Co se skrývá za laboratorním vyšetřením Lupus antikoagulans?

PAVLA BRADÁČOVÁ

ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE

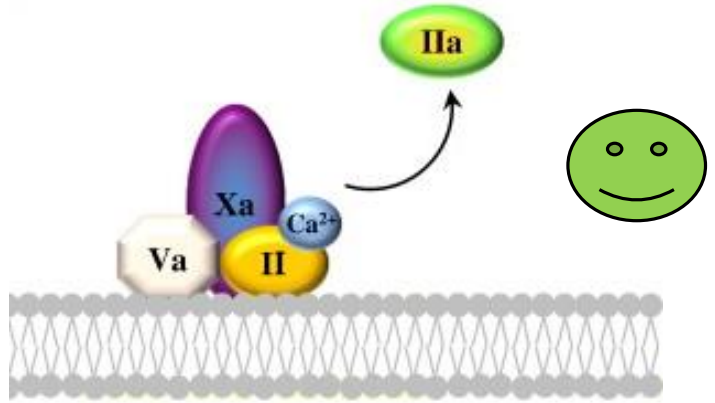
MASARYKOVA NEMOCNICE V ÚSTÍ NAD LABEM

HEMATOLOGICKÝ SEMINÁŘ SIEMENS

OLOMOUC 10.9.2019

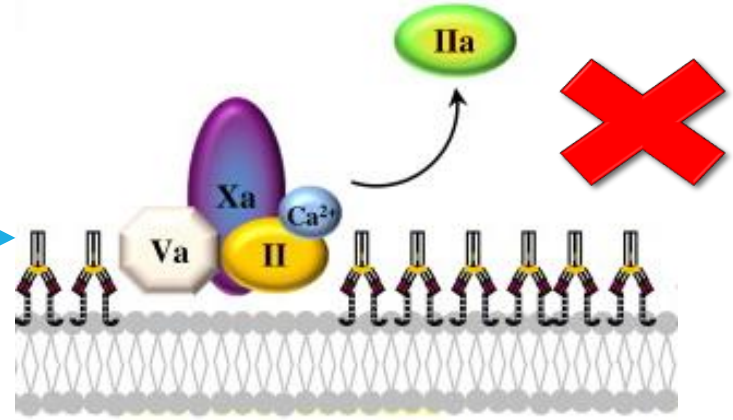
Lupus antikoagulans LA

- **Heterogenní skupina nespecifických protilátek:**
  - Indukce protrombotického a prozánětlivého stavu
  - Manifestace – trombózy, aborty, migrény atd.
  - Namířeny proti negativně nabitým **fosfolipidům na membráně trombocytů**



- **Laboratorně prodlužují test APTT** tím, že **blokují vazebná místa pro koagulační děje =** pro vazbu plazmatických faktorů





Metodika stanovení dle ISTH 2009

I. **Screeningové testy**

II. **Konfirmační testy**

III. **Korekční směsné testy**

Od 1.9.2019 nové doporučení ČHS JEP pro diagnostiku LA

I. Screeningové testy

- 2 testy na různém principu (APTT a jed Russelovy zmije)
- Screeningové reagencie obsahují **malé množství fosfolipidů** = pokud jsou **přítomny LA protilátky, zablokují vazebná místa** pro koagulační děje = **<u>koagulační čas je prodloužený</u>**

- **Hodnocení:**
  - Cut-Off R < 1,2

$$R = \frac{čas\ pacienta}{čas\ normální\ plazmy}$$

II. Konfirmační testy

- 2 testy na různém principu (APTT a jed Russelovy zmije)
- Konfirmační reagencie obsahují **nadbytek fosfolipidů** = **vyváží přítomné LA protilátky** = zbylé fosfolipidy poskytnou **volná vazebná místa** pro koagulační děje = **<u>koagulační čas se zkrátí</u>**

- **Hodnocení:**
  - Cut-Off R < 1,2

$$R = \frac{\check{c}as\ pacienta}{\check{c}as\ norm\acute{a}ln\acute{i}\ plazmy}$$

Normalizované Ratio NR

- Normalizovaný poměr mezi poměry screeningu a konfirmace:

$$NR = \frac{Screen\ ratio}{Confirm\ ratio}$$

- **Hodnocení:**
- Cut-Off NR < 1,2

III. Korekční směsné testy

- Provedou se v případě pozitivity screeningového nebo konfirmačního testu
- Smíchá se **plazma pacienta + normální plazma** v poměru 1:1 a znovu se změří test, který byl pozitivní
- Měří se hned bez inkubace
- **Hodnocení:**
  - **Poměr R**
  - Cut-Off < 1,3

$$R = \frac{\check{c}as\ 1{:}1}{\check{c}as\ norm\acute{a}ln\acute{i}\ plazmy}$$

  - **Rösnerův index RI, ICA**
  - Cut-Off < 12

$$RI = \frac{\check{c}as\ 1{:}1 - \check{c}as\ norm\acute{a}ln\acute{i}\ plazmy}{\check{c}as\ pacienta} * 100$$

Příprava vzorku

- Odběr 2x 4,5 ml krve do citrátu sodného 3,2% 0,109 mol/l
- **Změřit APTT, PT, TC** (případně anti-Xa LMWH) = vyloučení antikoag.léčby

