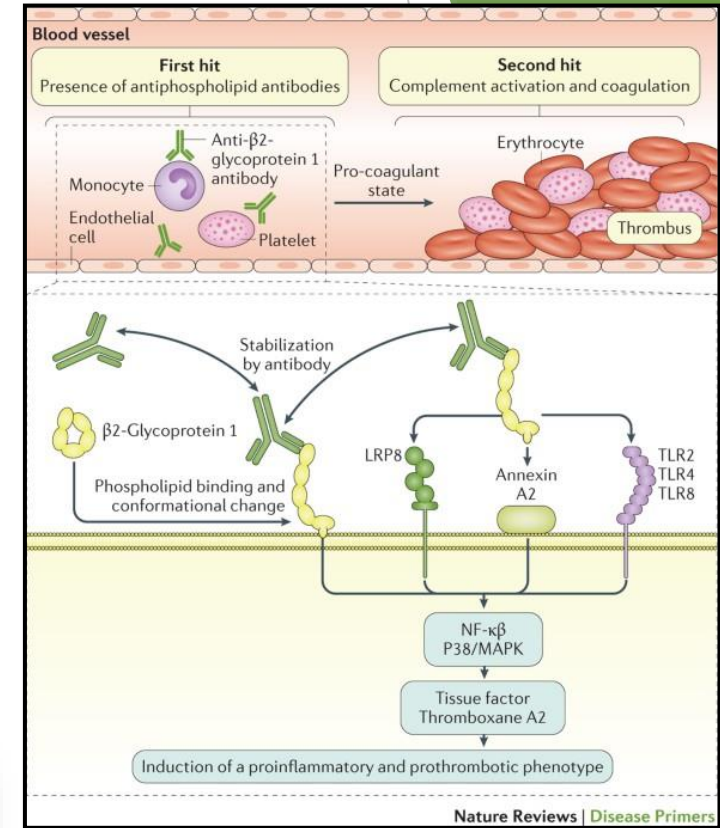
- Maladie auto-immune acquise
- Anticorps dirigés contre les phospholipides (APL) et les protéines plasmatiques
- L'incidence est estimée à 5 nouveaux cas pour 100 000 individus/an

Les APL provoquent principalement (>20% des cas) :

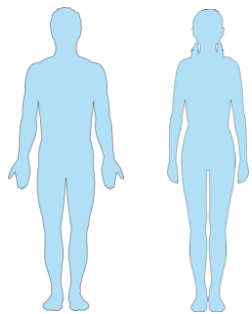
- ❖ Thrombopénie
- ❖ Thromboses (veineuses et artérielles),
- ❖ AVC
- ❖ Arthrite
- ❖ Attaques ischémiques transitoires (AIT)
- ❖ Accidents obstétricaux
- ❖ Migraines
- ❖ Livedo reticularis :  
*manifestation cutanée ou chronique, « marbrures ».*



Livedo reticularis



Schreiber K, et al, Nat Rev Dis Primers, 2018

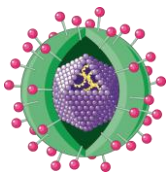


**Sexe de patient** : plus fréquemment observé chez les femmes

*Les femmes sont 4 à 5 fois plus souvent concernées que les hommes par le SAPL primaire.*



**Maladie auto-immune**: notamment retrouvée chez les personnes présentant un lupus érythémateux disséminé

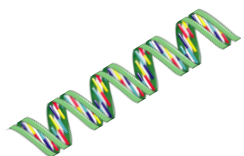


**Maladies infectieuses**: plus fréquentes chez les personnes atteintes de maladies tels que : VIH, syphilis, hépatite C ou maladie de Lyme



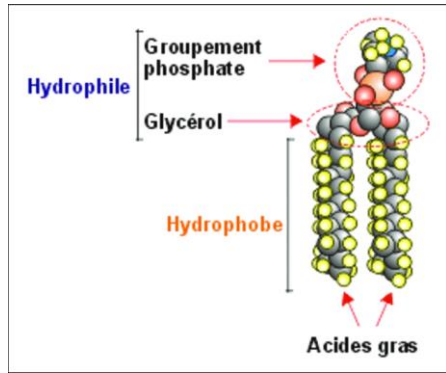
**Médicaments**: Certains médicaments ont été associés au SAPL

- Hydralazine : hypertension artérielle
- Quinidine : régulation du rythme cardiaque
- Phénytoïne : anti-épileptique
- Amoxicilline : antibiotique



**Antécédents familiaux** : La présence d'APL semblerait héréditaire

## Structure d'un phospholipide

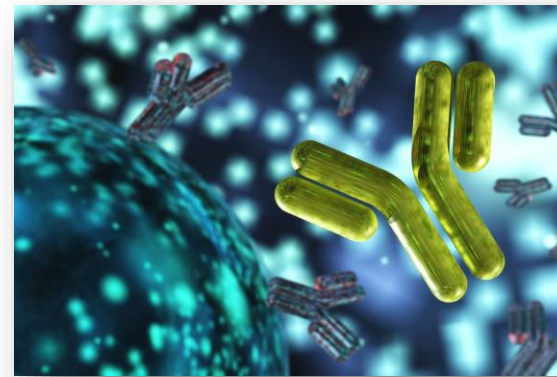


D'après la thèse de Frédéric Harb 2012

- Anticorps anti-phospholipides (APL) : groupe d'auto-anticorps hétérogène dirigé contre des phospholipides et des protéines plasmatiques liant les phospholipides induisant un état d'hypercoagulabilité.

