



## Intérêt de tests intégrés Lupus Ratio

## Evaluation of integrated Lupus Ratio test

# تقييم التجارب المتكاملة «نسبة الذئبة» في تشخيص مرض الذئبة مضادات التخثر

K. Haouach, B. L. Gerland, R. Seddik, S. Benkirane, A. Masrar.

**الملخص : مقدمة :** يعتبر تحسين استراتيجية التشخيص لمضادة التجلط الذئبة شرط أساسي في الإرقاء. وهدف عملنا هو تطوير وتقييم الاختبارات المتكاملة ثلاثة معبراً عنها بنسبة طبيعية أو «نسبة مرض الذئبة»، ويمكن الجمع بين المراحل المختلفة لتشخيص هذه الأجسام المضادة.

**المواد والطرق :** تم استخدام اختبارات «نسبة الذئبة» الثلاثة. وتم تحدد القيم المرجعية وعتبات الايجابية لجميع التجارب. **النتائج :** كانت النتائج الأولية لدينا متطابقة متعارضة مع المحصل عليها سابقاً بالأساليب التقليدية للكشف عن الأجسام المضادة من نوع مرض الذئبة بالدم.

**المناقشة :** فائدة التجارب المتكاملة هي مقارنة النتائج التي توصلنا إليها مع تلك للأبحاث المنشورة. **خاتمة :** تحديد «نسبة الذئبة» توفر نتائج مقنعة وواعدة تعيد النظر في استبدال التقنيات التقليدية مع تشخيص أجود، على المدى القصير.

**الكلمات الأساسية :** نسبة الذئبة.

**Résumé : Introduction :** l'amélioration de la stratégie diagnostique des lupus anticoagulants est actuellement un pré-requis en hémostase. Notre objectif est de mettre au point et d'évaluer trois tests intégrés exprimés sous forme de ratio normalisé ou Lupus Ratio permettant de combiner les différentes étapes du diagnostic de ces anticorps.

**Matériel et méthodes :** Trois Lupus Ratio sont utilisés, ils sont déterminés avec le temps de céphaline activateur, le temps de thromboplastine dilué et le temps de venin de vipère Russel dilué. Des valeurs de référence et des seuils de positivité sont déterminées pour tous les tests.

**Résultats :** Nos résultats préliminaires ont montré des profils concordants et discordants avec ceux obtenus auparavant par les méthodes classiques de détection des anticorps circulants type lupique.

**Discussion :** L'intérêt des tests intégrés est discuté en comparant nos résultats avec ceux de la littérature.

**Conclusion :** La détermination des Lupus Ratio propose des résultats concluants et prometteurs et permet d'envisager, à court terme, le remplacement des techniques conventionnelles avec une amélioration diagnostique.

**Mots clés :** lupus ratio tests intégrés.

**Abstract : Introduction :** improving the diagnostic strategy of the lupus anticoagulant is prerequisite in hemostasis. The objective of our work is to develop and evaluate the three integrated tests expressed as normalized ratio or Lupus Ratio and can combine the various stages in the diagnosis of these antibodies.

**Materials and methods :** Three Lupus Ratio are used, they were determined with activator thromboplastin time, The diluted thromboplastin time and diluted Russell Viper venom time. Reference values and thresholds for positivity were determined for all tests.

**Results :** Our preliminary results showed concordant and discordant profiles with those previously obtained by conventional methods of detection of circulating lupus antibody type.

**Discussion :** The interest of the integrated testing is to discuss and compare our results with those of the literature.

**Conclusion :** The determination of the Ratio Lupus offers compelling and promising results and allows considering, for in a short term, the replacement of conventional techniques with improved diagnosis.

**Key words :** Lupus ratio integrated test

*Tiré à part : K. Haouach : Laboratoire central d'hématologie, hôpital Ibn Sina CHU de Rabat - Salé- Maroc.*

## Introduction

Le syndrome des anti-phospholipides est une entité clinico-biologique définie par l'association de thromboses ou de complications obstétricales à la présence d'anticorps anti-phospholipides (aPL) [1]. Ces anticorps sont classiquement séparés en deux groupes en fonction du mode de détection analytique [1,2,3,4] :

- anticorps détectés par des techniques immuno-enzymatiques et dirigés contre des phospholipides (anticorps anti-cardiolipine (aCL), anti-phosphatidyléthanolamine...) ou contre des protéines (anticorps anti- $\beta$ 2-glycoprotéine) ;
- anticoagulant lupique (LA ou lupus anticoagulant) détecté par l'allongement des tests de coagulation dépendants des phospholipides.