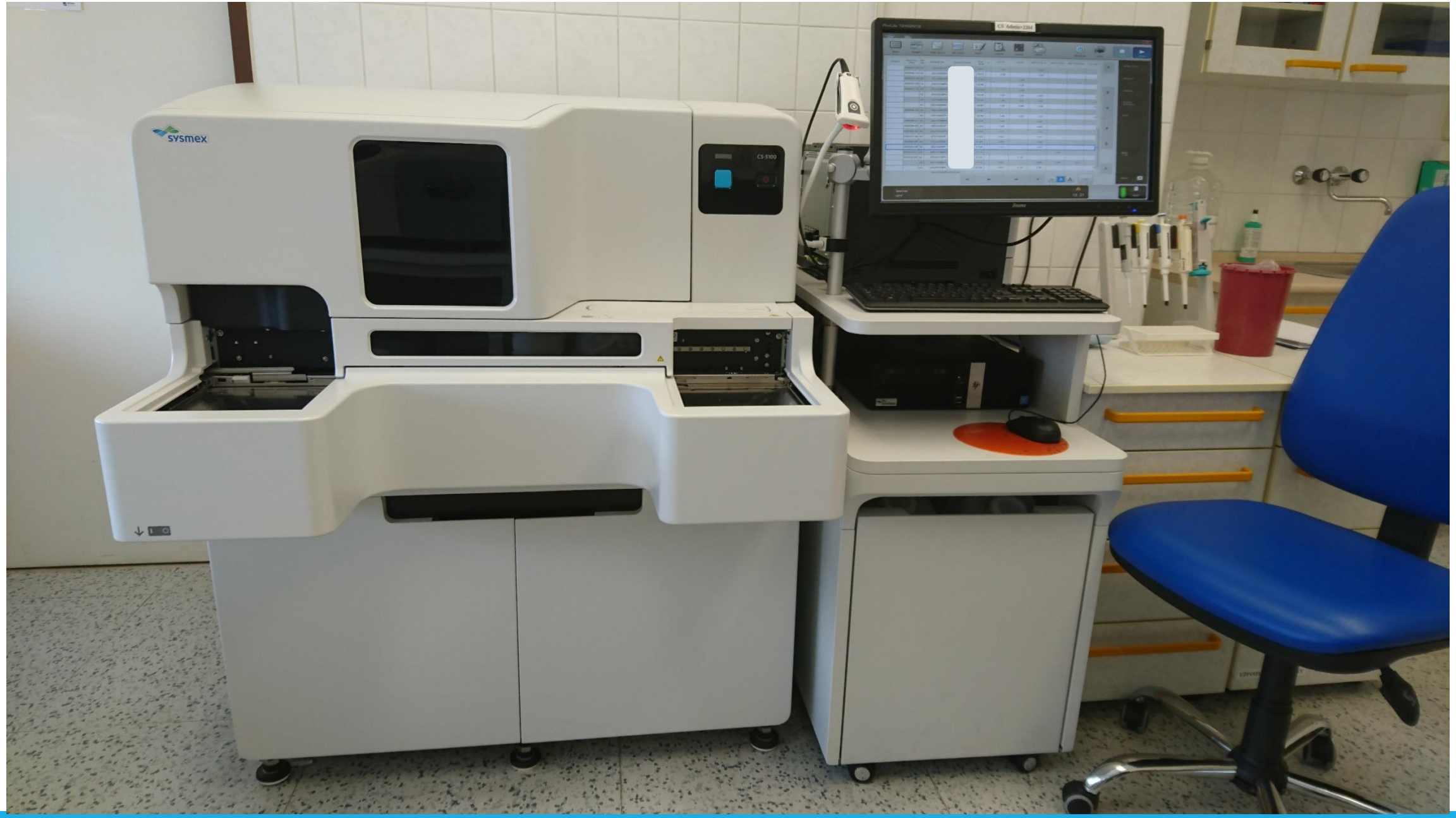
- Dvojitá centrifugace 10-15 min./ 2000 – 2500 g = **PFP plasma free platelet**
- Zamrazit co nejdříve po odběru na -80°C

- **Nepoužívat filtry** = ztráta vWF a dalších koag.faktorů
  = falešně pozitivní screening LA
- **Ne ultracentrifugace** = uvolnění fosfolipidů z rozbitých destiček



Interference měření LA

1. **Nedodržení správné preanalytické fáze**
   - Špatný poměr krve a citrátu, doba transportu, centrifugace, mražení plazmy, sraženiny, hemolýza, lipemie, iktericita atd…
2. **Odběr krve v akutním onemocnění** = vysoké riziko falešné pozitivity
3. **Vliv antikoagulačních léků**
   - Heparin UFH, Rivaroxaban, Apixaban, Edoxaban, Dabigatran a jiné
   - Warfarin INR > 1,5
     - pro získání spolehlivějších výsledků LA se doporučuje dle ISTH 2009 snížení dávky na INR 1,5 v kombinaci s LMWH
     - nebo provést vyšetření LA ve směsi 1:1 s normální plazmou


sysmex
CS-5100

Provedení testu

1. Vložit reagencie do reagenčního kruhu:
   - **Screening: APTT- Actin FSL, DRVVTS LA1** (↓ fosfolipidy)
   - **Konfirmace: APTT- Actin FS, DRVVTK LA2** (↑↑ fosfolipidy)
   - CaCl2, Clean I, Clean II, Control N, Citrol 2, LA High, LA Low a normální plazmu





