



Česká hematologická
společnost ČLS JEP

Doporučení Laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

Diagnostika lupus antikoagulans

Zpracoval: J. Zavřelová, I. Hrachovinová, I. Malíková, M. Matýšková, M. Mikešová,
P. Sadílek, P. Šigutová, A. Buliková

Revize: -

Recenzent: Členové laboratorní sekce ČHS ČLS JEP

Schváleno Laboratorní sekcí ČHS ČLS JEP: 23.4.2019

Schváleno výborem ČHS ČLS JEP: 3.6.2019

Schváleno výborem ČSTH ČLS JEP: 17.5.2019

Verze: 1

Platnost od: 1.9.2019

Poznámky:-

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

Obsah:

1.	ÚVOD	3
2.	PREANALYTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZORKU	3
3.	POSTUP VYŠETŘENÍ LA.....	3
3.1	Volba testů	3
3.1.1	Screening LA	4
3.1.2	Korekce LA.....	4
3.1.3	Konfirmace LA	4
3.2	Pořadí testů	5
3.3	Vyšetření směsné normální plazmy	5
3.4	Nastavení vlastních cut-off testů	5
3.5	Vyhodnocení testů LA.....	5
3.6	Vyloučení jiných koagulopatií.....	6
3.7	Diagnostika LA při antitrombotické léčbě.....	6
3.7.1	LA při VKA.....	6
3.7.2	LA při léčbě hepariny.....	6
3.7.3	LA a přímá antikoagulancia.....	7
4.	INTERPRETACE VÝSLEDKŮ VYŠETŘENÍ LA.....	7
5.	KONTROLY KVALITY V DIAGNOSTICE LA.....	7
5.1	Vyšetření kontroly preciznosti v čase.....	7
5.2	Ověření funkčnosti reagenčního systému	8
6.	POUŽITÉ ZKRATKY	8
7.	LITERATURA.....	9

1. Úvod

Lupus antikoagulans (LA) je heterogenní skupina protilátek namířených proti plazmatickým proteinům vázajícím fosfolipidy (PL), které ovlivňují koagulační testy závislé na fosfolipidech in vitro. Průkaz LA je součástí komplexního vyšetření antifosfolipidových protilátek (APA) a diagnostiky antifosfolipidového syndromu (APS). Stanovení LA je komplikované, protože neexistuje test 100% citlivý jen na LA, a k prodloužení testů závislých na fosfolipidech dochází i v případě jiných koagulopatií a léčby. Standardizace vyšetření LA dle mezinárodních doporučení SSC ISTH 2009, BCSSH 2012 a CLSI 2014 zahrnuje dodržení preanalytických podmínek, správnou volbu testů, pořadí testů, vyšetřování směsné normální plazmy, nastavení vlastních cut-off, správné vyhodnocení testů a vyloučení ovlivnění diagnostiky LA jinými koagulopatiemi včetně ovlivnění antitrombotickou léčbou.

2. Preanalytické zpracování vzorku

K vyšetření LA musí být použita bezdestičková plazma (počet trombocytů $< 10 \times 10^9/L$), připravená dvojnásobnou centrifugací bezprostředně po odběru:

- a) První centrifugace minimálně 15 min při 2000g a stažení plazmy.
- b) Druhá centrifugace minimálně 15 min při $\geq 2\ 500g$ a stažení plazmy. Nesmí být použita ultracentrifugace ($> 5\ 000g$) a filtrace přes trombocytární filtry.

Bezdestičková plazma (PFP) může být použita čerstvá nebo rychle zamrazená a skladovaná krátkodobě (max do 2 týdnů) při teplotě $-20\ ^\circ C$, dlouhodobě při teplotě $-70\ ^\circ C$ a níže. Před vyšetřením se PFP rozmrazí při $37\ ^\circ C$.

3. Postup vyšetření LA

Vlastnímu vyšetření LA musí vždy předcházet vyšetření základních koagulačních testů, minimálně PT, APTT (přiměřeně citlivé na LA), TT (vyloučení jiných koagulopatií, antitrombotické léčby) – viz kap. 3.6.

