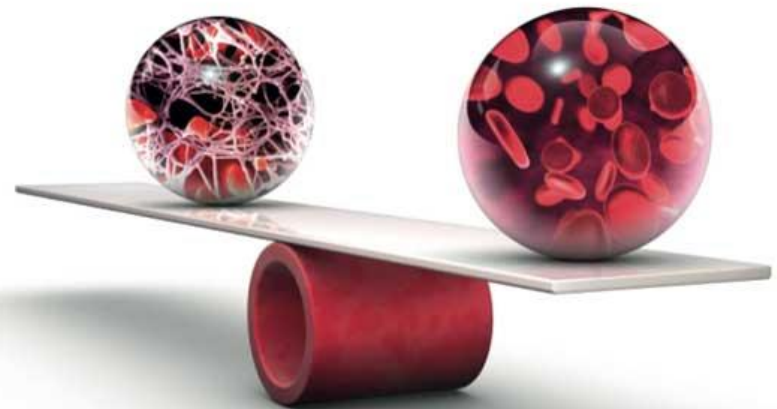


Diagnostiek Lupus Anticoagulans

Vergelijk richtlijnen en praktische invulling in LabWest

Irma Kuipers

Klinisch Chemicus in opleiding
Haaglanden Medisch Centrum/LabWest



Diagnostiek LAC

- Antifosfolipiden syndroom
 - Autoimmuun (spontaan of bij bv SLE, infecties, maligniteiten [tijdelijk])
 - Trombose/miskramen

- Diagnose
 1. Klinisch beeld trombose/miskramen
 2. Persisterende aanwezigheid van antistoffen
 - Dezelfde antistoffen, persisterend (min 12 wk)
 - Anti-cardiolipine / anti- β 2 glycoproteïne I (solid phase assays)
 - Lupus anticoagulans (LAC) in clotting-based stollingsassays

Richtlijnen LAC

- **International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)**
 - >4000 leden, 94 landen
 - *Journal of Thrombosis and Haemostasis (JTH)*
 - Richtlijn LAC 2009 (update)
- **British Committee for Standards in Haematology (BCSH)**
 - Subcommissie uit British Society for Haematology (BSH)
 - >1700 leden, wereldwijd
 - *British Journal of Haematology (BJH)*
 - Richtlijn LAC 2012 (update)
- **The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**
 - >2000 leden, >60 landen
 - Breed aanbod diverse documenten (richtlijnen, ISO, kwaliteitsmanagement, etc.)
 - Richtlijn LAC 2014 (H60-A, eerste versie)

Diagnostiek LAC

- Wie komt in aanmerking voor de diagnostiek?
- Preanalyse
- Screeningstesten, Bevestigingstesten, Mengproeven
- Rapportage
- Testen onder antistollingsmiddelen
- LAC in LabWest
 - Referentie intervallen / Afkappunten

LAC – wie testen?

- ISTH
 - Klinische verdenking APS
 - Laag: veneuze of arteriële trombose in ouderen
 - Matig: meerdere vroege miskramen, veneuze trombose in jonge patiënten (uitgelokt), onverklaard verlengde aPTT in routine diagnostiek
 - Hoog: onverklaarde veneuze of arteriële trombose <50 jr, trombose op ongewone locaties, late miskramen, trombose/miskramen bij autoimmuunaandoeningen (SLE, RA, ITP, AIHA)
 - Cave vals positief bij asymptomatische patiënten
 - Assays laag specifiek

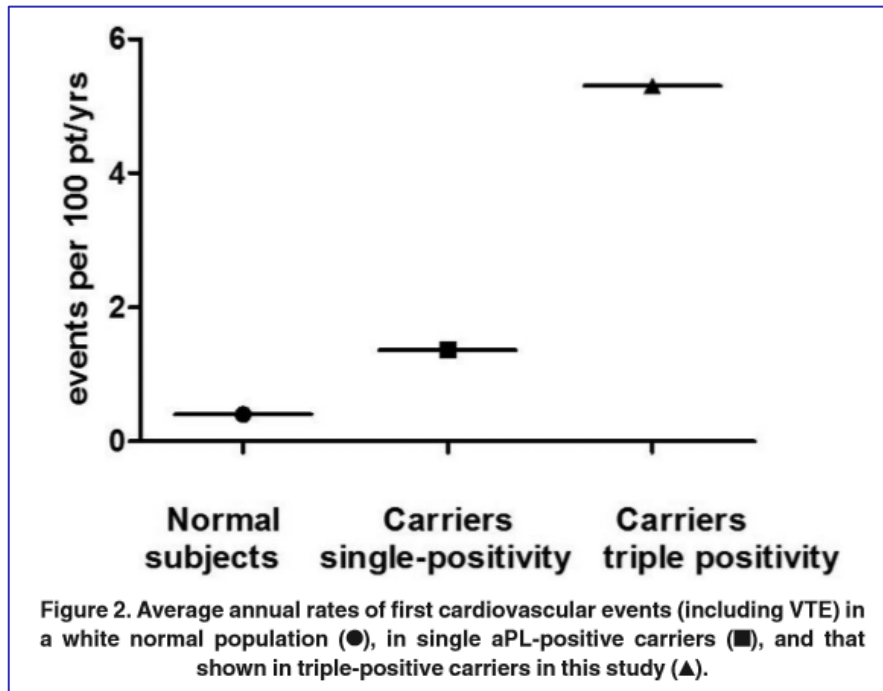
LAC – wie testen?