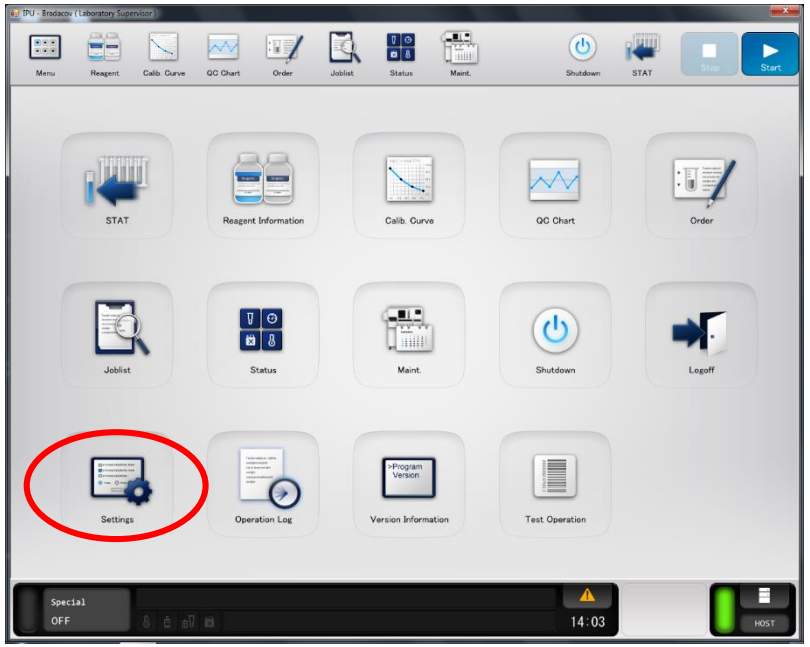


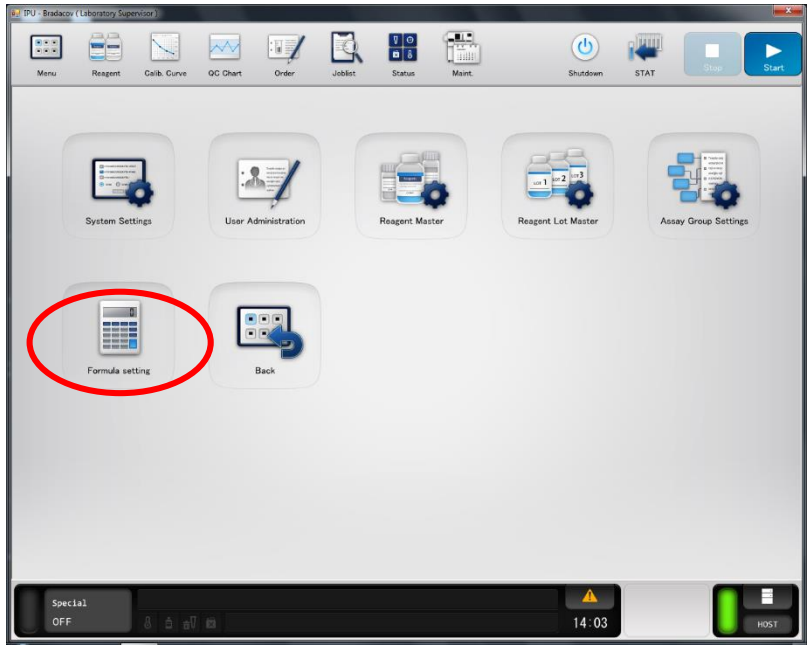
Provedení testu

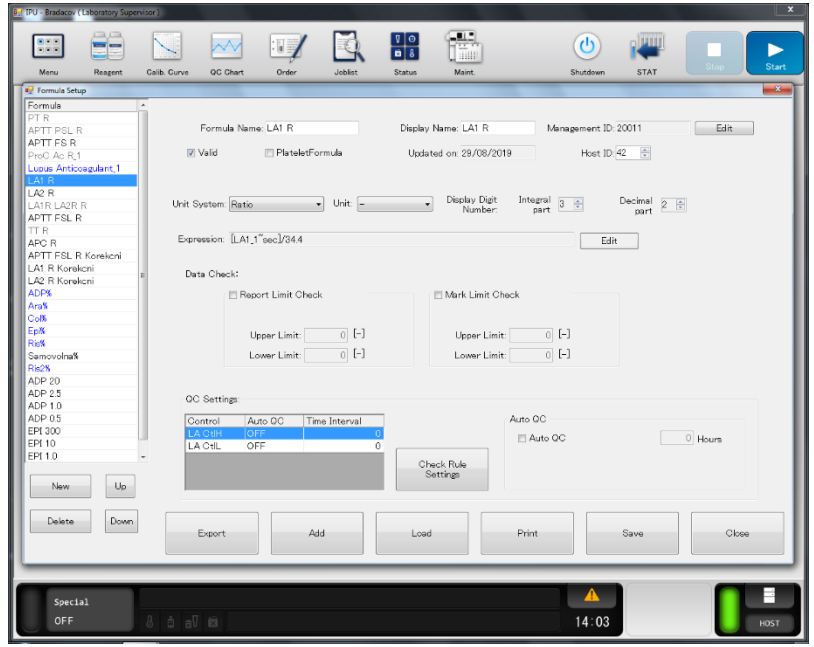
2. Vložit další **normální směsnou plazmu 1,5 ml** do zásobníku diluentů
3. **Změřit QC:** FSL, FS, LA1, LA2
4. **Změřit časy normální plazmy**: FSL, FS, LA1, LA2 a pro korekční testy FSL, LA1, LA2
5. Hodnoty normální plazmy vložit do **Formula setting** v analyzátoru = důležité pro výpočty poměrů a korekce



