

המלצות הפורום הארצי למעבדות קרישה, האיגוד הישראלי להמטולוגיה ולרפואת עירוניים

אבחון מעבדתי של לופוס אנטיקואולנט נובמבר 2018

הקדמה:

המלצות הפורום לאבחון מעבדתי של לופוס אנטיקואולנט נובמבר 2018 באות לעדכן את ההמלצות הקודמות שפורסמו ע"י תת הועדה ב-2010. העדכון מתבסס על ההמלצות ה-CLSI Laboratory testing for Lupus anticoagulant Approved Guideline H60-A

ועל דיונים מרובים שנערכו בפורום.

כל מעבדה וכל מרכז מתבקשים, בכל מקרה, לקרוא את המלצות ה-CLSI H60-A. עיקר העדכונים:

- ערכי ייחוס לתבחיני לופוס אנטיקואולנט יחושבו כממוצע ± 2 סטיות תקן בתוצאות לאחר נירמול.
- אין לבצע את בדיקת לופוס אנטיקואולנט למטופלים בהפרין, NOACs.
- לא מומלץ לבצע את בדיקת לופוס אנטיקואולנט למטופלים בקומדין.
- ניתן להשתמש ב- KCT או dPT אשר נאסרו בעבר לשימוש.
- יש לדווח את תוצאות הבדיקות כ- Normalized Ratio ולא בשניות.
- אין פסול בלהצהיר על תוצאות ככאלה שאינן חד משמעיות.

1. רקע:

נוגדנים כנגד פוספוליפידים הם נוגדנים עצמוניים המזהים פוספוליפידים טעונים שלילית או חלבונים הנקשרים לפוספוליפידים כגון פרוטרומבין 1 - $\beta 2$ Glycoprotein I. הנוגדנים הנקשרים ישירות לפוספוליפידים נוצרים לרוב על רקע זיהום והם ברי- חלוף. נוגדנים הנקשרים לחלבונים הקשורים לפוספוליפידים הם לרוב נוגדנים שנוצרו על רקע מחלה אוטואימונית כדוגמת Systemic lupus erythematosus (SLE) או Antiphospholipid syndrome (APS) וקשורים עם אירועים טרומבוטיים עורקיים או ורידיים.

התבחינים בהמלצות אלו מבוססים על Liquid –Phase (plasma, Clot based) assays for LA, בבדיקה של שלושת מסלולי הקרישה: Intrinsic Pathway - המסלול האינטרנסי, Extrinsic Pathway - המסלול האקסטרינסי, Common Pathway - מסלול המשותף.

התבחינים מבוססים על השונות בין ריכוז הפוספוליפידים של הריאגנטים המשמשים לבדיקות הסקירה לאילו המשמשים לבדיקות האשור.

בדיקות ה LA חיוביות נחשבות לבדיקות בעלות קורלציה גבוהה יותר לאירועים טרומבוטיים מבדיקות ה Solid Phase לבדיקה של α CL and $\alpha\beta$ 2GPI (apolipoprotein H)

2. הגדרות:

- **Lupus anticoagulant (LAC)** – נוגדנים כנגד פוספוליפידים הגורמים להארכה של תבחיני קרישה התלויים בפוספוליפידים.
- נוגדנים כנגד קרדיוליפין (אנטיקרדיוליפין) – נוגדנים כנגד פוספוליפידים טעונים שלילית כדוגמת קרדיוליפין, הנבדקים בתבחינים אימונולוגיים.
- נוגדנים כנגד β 2 Glycoprotein I – נוגדנים הנקשרים לחלבון β 2 Glycoprotein I הנקשר לממברנות פוספוליפידיות הטעונות שלילית. נבדקים בתבחינים אימונולוגיים.
- **Antiphospholipid syndrome (APS)** – תסמונת קלינית הוגדרת כשילוב של אירוע טרומבוטי ורידי או עורקי או סיבוכי הריון, בעיקר הפלות חוזרות ועל אבחון מעבדתי. האבחון המעבדתי מתבסס על נוכחות לופוס אנטיקואגולנט, אנטיקרדיוליפין או β 2 Glycoprotein anti I חיוביים בשתי לקיחות דם בהפרש של 12 שבועות זו מזו לפחות.
- **Screen– Reagent sensitive to LAC** – ריאגנט המכיל מעט פוספוליפידים ולכן הוא רגיש לנוכחות ללופוס אנטיקואגולנט: מיעוט הפוספוליפידים מאפשר הדגמת הפעילות האנטיקואגולנטית של LAC.
- **Confirm – Reagent not sensitive** – ריאגנט עשיר בפוספוליפידים, שאינו רגיש ללופוס אנטיקואגולנט: עודף הפוספוליפידים מנטרל את האפקט של ה LAC.
- **Mixing** – ביצוע תבחין בתערובת ביחס של 1:1 של פלסמת הנבדק עם פלסמה תקינה (Normal Plasma).
- תוצאה חיובית אחת בברור לופוס אנטיקואגולנט נחשבת כאשר תבחין הקרישה מוארך עם ריאגנט עני בפוספוליפידים (sensitive) ומאושר ע"י תבחין מקוצר עם ריאגנט עשיר בפוספוליפידים (not sensitive), כלומר יש תיקון של זמני הקרישה .
- **Normalized Ratio** – הישוב היחס בין תוצאת השניות שהתקבלה עבור הנבדק לבין תוצאת שניות של **Mean RI**.
- קיצורי שמות לתבחינים נפוצים לברור לופוס אנטיקואגולנט:

Partial Thromboplastin Time (PTT)

Russell's Viper Venom Time (RVVT)

Silica Clotting Time (SCT)

dilute Prothrombin Time (dPT)

Kaolin Clotting Time (KCT)

3. המלצות לאבחון מעבדתי של לופוס אנטיקואגולנט

- 3.1 אבחון לופוס אנטיקואגולנט מתבסס על ביצוע שתי בדיקות שונות במהותן עם ריאגנט שמכיל מעט פוספוליפידים ותיקון התוצאה כאשר היא מוארכת עם ריאגנט שמכיל עודף פוספוליפידים. מבחני הקרישה הנפוצים בישראל הם PTT, RVVT, SCT. ניתן להשתמש גם בתבחינים KCT או dPT.
- 3.2 במידה שתבחין קרישה אחד מהשניים חיובי באופן ברור, מדובר ב LAC חיובי.
- 3.3 ניתן לשלול נוכחות לופוס אנטיקואגולנט בדגימה, בהתבסס על שני תבחינים שליליים שהתבצעו בריכוז נמוך של פוספוליפידים.
- 3.4 Mixing- ערבוב פלסמה של החולה עם פלסמה תקינה. מטרת הערבוב לשלול חסר פקטור בפלסמה הנבדקת. יבוצע כאשר התבחין עם הריאגנט הלא רגיש לנוכחות נוגדנים כנגד פוספוליפידים מוארך מעבר לערכי הנורמה, על מנת לברר אם מדובר בחוסר פקטור או בנוגדן חזק במיוחד. אם חל תיקון (תוצאת התבחין חזרה לטווח של הנורמה) - פרושו מצב של חסר פקטור או פקטורים. אם אין תיקון בתערובת עם פלסמה מדובר ב- LAC, או במקרים נדירים בנוגד לפקטור קרישה ואז הקליניקה היא של דם.
- 3.5 התנאים לטיפול בדגימת הדם (תנאים פראנליטיים) באבחון לופוס אנטיקואגולנט הם קריטיים לתוצאות הבדיקות, לכן יש להקפיד על תנאי הלקיחה והשינוע למעבדה. על דגימת הדם לעבור סירכוז כפול תוך שעתיים מהלקיחה ב 1500g למשך 15 דקות. יש לבדוק מדגמית שלאחר הסרכוז הכפול לא נשארו יותר מ $10,000/\mu\text{l}$ טסיות. (פרטים נוספים בנוהל של הפורום: "טיפול פרה אנליטי לדגימות לבדיקות תפקודי קרישה", נובמבר 2018).
- 3.6 בצוע בדיקת לופוס אנטיקואגולנט במטופלים בנוגדי קרישה:
- 3.6.1 אם ניתן, יש לבצע בדיקת לופוס אנטיקואגולנט ללא טיפול בנוגדי קרישה.
- 3.6.2 במטופלים בהפרין: לא ניתן לבצע את בדיקת לופוס אנטיקואגולנט.
- 3.6.3 במטופלים ב NOACS: לא ניתן לבצע את בדיקת לופוס אנטיקואגולנט.
- 3.6.4 במטופלים בקומדין: לא מומלץ לבצע את בדיקת לופוס אנטיקואגולנט.
- א. עד ערך INR של 1.5 ניתן לבצע את הבדיקה בדרך הרגילה.
- ב. באם ה $1.5 < \text{INR} < 3.0$, לא מומלץ אך ניתן לבצע את הבדיקות במיהול של פלסמת החולה עם פלסמה תקינה ביחס של 1:1. יש לקחת בחשבון שפעולת המיהול עשויה למסך נוכחות נוגדן ברמה נמוכה. יש לתת הערת הסתייגות בדף התשובה כי הבדיקה מושפעת מקומדין.
- ג. במטופלים שתוצאת ה INR הינה מעל 3 לא ניתן לבצע בדיקת לופוס אנטיקואגולנט.
- 3.6.5 במטופלים ב LMWH כגון קלקסן: ניתן לבצע ברור לופוס אנטיקואגולנט. יש לדגום את דגימת הדם לפני מועד מתן הזריקה.
- 3.7 אבחון לופוס אנטיקואגולנט מבוסס על לפחות שתי תוצאות חיוביות מדגימות שונות בהפרש זמן של יותר מ 12 שבועות. לכן אם בבדיקה ראשונית שהתוצאה היא חיובית, חלשה או גבולית מומלץ להמליץ על בדיקה חוזרת לאחר יותר מ 12-שבועות.