L'objectif de notre travail est d'améliorer la stratégie diagnostique des lupus anticoagulants dans notre laboratoire. En effet nous envisageons de mettre au point et d'évaluer trois tests intégrés décrits par Jacobsen et al [5]. Ces tests sont exprimés sous forme de ratio normalisé ou Lupus Ratio. Trois Lupus Ratio ont été utilisés, déterminés avec le TCA (Temps de Céphaline Activateur), le TTD (Temps de Thromboplastine Diluée) ou le dRVVT (temps de venin de vipère Russel dilué).

## Matériel et méthodes

### Détermination des Lupus Ratio

Le Lupus Ratio (LR) est un rapport des temps de coagulation donné par la formule suivante :

$$LR = \frac{(\text{Temps mélange})_{\text{dépistage}} / (\text{Temps mélange})_{\text{confirmation}}}{(\text{Temps mélange})_{\text{dépistage}} / (\text{Temps mélange})_{\text{confirmation}}}$$

NB : le réactif à faible concentration en phospholipides phospholipide (dépistage), et le réactif à forte concentration en phospholipides (confirmation).

Les différents temps de coagulation (TCA, TTD et dRVVT) sont réalisés sur l'automate BCS (Siemens). Le mélange malade/témoin est effectué volume à volume, le témoin utilisé étant un pool de plasmas frais normaux fournis par la société Biopep.

LRTCA : le couple de céphaline utilisée est le couple Actin FSL (dépistage) et Actin FS (confirmation) fournis par la société Siemens.

LRTTD : une dilution de Néoplastine (Diagnostica Stago) au 1/500 dans du tampon Owren Koller (Diagnostica Stago) est utilisée comme réactif de dépistage. Le réactif de confirmation est réalisé en ajoutant de la céphaline au réactif de dépistage précédent. Différentes dilutions de céphaline ont été testées, la dilution au 1/200 permettant la meilleure détection de LA a été retenue.

LR dRVVT : le couple de réactif LA1 (dépistage) et LA2 (confirmation) fournis par la société Biopep sont utilisés.

Des contrôles positifs sont fournis par la société Biopep: contrôle positif faible (CQ1) et contrôle positif fort (CQ2).

Détermination des seuils de positivité

Afin de définir les valeurs de références pour chaque Lupus Ratio, 50 plasmas témoins issus de donneurs sains ont été testés. Les moyennes et les écarts-type ont été calculés et les seuils de positivité ont été fixés à 97.5%.

### Première étape de notre étude :

Dix plasmas de patients pour lesquels un résultat positif de Lupus anticoagulant avait été trouvé antérieurement, sont contrôlés par la technique Lupus Ratio.

### Deuxième étape de notre étude :

Vingt plasmas sont analysés par les deux techniques (habituelle et Lupus Ratio) afin d'évaluer respectivement leur sensibilité et spécificité.

## Résultats

L'interprétation des résultats répond aux critères suivants :

- Recherche négative de Lupus anticoagulant : les 3 tests doivent être négatifs,
- Recherche douteuse de Lupus anticoagulant : 1 seul test doit être positif,
- Recherche positive de Lupus anticoagulant : au moins 2 tests de dépistage et de confirmation doivent être positifs.