De type IgA, IgG ou IgM, les anticorps anti-phospholipides peuvent être classés en plusieurs groupes :

- Anti- $\beta$ 2GPI : un sous-type d'anticorps anti-cardiolipine
- Anti-cardiolipine (aCL)
- Anti-prothrombine (aPT)
- Lupus anticoagulant (LA)



### Pour mesurer les APL :

Test en phase solide (ELISA) : aCL

Test en phase liquide (tests de coagulation) : LA



- Les LA sont souvent associés avec un lupus érythémateux disséminé ou systémique (LED/LES). On parle de **SAPL associé** lorsque les LA sont associés aux LED.

*Le LED ou LES est une maladie auto-immune liée à une dysfonction du système immunitaire qui se manifeste en général, par une éruption en forme de masque sur le visage mais qui touche aussi d'autres parties du corps.*



On parle de **SAPL primaire** lorsque les LA ne sont pas associés à un LED.


- Les LA sont des immunoglobulines hétérogènes potentiellement transitoires qui se lient aux phospholipides et protéines. Les LA provoquent une altération de la coagulation favorisant notamment le développement de thromboses *in vivo*.

### Symptômes cliniques :

- Complications obstétricales  
(fausse couche, accouchement précoce, mortalité lors de la naissance)
- Thromboses récurrentes  
(souvent traitées sur du long terme avec des anticoagulants)
- Anomalies biologiques






# Les aspects méthodologiques

Received: 6 June 2020 | Accepted: 31 July 2020  
DOI: 10.1111/jth.15047

**RECOMMENDATIONS AND GUIDELINES** 

## Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis

Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation

Katrien M. J. Devreese<sup>1,2</sup>  | Philip G. de Groot<sup>3</sup> | Bas de Laat<sup>3</sup> | Doruk Erkan<sup>4</sup> | Emmanuel J. Favaloro<sup>5</sup>  | Ian Mackie<sup>6</sup> | Marta Martinuzzo<sup>7</sup> | Thomas L. Ortel<sup>8,9</sup> | Vittorio Pengo<sup>10</sup>  | Jacob H. Rand<sup>11</sup> | Armando Tripodi<sup>12,13</sup> | Denis Wahl<sup>14,15</sup>  | Hannah Cohen<sup>16,17</sup> 

Coagulation Laboratory, Department of Laboratory Medicine, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium  
Department of Diagnostic Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium  
Synapse Research Institute, Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands  
Barbara Volcker Center for Women and Rheumatic Diseases, Hospital for Special Surgery, Weill Cornell Medicine, New York, NY, USA  
Department of Haematology, Sydney Centres for Thrombosis and Haemostasis, Institute of Clinical Pathology and Medical Research (ICPMR), NSW Health Pathology, Westmead Hospital, Westmead, NSW, Australia  
Haemostasis Research Unit, Research Haematology Department, University College London, London, UK  
Laboratorio Central del Hospital Italiano de Buenos Aires, Departamento de Bioquímica Aplicada, Instituto Universitario del Hospital Italiano, Buenos Aires.

# LES LUPUS ANTICOAGULANTS

# Aspects méthodologiques pour la recherche des anticoagulants lupiques (LA)



En accord avec les recommandations de l'ISTH<sup>1</sup> :

- Les résultats des tests doivent être interprétés avec prudence du fait de la possibilité de faux négatifs ou de faux positifs dans les cas suivants:
  - Mesure durant une phase clinique aiguë
    - FVIII ou protéine C-réactive augmenté
  - Patients recevant un traitement anticoagulant
    - AVK
    - Héparine
    - DOAC
  - Patientes pendant la grossesse

*L'ensemble des recommandations détaillées sont décrites dans la publication suivante disponible sur le site web Cryopep.*

<sup>1</sup> Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, J Thromb Haemost. 2020;18:2828-2839



# Aspects méthodologiques pour la recherche des anticoagulants lupiques (LA)



En accord avec les recommandations de l'ISTH<sup>1</sup> :

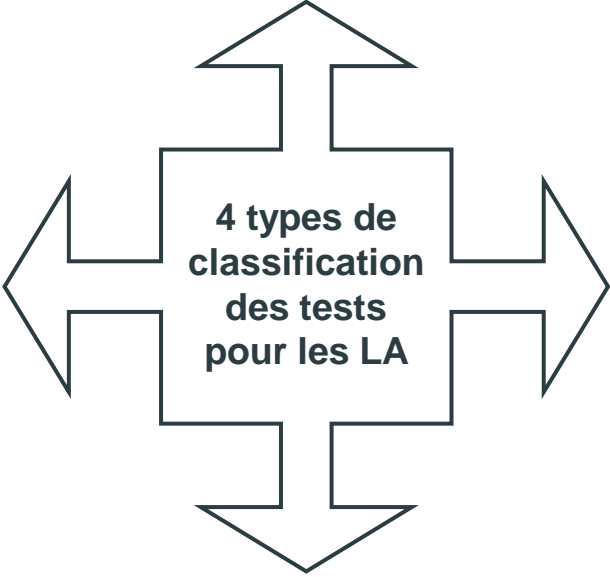
- **Utilisation de deux tests basés sur des principes différents**
  - Le premier test est le **dRVVT**
  - Le deuxième test doit utiliser une concentration en phospholipides (**PL**) faible et idéalement de la silice comme activateur → **TCA « lupus sensible »**
- Le LA doit être considéré comme positif si l'un des deux systèmes de test donne un résultat positif dans les trois étapes suivantes :



<sup>1</sup> Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, J Thromb Haemost. 2020;18:2828-2839

*Test de détection indépendant*  
**TCA**  
(activateur : silice)  
avec un faible taux de phospholipides

*Test couplé*  
**dRVVT**  
Test de détection (*dRVVT screening*)  
avec un faible taux de phospholipides  
Test de confirmation (*dRVVT confirm*)  
avec un taux élevé de phospholipides