- **CLSI & BCSH**
 - Idem als ISTH
 - Klinische verdenking APS

- **Toevoeging CLSI**
 - Wees terughoudend bij aandoeningen die stollingstijden beïnvloeden
 - Zwangerschap, acute fase; verhoging van o.a. fVIII (vals negatief)
 - Verhoogd CRP (vals positief in aPTT)
 - Gebruik geen LAC gevoelige aPTT voor routine

LAC – wie testen?

- Toevalsbevindingen
 - CLSI: gebruik geen LAC gevoelig reagens in routine
 - BCSH: geen profylaxe na een toevalsbevinding
 - ISTH: LAC onderzoek is geïndiceerd bij een onbegrepen verlengde aPTT



Asymptomatische dragers
Positief = 2x met minimaal 12wk interval

Normal: LAC, aCL & aB2PG1 neg
Single pos: LAC, aCL **of** aB2PG1 pos
Triple pos: LAC, aCL & aB2PG1 pos

NB: ± helft triple pos autoimmuunziekte

LAC – preanalyse

- Preanalyse (3 richtlijnen)
 - 0.109 mol/l trisodium citraat
 - Trombocytenresten kunnen stoltijden verkorten
 - Cave vals negatieve uitslagen
 - $<10 \cdot 10^9/L$ (ook referentieplasma (NPP))
 - 2 maal centrifugeren
 - CLSI: 1 maal mits gevalideerd
 - ISTH: eerst 2000g dan $>2500g$
 - BCSH & CLSI: geen ultracentrifuge ($>5000g$) ivm mogelijke micropartikels
 - 3 richtlijnen: niet filtreren (verlies factoren met name bij cellulose acetaat filters)
 - fV, fVIII, fIX, fXII en VWF
 - Verlengde stoltijden!
 - CLSI: mogelijk *low protein binding filters* in de toekomst

LAC – preanalyse

- Preanalyse (3 richtlijnen)
 - Eénmaal invriezen
 - CLSI & ISTH:
 - Snel na afname meten/invriezen (CLSI: 4 uur)
 - Invriezen bij -70°C
 - Ontdooien bij 37°C (5 min waterbad)
 - CLSI:
 - 14 dagen houdbaar bij -20°C
 - Binnen 4 uur na ontdooien meten