### Détermination du seuil de positivité

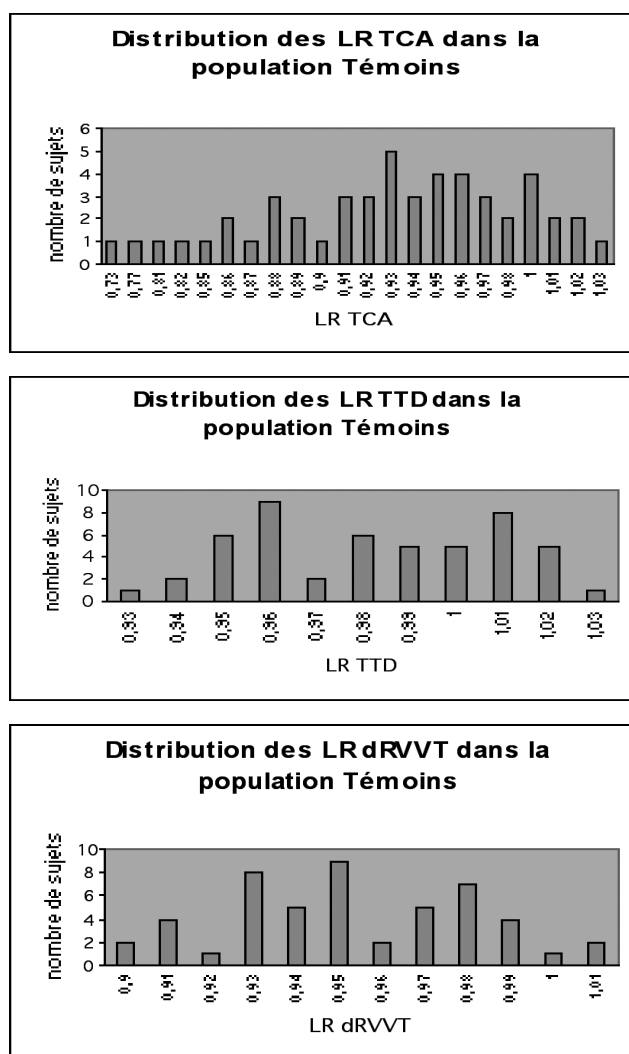
Les seuils de positivité ont été déterminés sur 50 échantillons provenant de donneurs sains. Les moyennes et écart-type ont été calculés pour chaque Lupus Ratio (tableau1).

Tableau 1 :

Resultat	LR TCA	LR TTD	LR dRVVT
Effectif	50	50	50
Moyenne	0,93	0,98	0,95
Ecart-type	0,06	0,03	0,03
Seuil de positivité (97.5 percentile)	1,03	1,02	1,01

Moyennes, écart-types et seuil de positivité des Lupus Ratio TCA, LR TTD, Lupus Ratio dRVVT calculés à partir des résultats obtenus pour la population témoins (n=50).

Figure 1:



Distribution des différents Lupus Ratio dans la population témoins (n=50)

Les distributions des différents Lupus Ratio sont présentées dans la figure 1. Les seuils de positivité calculés sont les suivants :

- Lupus Ratio TCA= 1.03
- Lupus Ratio TTD= 1.02
- Lupus Ratio dRVVT= 1.01.

Avant d'entreprendre les deux étapes de notre étude, nous avons contrôlé la validité de ces seuils en analysant deux types de contrôles : un contrôle positif faible (CQ1), un contrôle positif fort (CQ2). Les résultats obtenus avec ces contrôles sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2

	CQ1	CQ2
LR TCA	1,12	1,25
LR TTD	1,03	1,04
LR dRVVT	1,2	1,98

Résultats des Lupus Ratio des contrôles CQ1 (positif faible) et CQ2 (positif fort).

### Résultats de la première étape

Dix plasmas de patients pour lesquels la présence d'anticoagulant circulant de type lupique a été diagnostiquée ultérieurement ont été analysés en Lupus Ratio. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3

Patients	LR TCA (seuil = 1.03)	LR TTD (seuil = 1.02)	LR dRVVT (seuil= 1.01)
Patient 1	1.67	1.05	1.63
Patient 2	1.34	1.03	1.24
Patient 3	1.13	1.02	1.25
Patient 4	1.58	1.04	1.68
Patient 5	1.48	1.06	1.65
Patient 6	1.28	1.08	1.57
Patient 7	1.70	1.05	1.41
Patient 8	2.10	1.00	2.07
Patient 9	1.93	1.05	1.71
Patient 10	1.39	1.00	1.41

Résultats des LR des patients de la première étape de notre étude.

L'ensemble des Lupus Ratio TCA et Lupus Ratio dRVVT sont positifs et concordants avec les résultats antérieurs. En revanche, deux résultats de Lupus Ratio TTD (patient 8 et patient 10) sont inférieurs au seuil et sont donc discordants.