Formula setting



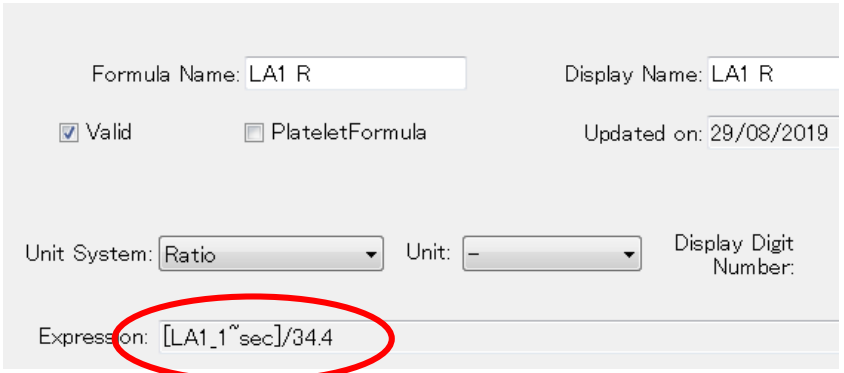


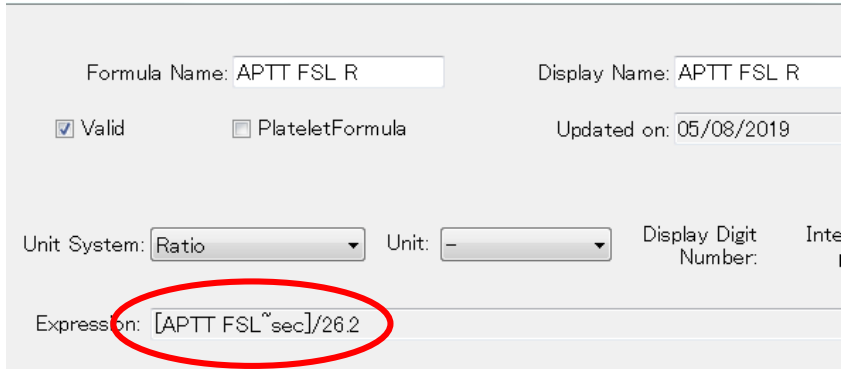


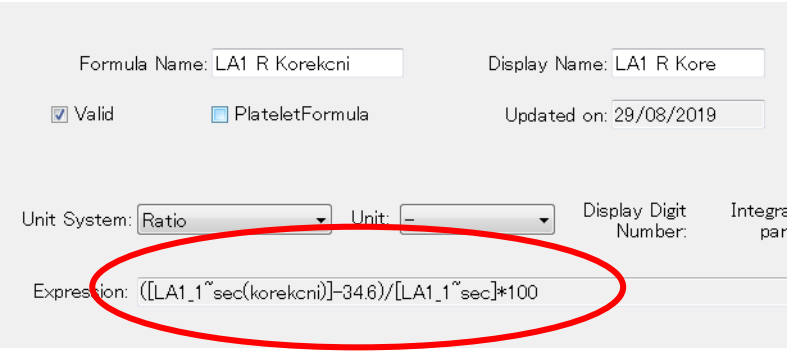
$$RI = \frac{\check{c}as\ 1{:}1 - \check{c}as\ normální\ plazmy}{\check{c}as\ pacienta} * 100$$

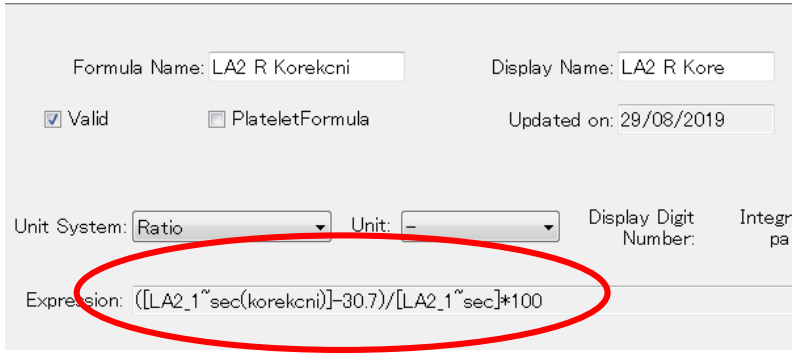
Formula setting

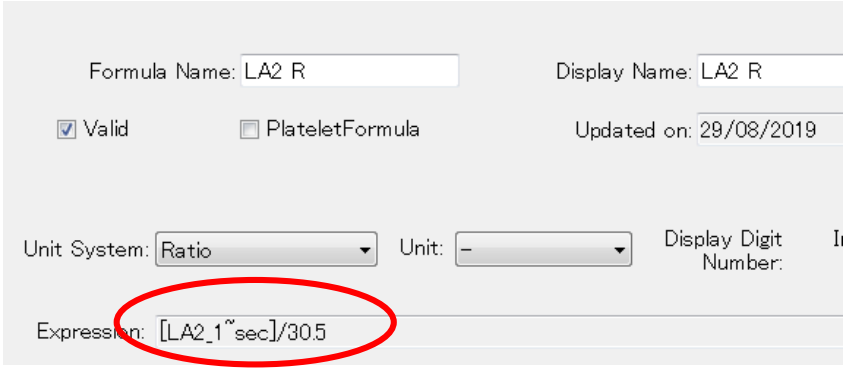
$$R = \frac{\check{c}as\ pacienta}{\check{c}as\ normální\ plazmy}$$