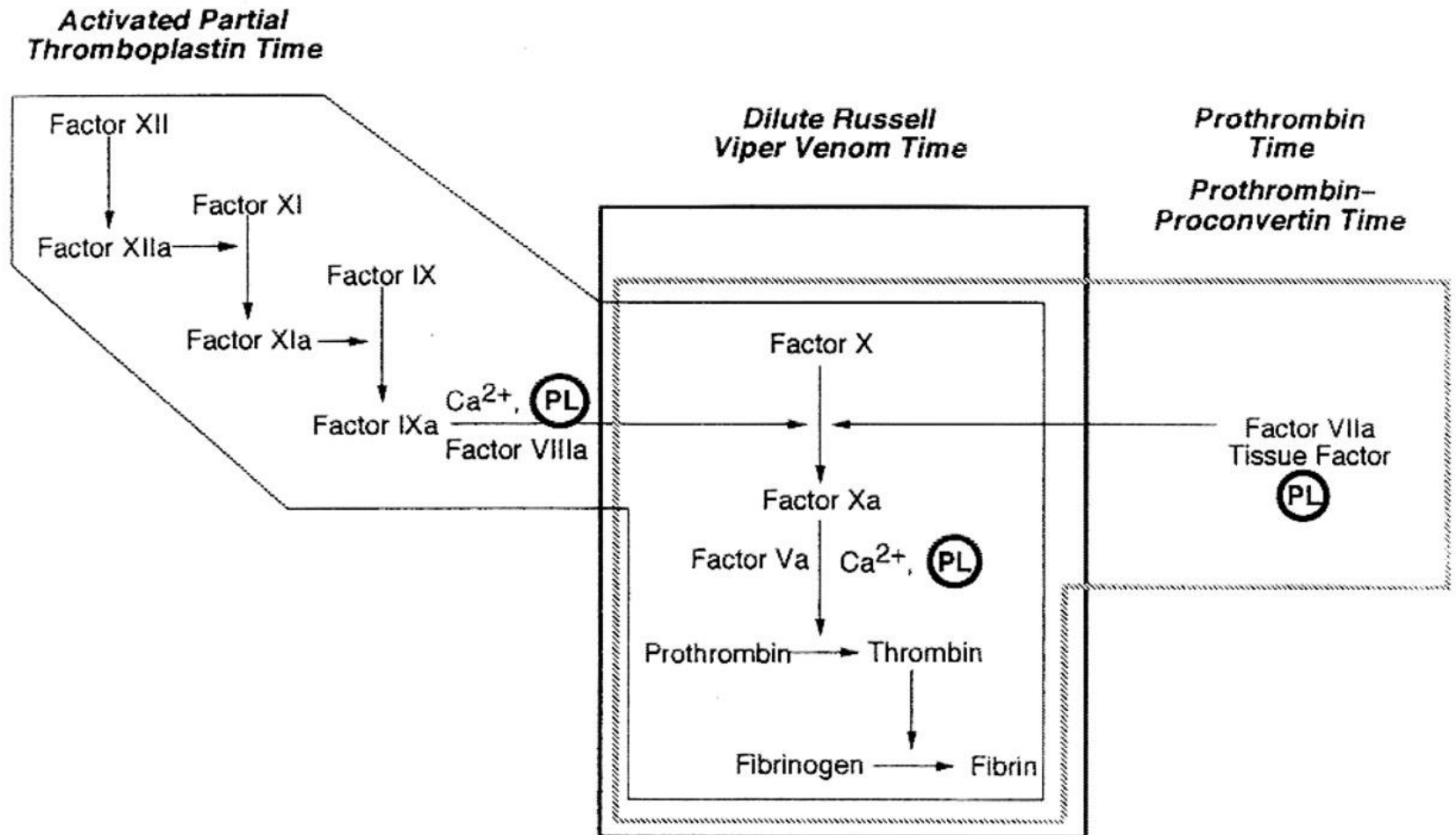


LAC – preanalyse

- Testkeuze (3 richtlijnen)
 - Antistoffen zeer heterogeen; één test is niet voldoende
 - Meerdere testen, verschillende route in stollingscascade
 - aPTT (sensitiviteit; check activator en hoeveelheid PL!)
 - dRVVT (specificiteit; correlatie met tromboserisico)