*Test intégré*  
**HPPNA**  
Les tests de détection et de confirmation intégrant les tests de mélange sont effectués en parallèle

*Test de confirmation indépendant*  
**PNP**  
(procédure de neutralisation par les plaquettes)  
TCA (silice) avec ajout de phospholipides plaquettaires

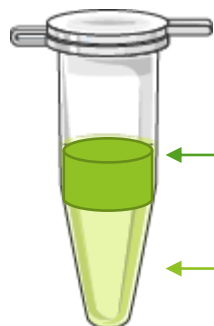
TCA : Temps de Céphaline Activée  
HPPNA : test de neutralisation des phospholipides en phase hexagonale  
PNP : procédure de neutralisation par les plaquettes  
dRVVT : test du venin de la vipère Russell dilué

## TCA – Temps de céphaline activée

- Basé sur l'activation de la voie intrinsèque
- Le réactif utilisé doit être sensible aux LA (ex : silice)
- Test avec un faible taux de PL
- Allongement du TCA peut avoir de nombreuses causes → confirmation par un test de type PNP

Exemple de test de détection indépendant

**Calcium**  
Initiation de la coagulation



Réactif TCA : PL et activateur de la phase contact

Plasma du patient

Temps de coagulation prolongé pourrait indiquer la présence de LA

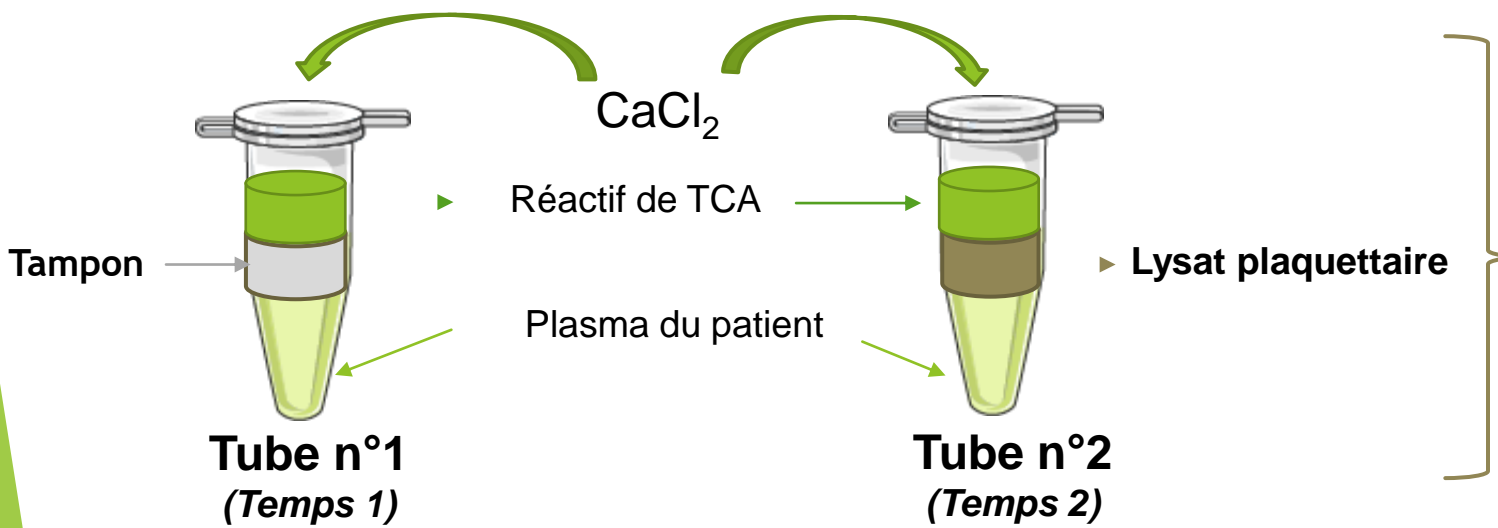
### Test de détection

Exemple de TCA lupus sensible : PTT-LA (Stago); APTT-SP (Werfen); Siron LS (Technoclone)

### PNP – Procédure de neutralisation par les plaquettes

- Test TCA : Basé sur l'activation de la voie intrinsèque
- Test de confirmation de la présence de LA
- PL plaquettaires : chargés négativement pour atténuer ou neutraliser les LA
- Test qui est affecté en présence d'héparine

Exemple de test de confirmation indépendant



Les PL plaquettaires neutralisent les LA et provoquent un raccourcissement du temps de coagulation

Suspicion de la présence de LA

L'initiation de la coagulation s'effectue par le réactif de TCA :  
- dans le mélange tampon et plasma du patient (Tube n°1)  
- dans le mélange de lysat plaquettaire et plasma du patient (Tube n°2)

Résultat LA négatif : temps 1 – temps 2 = ≤ 2,5 s

Exemple de TCA lupus sensible : PTT-LA (Stago) ; APTT-SP (Werfen) ; Siron LS (Technoclone)  
Exemple de Lysat plaquettaire : CRYOcheck™ Platelet Lysate PNP-10

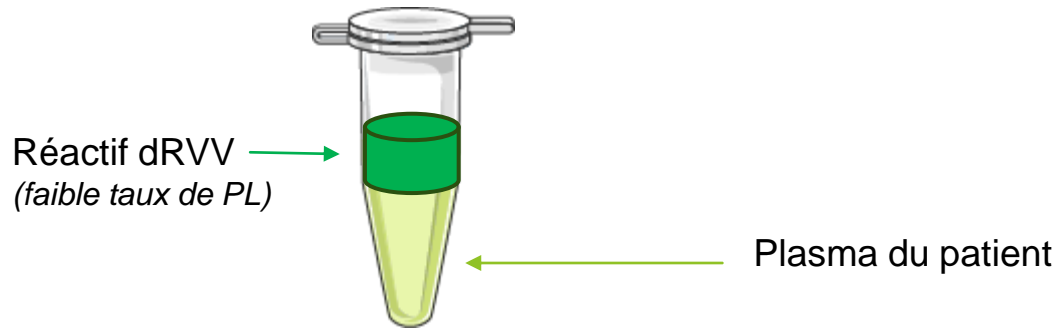
## dRVVT – temps de venin de vipère Russell dilué