Diagnostika LA zahrnuje několik kroků:

- a) průkaz prodloužení testů závislých na fosfolipidech (screening)
- b) průkaz inhibitoru (korekční testy)
- c) průkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru (konfirmace)
- d) vyloučení jiných koagulopatií a ovlivnění léčbou

3.1 Volba testů

Při diagnostice LA musí být použity minimálně 2 testy závislé na fosfolipidech s různými principy zachycujícími odlišnou část koagulační kaskády.

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

3.1.1 Screening LA

Musí být použity minimálně 2 testy s nízkou koncentrací fosfolipidů (\downarrow PL), při vyšším počtu testů je riziko falešně pozitivních nálezů. Doporučuje se kombinace testů dRVVT a dAPTT a/nebo jiné.

a) dRVVT

Test s jedním Russelovým zmižem, který aktivuje FX v přítomnosti \downarrow PL a Ca^{2+} , je testem s vysokou specifitou, citlivý k anti β 2-glykoproteinu 1 a vysokou korelací s trombózou. Provedení tohoto testu je nezbytné.

b) dAPTT

Aktivovaný parciální tromboplastinový test s \downarrow PL je testem s vysokou senzitivitou k LA.

c) Silica clotting time (SCT)

Test s aktivátorem silica (směs křemičitanů) a \downarrow PL (nejsou tkáňového původu), který je označován jako modifikované APTT.

d) dPT

Test s rekombinantním lidským tromboplastinem s \downarrow PL nebo komerční sety. Reagencie tkáňového původu s variabilní citlivostí a lokálními dilucemi nejsou doporučovány.

e) Hadí jedy (taipan, textarin).

Pozn.: „d“ ve zkratce testu (dRVVT, dAPTT, dPT) znamená, že k testu je použita reagencie s nízkou tedy ředěnou (diluted) koncentrací fosfolipidů.

3.1.2 Korekce LA

Korekční testy se provádí na principu těch testů, které jsou ve screeningu prodloužené ($R > \text{cut-off}$). Vyšetřuje se směs pacientovy plazmy a normální plazmy v poměru 1 : 1 bez inkubace (LA je časově nezávislý inhibitor).

3.1.3 Konfirmace LA

Konfirmační testy se provádí na principu testů, které jsou ve screeningu prodloužené ($R > \text{cut-off}$). K vyšetření se používají testy s nadbytkem fosfolipidů (\uparrow PL, neutralizační testy) nebo fosfolipidů v hexagonální fázi (test HNP). Screeningové a konfirmační reagencie by měly být od stejného výrobce a validované výrobcem pro účely použití k diagnostice LA. Používání screeningových a konfirmačních reagií od různých výrobců a/nebo s různými aktivátory v rámci diagnostiky LA musí mít laboratoř náležitě otestováno a validováno.

3.2 Pořadí testů

V prvním kroku se provádí screeningové testy, v případě pozitivních výsledků alespoň jednoho z testů se v druhém kroku provádí korekce i konfirmace.

3.3 Vyšetření směsné normální plazmy

Směsná normální plazma (SNP) musí být testována v každé sérii vyšetření současně se vzorky pacientů. Používá se k provedení korekčních testů a k výpočtům parametrů při vyhodnocení jednotlivých testů. SNP může být připravená laboratoří stejným způsobem jako vzorky pacientů (směs plazem LA negativních jedinců) nebo komerční validovaná výrobcem pro účely použití k diagnostice LA.

3.4 Nastavení vlastních cut-off testů

Z důvodu variability reagensů a analyzátorů je pro laboratoř nezbytné nastavení horní hranice referenčních intervalů cut-off pro screeningové, korekční i konfirmační testy. Počet normálních vzorků pro nastavení cut-off musí být minimálně 40, optimálně 100 – 120. V případě, že výrobce reagentie udává pro daný přístroj validované cut-off hodnoty, je pro verifikaci doporučováno provedení vyšetření 20 – 60 normálních vzorků. K vyhodnocení cut-off se používá 99. percentil (snížení falešně pozitivních výsledků, zvýšení specifity a snížení senzitivity), příp. 97,5 percentil naměřených hodnot.