3.8 בדיקה להבחנה בין לופוס אנטיקואגולנט לאינהיביטור ספציפי לגורם קרישה:

נוכחות נוגדנים כנגד פוספוליפידים עלולה להשפיע על תוצאות בדיקת רמת פקטורי הקרישה, במיוחד של המסלול האינטרינזי. לכן, מומלץ לבצע את בדיקת רמת פקטורי הקרישה עם ריאגנט PTT שאינו רגיש לנוכחות נוגדנים כנגד פוספוליפידים. בדרך זו, רק במקרים שיש נוגדן לפקטור, רמת פקטור הנבדק תהיה נמוכה.

3.9 ברור דמם על רקע לופוס אנטיקואגולנט חיובי:

ברוב המקרים, מחלות דמם הקשורות לנוגדנים נגרמות מנוגדן ספציפי לגורם קרישה כגון acquired VWD או Acquired Hemophilia A לעיתים רחוקות, במקרים של לופוס אנטיקואגולנט חיובי יש נטייה לדמם. הגורם השכיח ביותר לנטייה זו הוא נוגדן ספציפי כנגד FII (Prothrombin) העלול להוריד את רמת FII לערכים נמוכים ביותר ($<10\%$).

4.0 קביעת ערכי ייחוס לתבחיני LAC:

4.1 על כל מעבדה לקבוע את ערכי הנורמה שלה לתבחיני לופוס אנטיקואגולנט, תוך שימוש בריאגנטים, במכשירים ובצורת ההקפאה וההפשרה בדיוק כפי שמבוצעים לדגימות הפלסמה הנבדקות. ערכי הנורמה יקבעו ע"י חישוב ממוצע תוצאות של לפחות 30 נבדקים בריאים שגילם נמוך מגיל 50. (המלצת ה H60 עומדת על 40 נבדקים).

4.2 טווח הייחוס יחושב בטווח של 2 סטיות התקן, על פי המלצת ה H60 העומדת על 2 סטיות תקן.

4.3 הנבדקים לקביעת ערכי הייחוס יורצו על פני מספר ימים, בכל מועד יש להריץ 5 נבדקים מתוך ה-30.

4.4 אימוץ ערכי נורמה של הספק: ניתן לאמץ ערכי נורמה של הספק במידה והספק מצהיר על ערכים אלו ובמידה והוא:

▪ השתמש בלפחות 120 נבדקים נורמליים לצרכי קביעתם.

מספק מידע על המחקר שעל פיו הוא יצר ערכי נורמה ומפרט כיצד נבחרה אוכלוסיית המדגם, באיזה מכשיר הוא השתמש ובאיזה לוט של ריאגנטים.