Recommandé en 1<sup>ère</sup> intention par l'ISTH et le CLSI\*

- Basé sur l'activation de la voie commune
- Test de détection : faible taux de PL
- Test de confirmation : fort taux de PL
- Test plus spécifique pour les LA que le TCA, KCT et dPT et largement utilisé
- Résultats exprimés sous forme d'un ratio (test de détection (s) / test de confirmation (s))

### Exemple de test couplé

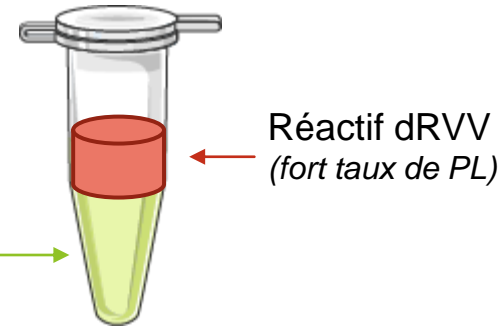
#### Test de détection



Activation du FX en by-passant le FVII de la voie extrinsèque.

#### Test de confirmation

A réaliser si le test de détection suggère la présence de LA



Le réactif amène un excès de PL neutralisant les LA s'ils sont présents et raccourcissent le temps de coagulation.

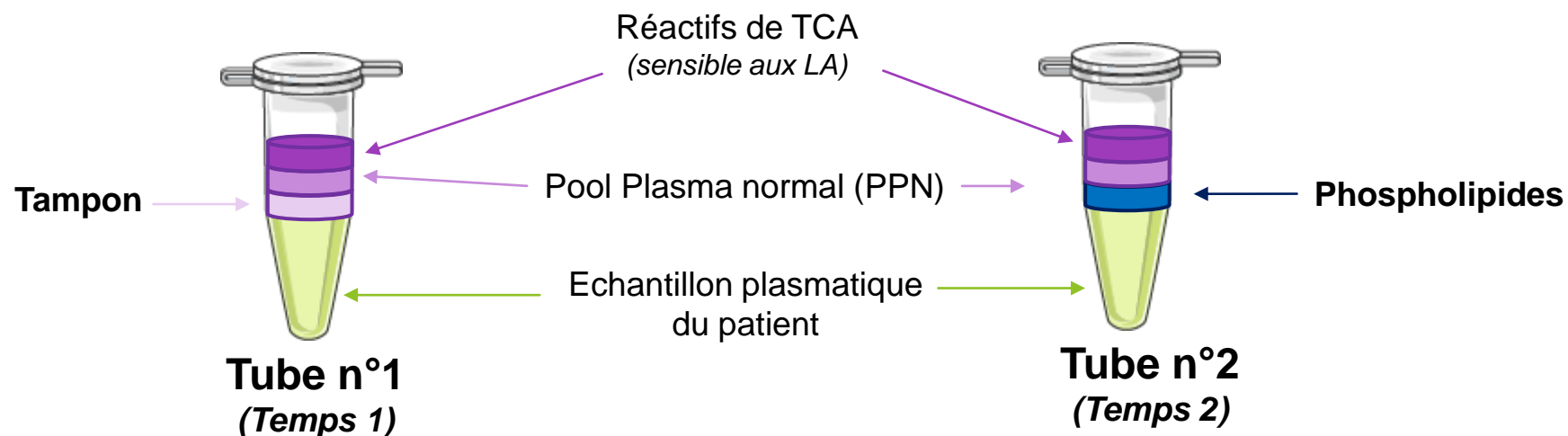
Résultats : ratio (test de détection / test de confirmation) comparé au seuil défini sur pool de 40 donneurs normaux.  
**les résultats sont évocateurs de LA si le ratio est supérieur au 99<sup>e</sup> centile**



## Exemple de test intégré

### HPPNA – test de neutralisation des PL en phase hexagonale

- TCA basé sur l'activation de la voie intrinsèque
- **Test de détection, confirmation et mélange dans un seul test commun**
- Les résultats : différence entre le temps 1 et le temps 2 (en seconde)



L'initiation de la coagulation s'effectue par le réactif de TCA sensible aux LA dans le mélange tampon et PPN (Tube n°1) et dans un mélange phospholipides et PPN (Tube n°2)

Résultat positif aux LA si temps 1 – temps 2 revient à la normale  
(le cut-off est défini sur 40 donneurs normaux)

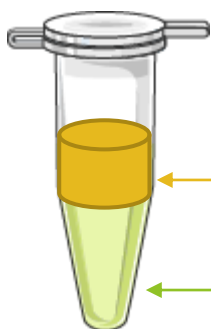
**les résultats sont évocateurs de LA si le ratio est > 99e centile**

## Exemple de test de mélange



### Test du mélange

- Utilisation d'un Pool de Plasma Normal (**PPN**) interne constitué d'au moins 40 donneurs sains ou d'un pool normal de plasma frais<sup>1</sup> avec le marquage CE
- le PPN doit être utilisé, sans préincubation, dans les 30 minutes.
- Selon l'ISTH, le test du mélange s'effectue sur les tests : dRVVT et TCA + PNP
- Pour le dRVVT : Préparation des mélanges (vol/vol) de PPN et de plasma du patient avec les réactifs de détection et de confirmation nommé « test de détection sur mélange » (TDM) et « test de confirmation sur mélange » (TCM) réciproquement. Le rapport est calculé par TDM / TCM.
- Pour le TCA : Préparation des mélanges (vol/vol) de PPN et de plasma du patient avec les réactifs du Test PNP (Procédure de neutralisation par les plaquettes). Le rapport est calculé par temps 1 (tampon) – temps 2 (PNP).
- Résultat positif si rapport >99e centile.