3.5 Vyhodnocení testů LA

Z primárně naměřených koagulačních časů pacienta (t_P), směsné normální plazmy (t_N) v rámci screeningu (Screen), konfirmace (Confirm) a korekce ($t_{1:1}$) se vypočítávají výsledky jednotlivých parametrů:

a) Screening

$$\text{Ratio } R = t_P/t_N \quad R > \text{cut-off pozitivní}$$

b) Korekce

$$\text{Ratio } R = t_{1:1}/t_N \quad R > \text{cut-off pozitivní}$$

Index ICA (= index cirkulujícího antikoagulans, Rösnerův index)

$$\text{ICA} = [(t_{1:1} - t_N)/t_P] \times 100, \quad \text{vhodnější parametr zohledňuje i } t_P$$

$$R > \text{cut-off pozitivní}$$

Negativní výsledky korekce nevylučují přítomnost LA z důvodu dilučního efektu.

c) Konfirmace

$$\text{Normalizované Ratio } NR = R_{\text{Screen}}/R_{\text{Confirm}} \quad NR > \text{cut-off pozitivní}$$

Diagnostika lupus antikoagulans

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

Rozdíl časů = $t_{\text{Screen}} - t_{\text{Confirm}}$

> cut-off pozitivní / > 8,0 s pro HNP

3.6 Vyloučení jiných koagulopatií

K vyloučení jiných koagulopatií je doporučováno provedení základních koagulačních testů PT, APTT, fibrinogen, TT, event. test cirkulujícího antikoagulans, D-Dimery (D-Di).

LA může, ale nemusí interferovat při vyšetření koagulačních faktorů. V případě snížení funkční aktivity faktorů vnitřního systému je vhodné opakovat vyšetření s APTT reagentii se sníženou citlivostí k LA a event. vyšetření faktorů v diluci nebo vyšetření faktorů s použitím chromogenních substrátů.

K odlišení specifického inhibitoru od LA se využívá časová závislost inhibitoru, specifita vůči jednomu koagulačnímu faktoru a u inhibitorů faktorů vnitřní cesty toho, že není prodloužené dRVVT, které u LA prodloužené může být.

3.7 Diagnostika LA při antitrombotické léčbě

Pokud je možné vyšetření LA bez antitrombotické léčby, vždy se upřednostňuje, tj. stanovení LA by mělo být provedeno před zahájením nebo s odstupem po přerušení léčby antagonisty vitamínu K (VKA), nefrakcionovaným heparinem (UFH), terapeutickými dávkami nízkomolekulárního heparinu (LMWH) a přímými inhibitory trombinu a faktoru Xa (DOAC).

3.7.1 LA při VKA

Při léčbě VKA je prodloužení testů závislých na fosfolipidech korigováno normální plazmou.

- a) PT-INR < 1,5 LA vyšetření v neředěné plazmě
- b) PT-INR = 1,5 - 3,0 screeningové a konfirmační testy ve směsi 1 : 1 se SNP

Negativní výsledky nevylučují přítomnost LA z důvodu dilučního efektu. Testování v neředěné plazmě může způsobit falešně pozitivní i negativní výsledky.

3.7.2 LA při léčbě hepariny

- a) Při léčbě UFH není doporučováno vyšetřovat LA. Pokud je vyšetřováno, tak jen v rozsahu koncentrace UFH dle doporučení výrobce a při použití reagentii s heparin neutralizačními přísadami (dRVVT, HNP). Interpretace vždy s opatrností.
- b) LMWH má menší vliv na testování LA, zejména v terapeutických dávkách však nelze ovlivnění vyloučit. Reagentie dRVVT s heparin neutralizačními přísadami a LMWH v profylaktických dávkách stanovení LA umožňuje.