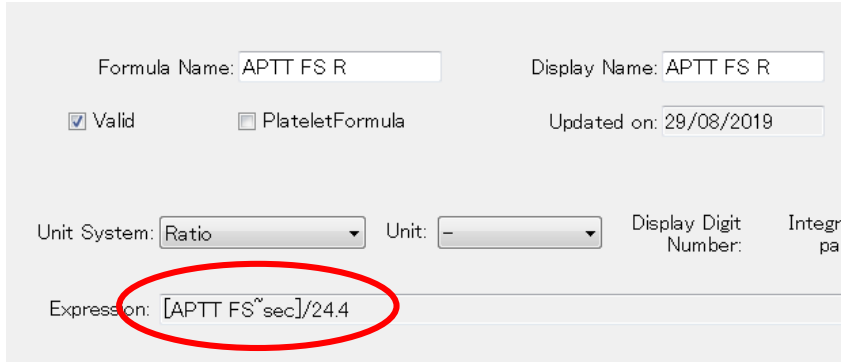


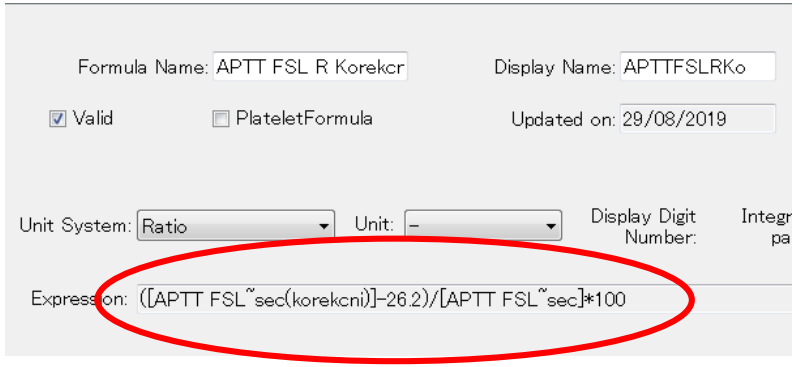






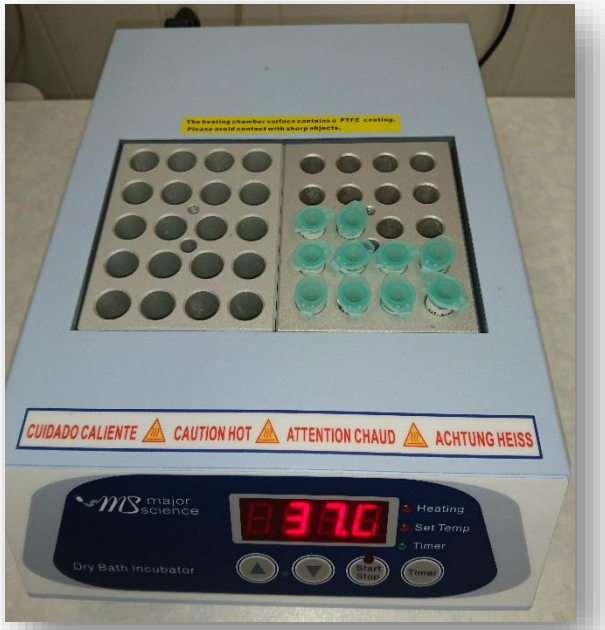






Příprava vzorků

- Plazmu rozmrazit v suché lázni 10 min. / 37°C
- Eppendorfky s barkódy vložit do racku





Screeningové testy



- Vložit do Sysmex CS rack s eppendorfkami
- **Sysmex změří časy screeningu FSL a LA1**

- Sysmex vypočítá Ratio u obou testů a výsledek pošle do LIS
  - R < 1,2 dále se nepokračuje
  - R > 1,2 LIS na základě výpočtového skriptu „doobjedná“ konfirmaci a korekci

Rack No. -Pos.	Mode	Sample No	Patient Name	End Time	LA1 R -	LA2 R -	APTT FSL R -	APTT FS R -	APTTFSLRKo -	LA1 R Kore -
000003-09	M	11UY0083P*		09:50	1.81		1.15			

Konfirmační a korekční testy

- Podruhé vložit do Sysmex CS rack s eppendorfkami
- **Sysmex provede měření nově doobjednaných metod v LIS:**
  - FS konfirmace, LA2 konfirmace
  - FSL korekce, LA1 korekce:
    - Sysmex smíchá **plazmu pacienta + normální plazmu** v poměru 1:1
    - Změří čas (bez inkubace)