Pool de plasma normal (PPN)

Echantillon plasmatique du patient

Mélange vol/vol des 2 plasmas.  
Utilisé dans les tests de détection et de confirmation des LA:  
dRVVT et TCA + PNP

(<sup>1</sup> Exemple Pool de plasma frais congelé CE: **CRYO**check™ Pooled Normal Plasma Ref : CCN-10)

# Classement de sensibilité des tests de détection des LA (dRVVT, PNP, HPPNA)

## Nine-test panel has superior sensitivity to detect antiphospholipid antibody syndrome in patients with or without SLE

Konrad Dziamski<sup>1</sup>, Saika Sharmeen<sup>1</sup>, Katalin Banki<sup>2</sup>, Andras Perl<sup>3</sup>

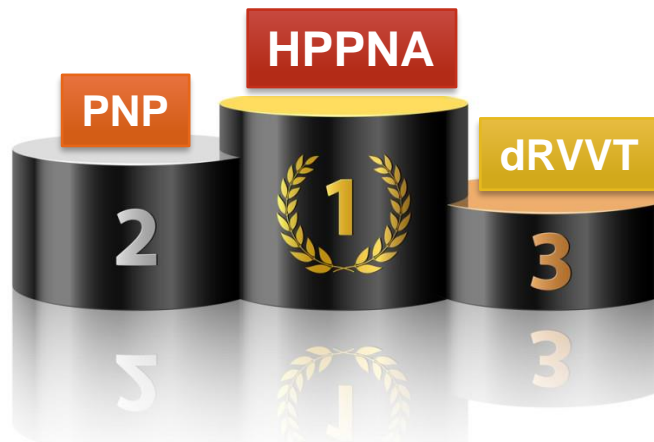
Affiliations + expand

PMID: 32200114 PMID: PMC7200285 DOI: 10.1016/j.clim.2020.108388

[Free PMC article](#)

Our study clearly indicates that the HPPNA is by far the most sensitive individual LAC test to detect APS in the presence or absence of concurrent SLE. The only exception was PNP, which was the most sensitive test to detect APS in non-SLE patients with stroke. Otherwise, PNP was the 2<sup>nd</sup> most sensitive test for detection of APS in all other patient groups. In contrast, dRVVT was less sensitive than HPPNA or PNP in all patient groups tested.

Our findings indicate that HPPNA should be chosen to screen for aPL. This is consistent with earlier observations that HPPNA is underutilized among the various LAC assays.



- L'utilisation des phospholipides en phase hexagonale est de loin le test le plus sensible dans la détection du SAPL.
- HPPNA apparaît comme le test de détection le plus recommandé.
- Les contrôles **CRYOcheck™** de détection répondent aux besoins de ces 3 types de tests.

HPPNA : test de neutralisation des phospholipides en phase hexagonale

PNP : procédure de neutralisation par les plaquettes

dRVVT : test du venin de la vipère Russell dilué

SLE : Lupus érythémateux systémique

aCL : anticardiolipine

aβ2 : anti β2-glycoprotéine 1

SAPL : syndrome des antiphospholipides

# Procédure de recherche des LA

1<sup>er</sup> Test

**Test couplé  
dRVVT**

**Test de détection : dRVVT screening**  
*(avec un faible taux de phospholipides)*  
**Test de confirmation : dRVVT confirm**  
*(avec un fort taux de phospholipides)*

+

**Test du mélange : dRVVT  
screening et confirm +  
Pool de Plasma Normal (PPN)**

et

2<sup>ème</sup> Test  
Option 1

**Test de détection indépendant  
TCA**

*(silice) avec un faible taux de  
phospholipides*

+

**Test de confirmation  
indépendant  
PNP**

*(procédure de neutralisation par les  
plaquettes)*

+

**Test du mélange : TCA + PNP  
+ Pool de Plasma Normal (PPN)**

ou

2<sup>ème</sup> Test  
Option 2

**Test intégré  
HPPNA**

*Les tests de détection et de  
confirmation intégrant les tests de  
mélange sont effectués en parallèle*