### Résultats de la deuxième étape

L'étude a été réalisée sur 20 échantillons par les deux techniques (habituelle et Lupus Ratio). Dans les tableaux 4 et 5 sont rapportés, pour chacun des patients, les résultats et les conclusions des interprétations des anticorps circulants. Ces derniers montrent la présence de six discordances :

Tableau 4

Patient	Technique habituelle			Technique LR		
	Ratio TCA seuil = 1.2	Ratio dRVVT seuil = 1.20	Ratio dRVVT seuil = 1.23	LR TCA seuil = 1.03	LR TTD seuil = 1.02	LR dRVVT seuil = 1.0
11	0.95	1,15	1,2	0.92	0.94	0.92
12	1.16	1,11	1,33	0.94	0.96	0.93
13	0.97	1,21	1,12	1.01	0.92	0.98
14	1.05	1,15	1,19	0.98	0.92	0.94
15	1.15	0.98	1,37	0.95	0.98	0.91
16	1.12	1,3	1,05	1.01	0.95	1.98
17	1.43	1,22	1,2	1.06	0.95	1.07
18	1.14	1,22	1,31	1.09	0.99	1.02
19	1.01	0.91	1,3	1.11	1.03	1.06
20	1.21	1,15	1,23	1.03	0.96	1.09
21	1.27	1,27	1,25	1.07	1.04	1.03
22	1.14	1,15	0.99	0.92	0.98	0.92
23	1.18	1,21	1,15	0.98	1.01	0.99
24	1.12	0.94	1,1	0.91	1.01	0.92
25	0.95	1,17	1,22	0.99	0.97	0.98
26	1.03	1,32	1,13	1.05	0.92	1.02
27	1.3	1,32	1,28	1.09	0.94	1.01
28	1.06	0.98	1,2	1.02	0.99	0.93
29	1.03	1,1	1,2	0.95	0.92	0.98
30	1.17	1,12	1,2	1.01	1.01	0.92

Résultats obtenus par la technique habituelle et la technique des Lupus Ratio (LR) des patients de la deuxième étape de notre étude.

Interprétation : 1 seul test positif: résultat douteux, Au moins 2 tests positifs: résultat positif, 3 tests négatifs: résultat négatif.

quatre cas (patients 12, 14, 15, 23) ont présenté des recherches douteuses des Lupus anticoagulants en méthode traditionnelle et des recherches négatives en Lupus Ratio deux cas (patients 19 et 26) ont présenté des recherches douteuses par la méthode traditionnelle et des recherches positives en Lupus Ratio.

Aussi, deux de ces patients, ont été traités par les antivitamines K (patients 12 et 15).

Tableau 5

	Conclusions de la méthode traditionnelle	Conclusions de la méthode LR
Patient 11	Négatif	Négatif
Patient 12	Douteux	Négatif
Patient 13	Négatif	Négatif
Patient 14	Douteux	Négatif
Patient 15	Douteux	Négatif
Patient 16	Négatif	Négatif
Patient 17	Positif	Positif
Patient 18	Positif	Positif
Patient 19	Douteux	Positif
Patient 20	Positif	Positif
Patient 21	Positif	Positif
Patient 22	Négatif	Négatif
Patient 23	Douteux	Négatif
Patient 24	Négatif	Négatif
Patient 25	Négatif	Négatif
Patient 26	Douteux	Positif
Patient 27	Positif	Positif
Patient 28	Négatif	Négatif
Patient 29	Négatif	Négatif
Patient 30	Négatif	Négatif

Interprétation des résultats obtenus par la technique habituelle et la technique des Lupus Ratio (LR) des patients de la deuxième étape de notre étude.

## Discussion

Selon l'ISTH (International Society of Thrombosis and Haemostasis) [3] et les recommandations de la dernière réunion du sous comité lupus anticoagulant [4], la recherche des lupus anticoagulants doit se faire en 4 étapes :

- Dépistage du lupus anticoagulant par allongement d'au moins deux tests de coagulation faisant intervenir des phospholipides.

- Mise en évidence d'une activité inhibitrice : absence de correction de l'allongement après mélange du plasma à tester avec du plasma normal.

- Confirmation de la dépendance en phospholipides de l'inhibiteur.

- Exclusion d'une autre coagulopathie.