Diagnostika lupus antikoagulans

3.7.3 LA a přímá antikoagulancia

Při léčbě DOAC, na rozdíl od VKA a deficitu faktorů, nedochází ke korekci po přidavku SNP.

a) Přímé inhibitory trombinu (dabigatran a argatroban) interferují významně se všemi testy v rámci diagnostiky LA, je riziko falešně pozitivních výsledků.

b) Inhibitory FXa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban) interferují více v dRVVT než v APTT, nelze vyloučit riziko falešně pozitivních výsledků.

DOAC ovlivňují v závislosti na hladině léku zejména screeningové a korekční testy, výsledky confirmace (NR nebo rozdíl časů) jsou negativní, ale mohou být i falešně pozitivní.

Vyšetření LA při léčbě DOAC není všeobecně doporučováno.

Pokud je vyšetření LA nezbytné, musí být prováděno ve specializovaných laboratořích s dlouhodobou zkušeností s diagnostikou a interpretací výsledků LA. Předpokladem je ověření citlivosti používaných testů k DOAC a provádění vyšetření LA z odběru před podáním další dávky, tj. v době minimálního účinku léku (nutno i tak vyloučit kumulaci léku).

Výjimkou může být použití DOAC-Stop tablet v laboratořích po náležitém otestování vhodnosti pro diagnostiku LA.

4. Interpretace výsledků vyšetření LA

Vyšetření LA u pacientů s podezřením na APS nebo nevysvětlitelným prodloužením APTT při rutinním vyšetření by mělo být prováděno mimo akutní stavy, před zahájením, nebo s odstupem od přerušování antitrombotické léčby.

Interpretace výsledků testů LA v rámci diagnostiky APS musí vždy provádět zkušený pracovník v kontextu s výsledky všech laboratorních vyšetření včetně dalších antifosfolipidových protilátek, s léčbou a klinickými projevy.

V případě pozitivity LA by mělo být toto vyšetření v rámci diagnostiky APS opakováno v odstupu více než 12 týdnů.

5. Kontroly kvality v diagnostice LA

5.1 Kontroly preciznosti v čase (mezilehlá preciznost)

Vyšetření směsné normální plazmy prováděné s každou sérií vyšetření LA viz kap. 3.3

5.2 Ověření funkčnosti reagenčního systému

Vyšetření komerčních či laboratoří připravených LA pozitivních a LA negativních kontrolních materiálů musí být prováděné s každou sérií vyšetření.

6. Použité zkratky

APA	antifosfolipidové protilátky
APS	antifosfolipidový syndrom
APTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
BCSH	British Committee for Standards in Haematology
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
dAPTT	ředěný aktivovaný tromboplastinový test
D-Di	D-Dimery
DOAC	přímá antikoagulancia
dPT	ředěný protrombinový test
dRVVT	ředěný test s jedem Russelovy zmije
FXa	aktivovaný faktor X
HNP	neutralizace hexagonální strukturou fosfolipidů
ICA	index cirkulujícího antikoagulans
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
LA	lupus antikoagulans
LMWH	nízkomolekulární hepariny
PFP	bezdestičková plazma
PL	fosfolipidy
PT	protrombinový test
R	poměr (ratio)
SCT	silica clotting test
SNP	směsná normální plazma
SSC ISTH	Scientific and Standardization Committee International Society on Thrombosis and Haemostasis

Diagnostika lupus antikoagulans

Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP

t _N	koagulační čas směsné normální plazmy
t _p	koagulační čas pacienta
UFH	nefrakcionovaný heparin
VKA	antagonisté vitamínu K

7. Literatura

1. Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018;16(4):809-813. doi: 10.1111/jth.13976.
2. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M: British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2012; 157(1):47-58. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09037.x.
3. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, Groot PG. Update of the Guidelines for Lupus Anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; 7:1731-1740. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x.
4. Ledford-Kraemer M, Moore GW, et al. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant, CLSI 2014; 34 (6):116.
5. Moore GW. Recent Guidelines and Recommendation for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40(02):163-171. doi: 10.1055/s-0033-1364184.