יש לאשררם על פי הנחיות CLSI EP 28 : הרצת 20 נבדקים נורמליים ובדיקה כי הסטייה היא עד 10% בלבד.

4.5 אימוץ ערכי נורמה של מעבדה אחרת אפשרי כל עוד דרכי העבודה, המכשירים והלוטים זהים.

יש לאשררם על פי הנחיות CLSI EP 28 המפורטות בסעיף 4.4.

4.6 בהחלפת אצווה יש לאשרר את ערכי הייחוס על פי הנחיות CLSI EP 28 המפורטות בסעיף

. 4.4

5. דיווח תוצאת Lupus anticoagulant (LAC)

בשל ריבוי השמות לבדיקות המעבדה לאבחון לופוס אנטיקואגולנט ממעבדות שונות, נעשה מאמץ כלל ארצי לשמות אחידים. ההמלצה הנוכחית היא כדלקמן והטמעתה היא באחריות המרכזים למעבדות השונות.

5.1 ערכי הנורמה של המעבדה יופיעו בדף התוצאות.

5.2 תוצאות בדיקות הניתנות כ Ratio מבטאות את היחס בין ערך הבדיקה עם ריאגנט רגיש לנוגדנים כנגד פוספוליפידים לבין ריאגנט שאינו רגיש.

5.3 יש לדווח את התוצאות ה Ratio כ Normalized Ratio ולציין בכותרת של שם הבדיקה כי מדובר בערך מנורמל.

5.3.1 מומלץ לנרמל את התוצאות בעזרת ממוצע ה RI (Reference Interval) הנגזר מתחום הייחוס של המעבדה.

5.3.2 על פי מדריך ה H60 השימוש ב NPP מיסחרי אינו מומלץ עקב השונות בין אצוות ה NPP.

5.3.3 שיטת חישוב הנירמול הינה: Patient results

Mean of RI

5.4 בנוסף למתן התוצאה כ Normalized Ratio יש להמשיך ולדווח את תוצאת בדיקת הריאגנט LAC sensitive to (Screen) בערך של Normalized Screen.

5.5 ניתן גם לדווח את תוצאת הריאגנט not sensitive to LAC (confirm) בערך של Normalized Confirm (לבחירת המעבדה).

5.5 באחריות המעבדה המבצעת לוודא כי דף תוצאות הבדיקה נראה על פי ההנחיות בכל תוכנות המחשב אשר בשימוש במרכזו.

5.6 להלן שמות הבדיקות והיחידות בהן מבוטאות התשובות, כפי שיופיעו בדף התוצאות:

שם הבדיקה	יחידות
PTT Screen Normalized (sensitive to LAC)	Ratio
PTT Confirm Normalized (not-sensitive to LAC)	Ratio
PTT Normalized Ratio (Screen/Confirm)	Ratio
PTT Normalized mix 1:1 with normal plasma	Ratio
RVVT Screen Normalized (sensitive to LAC)	Ratio
RVVT Confirm Normalized (not-sensitive to LAC)	Ratio
RVVT Normalized Ratio (Screen/Confirm)	Ratio
RVVT Normalized mix 1:1 with normal plasma	Ratio
SCT Screen Normalized (sensitive to LAC)	Ratio
SCT Confirm Normalized (not-sensitive to LAC)	Ratio

SCT Normalized Ratio (Screen/Confirm)	Ratio
SCT Normalized mix 1:1 with normal plasma	Ratio

6.0 הערות גלויות לבדיקה:

הוספת הערה על משמעות תוצאות הבדיקה מומלצת אך נתונה לשיקול המרכזים\מעבדות השונות.

ההערות המומלצות הן כדלקמן:

אין עדות מעבדתית לנוכחות LAC.

LAC נמצא חיובי בבדיקות: (יופיע פירוט הבדיקות עליהן מסתמכים).

LAC גבולי בבדיקות: (יופיע פירוט הבדיקות עליהן מסתמכים).

לא ניתן לקבוע האם קיימת עדות מעבדתית לנוכחות LAC.

לאישור נוכחות LAC יש לחזור על הבדיקה לאחר 12 שבועות לפחות .

מרכז\מעבדות שונות יכולות להוסיף הערה של הפנייה לייעוץ המטולוגי כאשר יש ממצאים פתולוגיים או בלתי ברורים.