Rack No. -Pos.	Mode	Sample No	Patient Name	End Time	LA1 R -	LA2 R -	APTT FSL R -	APTT FS R -	APTTFSLRKo -	LA1 R Kore -	LA1_1˜sec korekcni sec
000003-09	M	11UY0083P*		09:50	1.81		1.15				
000007-09	M	11UY0083P*		10:05		1.17					50.9

Konfirmační a korekční testy

- **Hodnocení konfirmace:**
  - Sysmex vypočítá Ratio a výsledky přenese do LIS
  - R < 1,2 dále se nepokračuje
  - R > 1,2 LIS „doobjedná“ test LA2 korekce
  - LIS vypočítá NR

Zdrojový kód

```
Public Function FSKonfirmace() As Boolean

      Dim m2233 As Method = Met.GetMet("2361", MetFilter.IsNumRes)
      If IsNothing(m2233) Then Return True

      If m2233.NumRes > 1.20 Then
            Met.Add("2370")
            If Not Met.Exist("2362") Then Met.SetRes("2362", "dodáme")
            If not Met.Exist("2363") Then Met.SetRes("2363", "dodáme")
            If not Met.Exist("2364") Then Met.SetRes("2364", "dodáme")

      End If

      Return True
End Function
```

Zdrojový kód

```
Public Function LA1LA2() As Boolean

      Dim m2235 As Method = Met.GetMet("2365", MetFilter.IsNumRes)
      If IsNothing(m2235) Then Return True

      Dim m2236 As Method = Met.GetMet("2366", MetFilter.IsNumRes)
      If IsNothing(m2236) Then Return True

      Dim vysledek As Double = m2235.NumRes / m2236.NumRes

      If vysledek < 0 Then vysledek = 0

      Met.SetRes("2367", vysledek, True)
      Dim m2137 As Method = Met.GetMet("2367", MetFilter.IsNumRes)
      m2137.SaveNoDelete = True

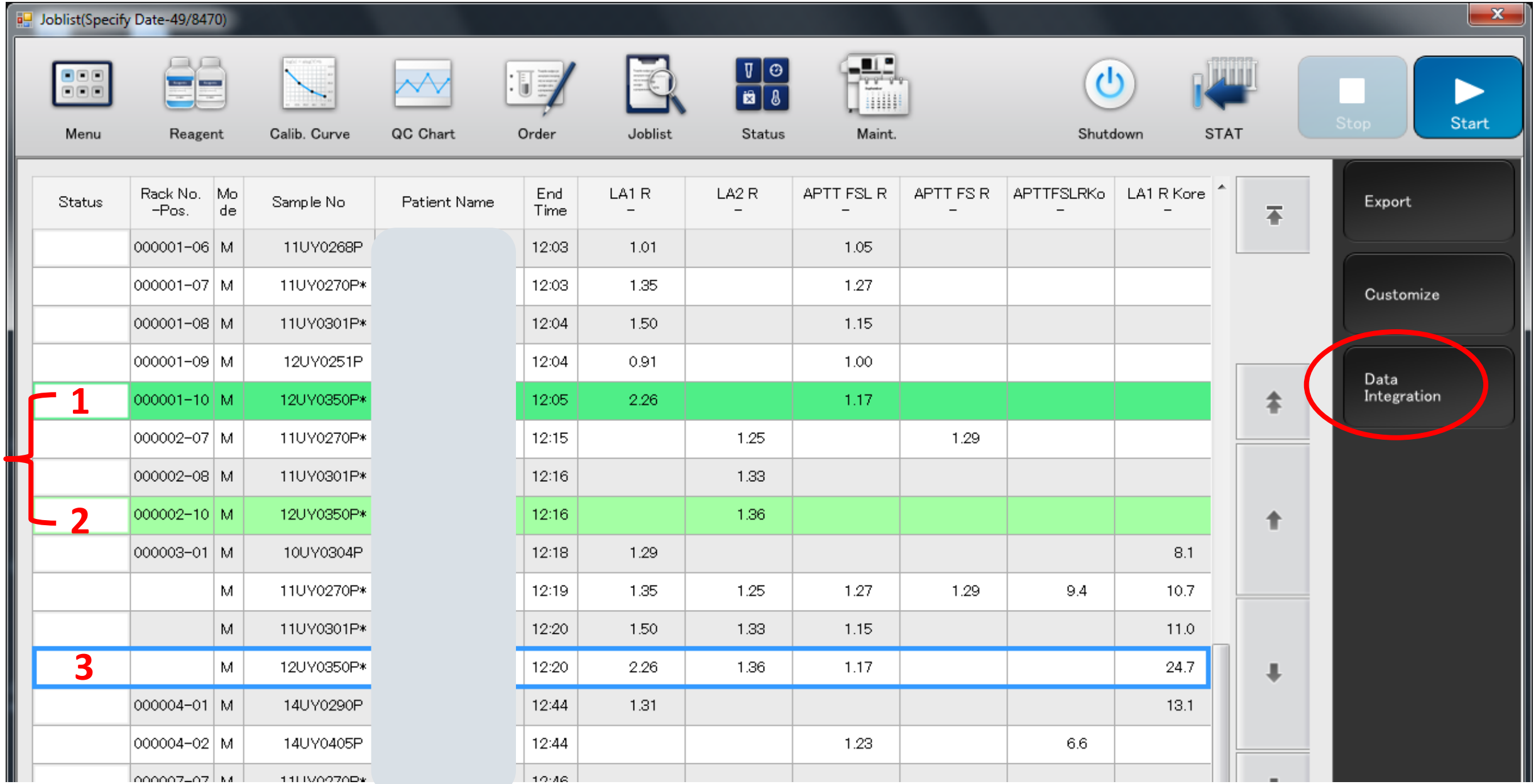
      Return True
End Function
```

$$NR = \frac{Screen\ ratio}{Confirm\ ratio}$$

Konfirmační a korekční testy

- **Rösnerův index u korekčních testů**
  - **Integration data** – Sysmex spojí první a druhé měření do třetího řádku, kde provede výpočet Rösnerova indexu
  - Výsledky přenese do LIS