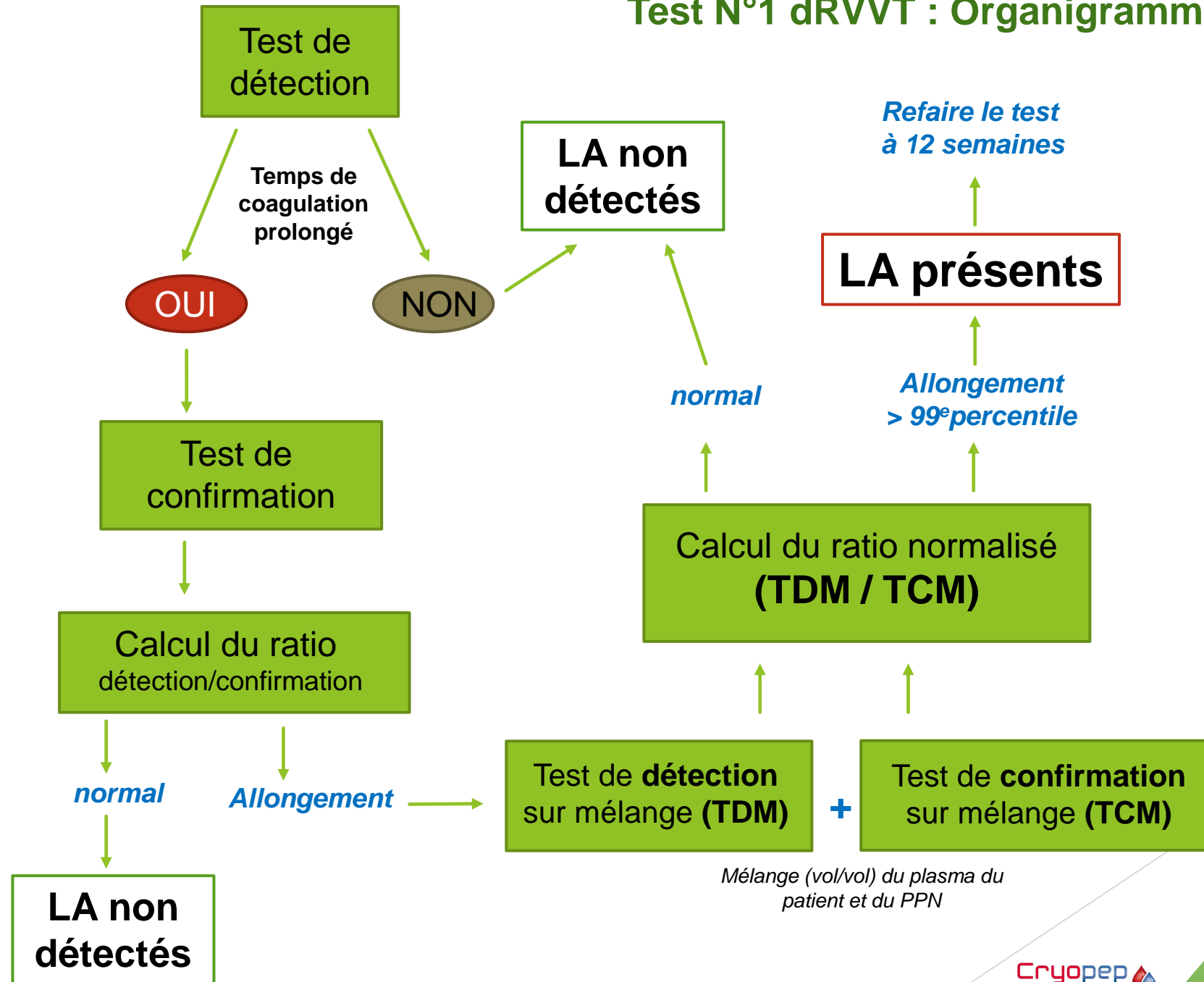
Contrôles  
utilisés dans  
les tests



En accord avec les recommandations de l'ISTH<sup>1</sup> :

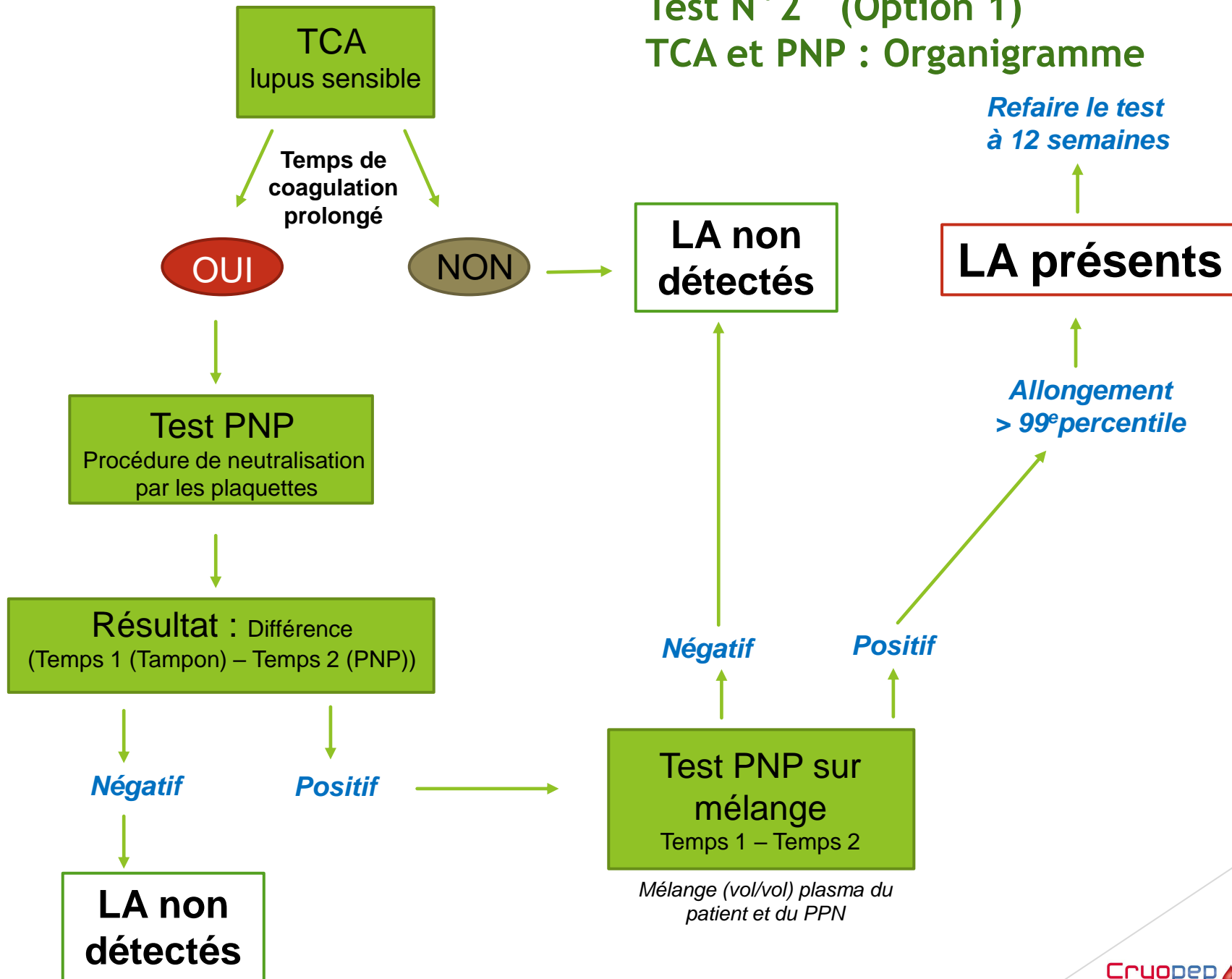
<sup>1</sup> Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, J Thromb Haemost. 2020;18:2828-2839