Trois tests de dépistage sont actuellement utilisés: le Temps de Céphaline Activateur (TCA), le Temps de Thromboplastine Dilué (TTD) et le temps de venin de vipère Russe dilué (dRVVT). Devant l'anomalie d'un ou plusieurs tests de dépistage, la démonstration de la présence d'un inhibiteur fait appel à une épreuve de correction, après mélange du plasma à tester avec un pool de plasmas normaux. L'absence de correction significative des tests de dépistage signe la présence d'un anticoagulant circulant qui reste à caractériser. La preuve de la dépendance en phospholipides se fait en reprenant le(s) test(s) de dépistage initialement allongé(s) en augmentant la concentration en phospholipides des réactifs, afin de neutraliser au moins partiellement l'activité du lupus anticoagulant. Cette démarche diagnostique permet généralement de détecter facilement les lupus anticoagulants puissants. La détection est en revanche relativement médiocre (résultats discordants entre les 3 tests) pour les lupus anticoagulants faibles. De plus, l'interprétation de ces tests est parfois délicate lorsqu'il s'agit de plasmas issus de patients sous traitement anticoagulant oral.

L'utilisation de tests intégrés sous forme de ratio normalisés semble apporter plusieurs avantages dans la démarche diagnostique des lupus anticoagulants. Outre le fait que l'expression des résultats en Lupus Ratio permet de s'affranchir des variations inhérentes au mode de détection du caillot et des autres variations analytiques, l'utilisation

de ces tests intégrés permet aussi de combiner les tests de dépistage de mélange et de confirmation. En effet, le fait d'entreprendre directement les tests sur des mélanges malade/témoin permet de corriger d'emblée un déficit en facteur de la coagulation notamment chez les patients sous anticoagulant oral pour lesquels des résultats faussement positifs peuvent être obtenus avec les tests traditionnels [5,6,7]. Par ailleurs, la technique des Lupus Ratio est facile et rapidement instable, l'utilisation de tests intégrés pour le TCA et le dRVVT se révèle sensible et spécifique et permet une amélioration diagnostique. En revanche, nos résultats pour le lupus Ratio TTD sont peu prometteurs, une mise au point prochaine des réactifs utilisés (dilutions différentes, thromboplastine recombinante, céphalines différentes) permettra sans doute d'améliorer ces premiers résultats.

## Conclusion

La détermination des Lupus Ratio donne des résultats concluants et prometteurs, et permet d'envisager, à court terme, le remplacement de la technique conventionnelle de détection/confirmation des lupus anticoagulants. Son exécution est simple et rapide et nos résultats montrent une sensibilité accrue. De plus, l'utilisation de mélanges permet de palier les insuffisances et échecs de la méthode traditionnelle retrouvés chez les patients atteints de déficits en facteurs de la coagulation.

## Références

1. Darnige L. Diagnostic biologique du syndrome des antiphospholipides. *Rev Méd Int* 2005; 27(4): 769-70.
2. Nishiguchi T, Kobayashi T. Antiphospholipid syndrome: characteristics and obstetrical management. *Curr Drug Targets* 2005;6(5):593- 605.
3. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer, I. 1995. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the subcommittee on lupus anticoagulant/antiphospholipid antibody of the scientific and standardisation committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 74: 1185-1190.
4. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand J H, Ortel TL, Galli M, De Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Journal of thrombosis and haemostasis* 2009; 7 (10 ):1737-1740
5. Jacobsen EM, Barna-Cler L, Taylor JM, Triplett DA, Wisloff F. The Lupus Ratio Test- An interlaboratory Study on the detection of lupus anticoagulants by an APTT-based, integrated, and Semi-quantitative Test
6. Machin SJ, Giddings JC, Greaves M, Hutton RA, Mackie IJ, et al. Guidelines on testing for the lupus anticoagulant. Lupus anticoagulant working party on behalf of the haemostasis and thrombosis task force. *J Clin Pathol* 1991; 44(11):885-9
7. Jennings I, Greaves M, Mackie IJ, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Lupus anticoagulant testing: improvements in performance in a UK NEQAS proficiency testing exercise after dissemination of national guidelines on laboratory methods. *Br J Haematol* 2002; 119(2):364-9.