Rack No. -Pos.	Mode	Sample No	Patient Name	End Time	LA1 R -	LA2 R -	APTT FSL R -	APTT FS R -	APTTFSLRKo -	LA1 R Kore -	LA1_1˜sec korekcni sec
000003-09	M	11UY0083P*		09:50	1.81		1.15				
000007-09	M	11UY0083P*		10:05		1.17					50.9
	M	11UY0083P*		10:25	1.81	1.17	1.15			23.8	50.9



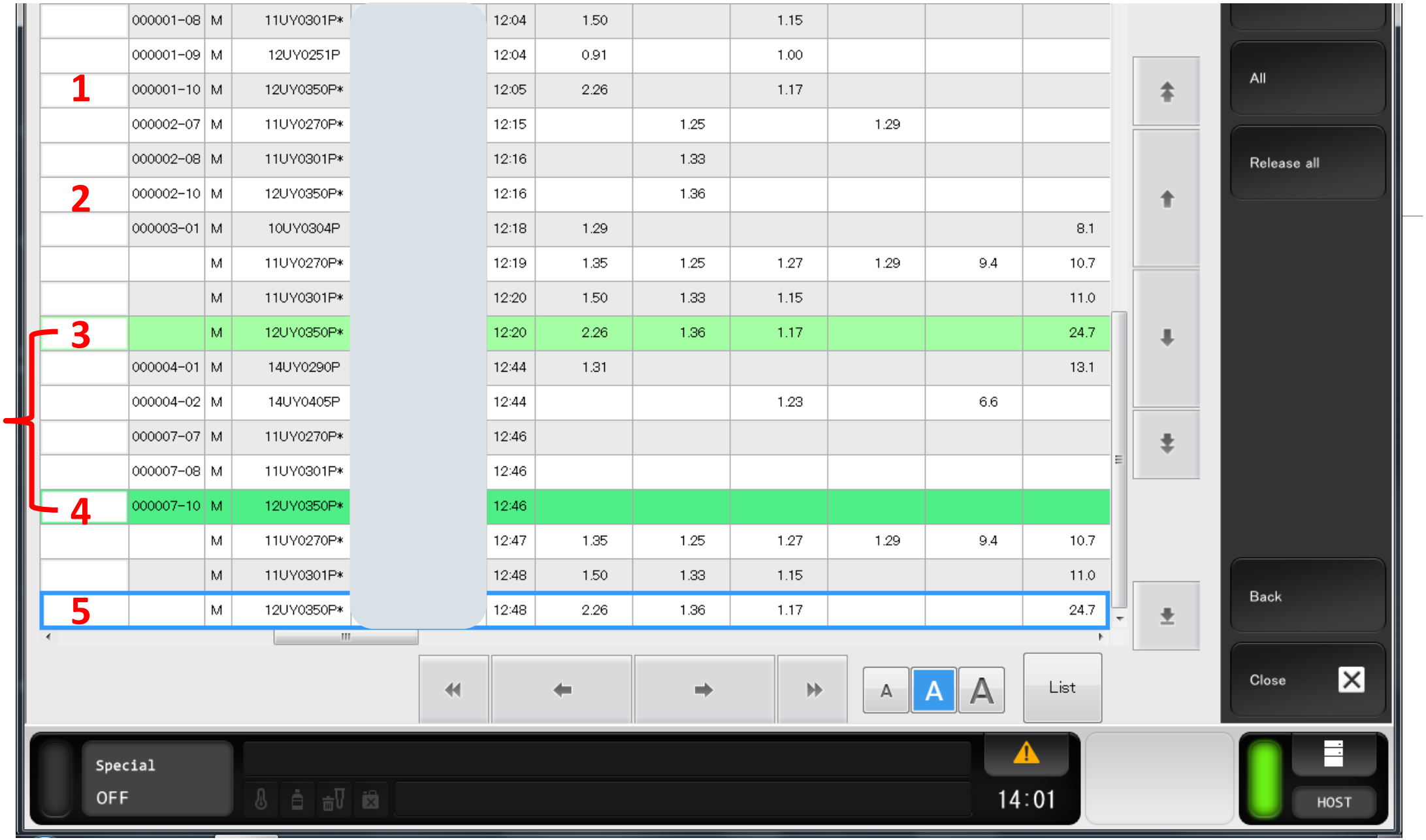
Status	Rack No. -Pos.	Mode	Sample No	Patient Name	End Time	LA1 R -	LA2 R -	APTT FSL R -	APTT FS R -	APTTFSLRKo -	LA1 R Kore -
	000001-06	M	11UY0268P		12:03	1.01		1.05			
	000001-07	M	11UY0270P*		12:03	1.35		1.27			
	000001-08	M	11UY0301P*		12:04	1.50		1.15			
	000001-09	M	12UY0251P		12:04	0.91		1.00			
1	000001-10	M	12UY0350P*		12:05	2.26		1.17			
	000002-07	M	11UY0270P*		12:15		1.25		1.29		
	000002-08	M	11UY0301P*		12:16		1.33				
2	000002-10	M	12UY0350P*		12:16		1.36				
	000003-01	M	10UY0304P		12:18	1.29					8.1
		M	11UY0270P*		12:19	1.35	1.25	1.27	1.29	9.4	10.7
		M	11UY0301P*		12:20	1.50	1.33	1.15			11.0
3		M	12UY0350P*		12:20	2.26	1.36	1.17			24.7
	000004-01	M	14UY0290P		12:44	1.31					13.1
	000004-02	M	14UY0405P		12:44			1.23		6.6	