# Test N°1 dRVVT : Organigramme



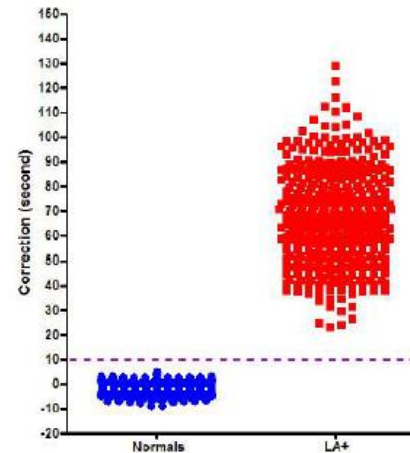
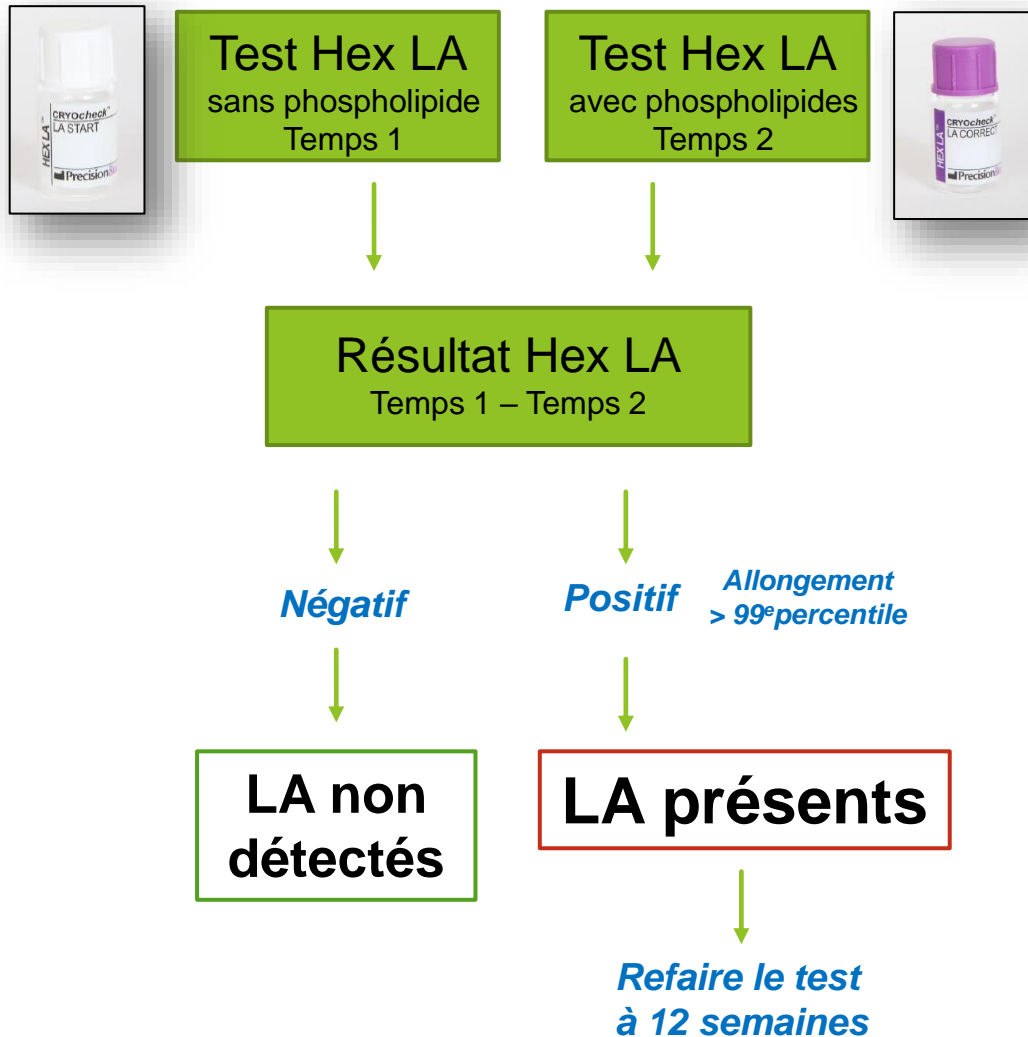


# Test N°2 (Option 1) TCA et PNP : Organigramme





## Test N°2 (Option 2) HPPNA : Organigramme



Résultats obtenus après la mesure de 1842 temps de coagulation avec 158 plasmas normaux et 154 plasmas positifs aux LA, 3 lots de Hex LA™ ont été utilisés sur le STA-R Evolution®

Données fournies par PBI

Algorithmes des tests de LA  
Système intégré

# Coffrets pour la recherche des LA\*

1<sup>er</sup> Test

et

2<sup>ème</sup> Test  
Option 1

ou

2<sup>ème</sup> Test  
Option 2

**Test couplé**  
**dRVVT**

Test de détection : dRVVT screening  
Test de confirmation : dRVVT confirm

**Test de détection indépendant**  
**TCA**  
(silice) avec un faible taux de phospholipides

**Test de confirmation indépendant**  
**PNP**  
(procédure de neutralisation par les plaquettes)

**Test intégré**  
**HPPNA**

Les tests de détection et de confirmation intégrant les tests de mélange sont effectués en parallèle

Test du mélange : dRVVT screening et confirm + Pool de Plasma Normal (PPN)

Test du mélange : TCA + PNP + Pool de Plasma Normal (PPN)

→ Besoin de 3 coffrets diagnostiques :

- CRYOcheck™ LA Check™
- CRYOcheck™ LA Sure™
- CRYOcheck™ Pooled normal plasma™

→ Besoin de 3 coffrets diagnostiques :

- Réactifs TCA lupus sensible
- CRYOcheck™ Platelet Lysate
- CRYOcheck™ Pooled normal plasma™

→ Besoin d'1 seul coffret diagnostique :

- CRYOcheck™ Hex LA™

+ Contrôles adaptés pour l'ensemble des tests :

- CRYOcheck™ Lupus Negative Control
- CRYOcheck™ Weak Lupus Positive Control
- CRYOcheck™ Lupus Positive Control

\* En accord avec les recommandations de l'ISTH

1<sup>er</sup> Test

## Test couplé dRVVT

### Test de détection (dRVVT screening)

**CRYOcheck™ LA Check™**

Référence : CHK-10



### Test de confirmation (dRVVT confirm)

**CRYOcheck™ LA Sure™**

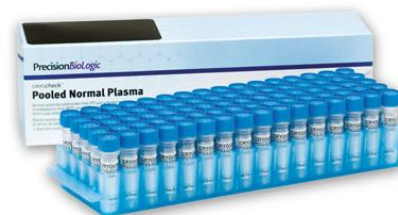
Référence : SUR-10



### Pool de Plasma Normal (PPN)

**CRYOcheck™ Pooled normal plasma**

Référence : CCN-10



## Test du mélange

Contrôles utilisés  
dans les tests



2<sup>ème</sup> Test  
Option 1

Test de  
détection  
indépendant

**TCA (silice) avec un faible taux de phospholipides**

**TCA lupus sensible**

Test de  
confirmation  
indépendant

**PNP (Procédure de Neutralisation  
par les Plaquettes)**

**CRYOcheck™ Platelet Lysate**

Référence : PNP-10



Test du  
mélange

**Pool de Plasma Normal (PPN)**

**CRYOcheck™ Pooled normal plasma**

Référence : CCN-10



Découvrir la présentation détaillée du coffret CRYOcheck™ Platelet Lysate



Contrôles utilisés  
dans les tests





2<sup>ème</sup> Test  
Option 2

**Test  
intégré**

**HPPNA**

**CRYOcheck™ Hex LA™**  
Référence : *HEXLA*



Contrôles utilisés  
dans les tests



Les tests de détection et de confirmation intégrant les tests de mélange sont effectués en parallèle

Découvrir la présentation détaillée du coffret **CRYOcheck™ Hex LA™**



# Contrôles disponibles sous différents formats

## → Le contrôle négatif

### CRYOcheck™ Lupus Negative Control

Référence : CCLN-05, CCLN-10

Conditionnement : 25 x 0,5 mL / 25 x 1,0 mL

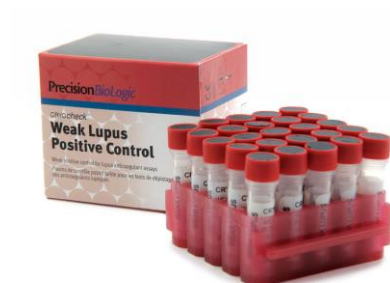


## → Le contrôle positif faible

### CRYOcheck™ Weak Lupus Positive Control

Référence : CCWLP-05, CCWLP-10

Conditionnement : 25 x 0,5 mL / 25 x 1,0 mL



## → Le contrôle positif fort

### CRYOcheck™ Lupus Positive Control

Référence : CCLP-05, CCLP-10

Conditionnement : 25 x 0,5 mL / 25 x 1,0 mL



Découvrir la présentation détaillée des contrôles Lupus



Gamme de réactifs congelés, certifiés CE/IVD

## Soutien au processus de recherche de nouveaux produits

L'intégration d'un nouveau produit nécessite de nombreuses décisions, notamment la recherche d'une solution qui conviendra le mieux et sera la plus efficace.

## La solution adaptée à vos besoins

Vous avez besoin d'un partenaire qui peut vous accompagner à chaque étape et ainsi vous apporter une réponse adaptée à votre fonctionnement.



83 rue Yves Montand  
34080 Montpellier  
T : 04 67 10 71 20  
<https://www.cryopep.fr>  
contact@cryopep.com



## PrecisionBioLogic

**Precision BioLogic Inc.**  
140 Eileen Stubbs Avenue  
Dartmouth, NS  
B3B 0A9  
Canada

## Test et validation des produits sélectionnés

Dans le cadre de la détection des LA et en tant que distributeur de confiance, nous avons le plaisir de mettre à votre disposition une gamme de coffrets et produits associés à usage diagnostique entièrement adaptables sur automates.

## Expertise et compétences

Un support scientifique est présent pour répondre à toutes vos questions, vous conseiller sur l'utilisation optimale des produits et ainsi valoriser les performances de votre laboratoire.