Korekce LA2

- Potřetí vložit do Sysmex CS rack s eppendorfkami

- **Sysmex provede měření** nově doobjednané metody **LA2 korekce**

- **Rösnerův index u LA2 korekce**
  - Integration data – Sysmex CS spojí předchozí integrovaná data a poslední měření do nového řádku, kde provede výpočet Rösnerova indexu u LA2 korekce
  - Výsledky přenese do LIS


1
2
3
4
5
All
Release all
Back
Close
List
A
A
A
Special
OFF
14:01
HOST

Vypadá to složitě?

Úkoly obsluhy Sysmex CS:

1. Připravit všechny reagencie
2. Změřit kontroly QC
3. Změřit směsnou plazmu a časy zapsat do Formula setting
4. Rozmrazit vzorky pacientů, vložit do racku, označit barkódy
5. Postupně vložit 3x rack se vzorky, Sysmex „sám ví“ co má u koho změřit
6. Provést Data Integration

Hodnocení LA

Screen R	Confirm R	Norm R	Korekční testy RI		Interpretace
FSL LA1	FS LA2	FSL/ FS LA1/ LA2	Korekce FSL Korekce LA1	Korekce LA2	
< 1,2	-	-	-	-	LA negativní
> 1,2	< 1,2	> 1,2	> 15	-	LA pozitivní
> 1,2	> 1,2	< 1,2	< 12	-	LA negativní, deficit faktorů nebo Warfarin
> 1,2	> 1,2	< 1,2	> 15	< 12	LA pozitivní + deficit faktorů nebo Warfarin
> 1,2	> 1,2	< 1,2	> 15	> 15	Jiný inhibitor, DOAC

Hodnocení LA

Norm R	Hodnocení
< 1,20	LA negativní
1,21 - 1,24	LA suspektní
> 1,25	LA pozitivní

Rösnerův index	Hodnocení
< 12	LA negativní
12 - 15	LA suspektní
> 15	LA pozitivní

- **U slabě pozitivních LA může být korekce negativní z důvodu dilučního efektu**
- Všechna vyšetření zopakovat s odstupem 12 týdnů

Název metody	11.7.2019 7:00	Hodnocení	Ref. meze	Jednotky
Koagulace				
& APTT	32,2			s
& APTT - R	1,01	| * |	0,80 - 1,20	1
& Protrombinový čas (Quick)	14,10			s
& Protrombinový čas - R	1,26	| *	0,80 - 1,20	1
& Protrombinový čas - INR	1,27			1
Trombinový čas	19,3	| * |	14,0 - 23,0	s
Antifosfolipidové protilátky				
Anti-Cardiolipin IgG	178,7	| *	0,0 - 20,0	U/ml
Anti-Cardiolipin IgM	19,8	| * |	0,0 - 20,0	U/ml
Anti-ß2 Glykoprotein-I IgG	916,1	| *	0,0 - 20,0	U/ml
Anti-ß2 Glykoprotein-I IgM	9,8	| * |	0,0 - 20,0	U/ml
Anti-ß2 Glykoprotein-I Doména	207,9	| *	0,0 - 20,0	CU
Lupus antikoagulans				
APTT-LA Screen	1,15	| * |	0,00 - 1,20	-
DRVVT Screen	1,81	| *	0,00 - 1,20	-
DRVVT Confirm	1,17	| * |	0,00 - 1,20	-
DRVVT Screen/Confirm	1,55	| *	0,00 - 1,20	-
DRVVT Korekce	23,8	| *	0,0 - 12,0	-
Závěr Lupus antikoagulans	POZITIVNÍ			
Léčba				
Léčba	Fraxiparin			-

Shrnutí

- Problematika laboratorního vyšetření Lupus antikoagulans je poměrně složitá
- Diagnostika zahrnuje **komplex několika testů** na různých principech
- Při správném nastavení Sysmex CS a LIS je možná **určitá automatizace**

- Reference: *Gary W. Moore: Recent Guidelines and Recommendations for Laboratory Detection of Lupus Anticoagulants, London, England, Semin Thromb Hemost 2014;40:163–171*
- *Antifosfolipidový syndrom – klinické projevy, diagnostika a možnosti léčby, komplikace, MUDr. Alena Buliková, Ph.D., Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Brno*

Děkuji za pozornost