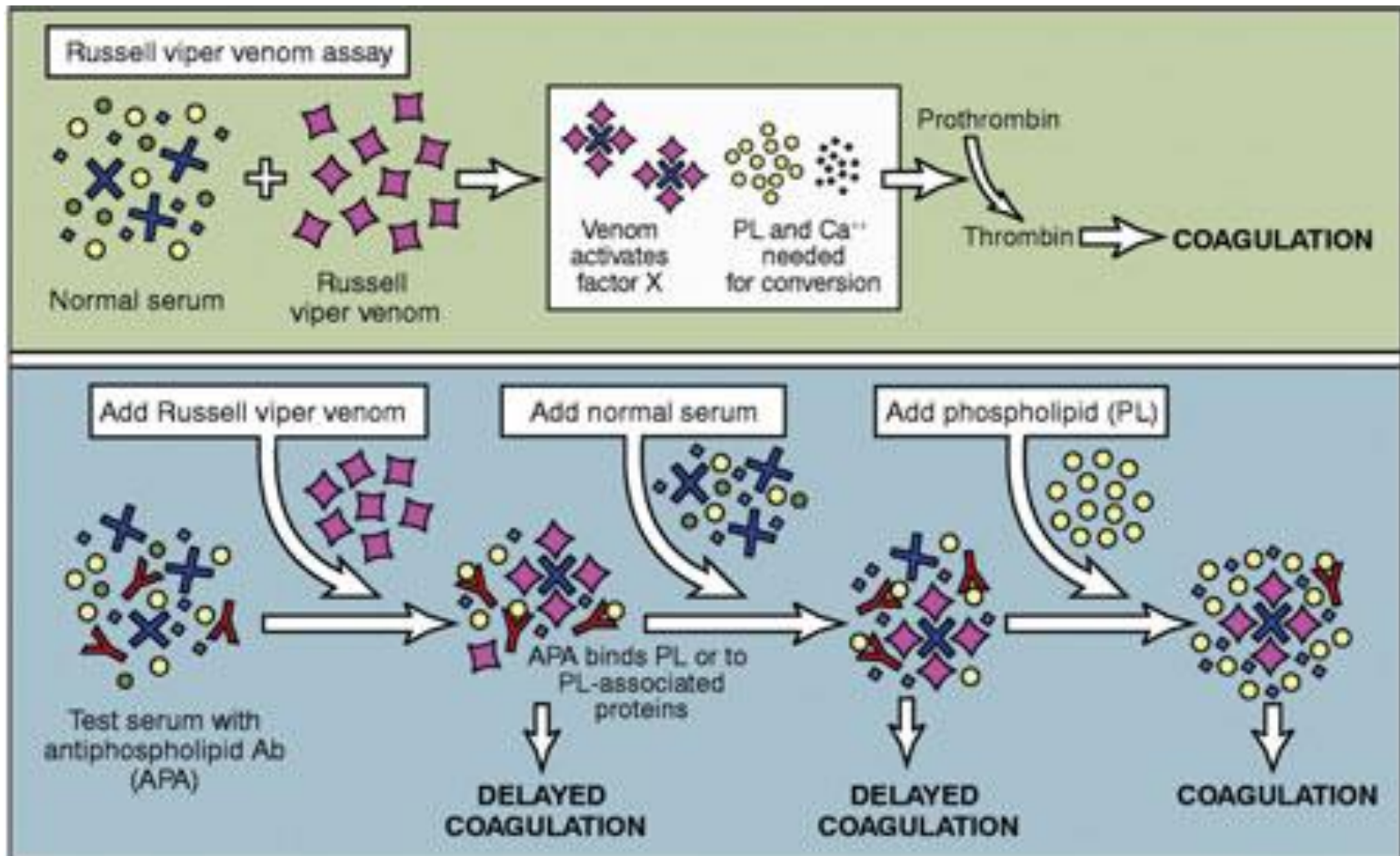
LAC – preanalyse

- Testkeuze (3 richtlijnen)



LAC – preanalyse

- Testkeuze (3 richtlijnen)



LAC – preanalyse

- Testkeuze (3 richtlijnen)
 - Antistoffen zeer heterogeen; één test is niet voldoende
 - Meerdere testen, verschillende route in stollingscascade
 - aPTT (sensitiviteit; check activator en hoeveelheid PL!)
 - dRVVT (specificiteit; correlatie met tromboserisico)
- Verschillen in richtlijnen
 - ISTH: dRVVT & aPTT (silica)
 - meer dan 2 testen = te grote kans op vals positief
 - BCSH: dRVVT & andere test (ander testprincipe)
 - Andere test niet gespecificeerd, voorbeeld LA-sensitieve aPTT of dPT
 - CLSI: dRVVT & aPTT (sensitief voor LAC)
 - bij hoge klinische verdenking additionele testen

LAC – preanalyse

- Overige testkeuzes (niet geschikt volgens ISTH; weinig ervaring!)
 - Kaoline clotting time (KCT)
 - Zeer sensitief (lage PL), maar bewerkelijk en geen standaard bevestigingstest
 - Ellaginezuur gebaseerde testen
 - Variatie in fosfolipideconcentraties
 - dPT
 - Veel variatie, maar gestandaardiseerde kits; sommige antistoffen neg in aPTT en dRVVT
 - Andere slangengiften (Textarin, Ecarin)
- Ter discussie
 - Heterogeniteit antistoffen
 - Welke worden gemist in aPTT/dRVVT?
 - Bias door vergelijk aPTT/dRVVT testen?
 - Geen gouden standaard!

LAC – testvolgorde

- Screeningstesten, Bevestigingstesten, Mengproeven
- Screeningstesten, Mengproeven, Bevestigingstesten
- Ratio's (3 richtlijnen)
 - Inter-/Intra-assay variatie verlagen
 - *Normal pooled plasma* (NPP) in alle testen meenemen
 - BCSH & ISTH
 - *Reference interval* (RI) mean
 - CLSI 2014
 - Variatie in batches NPP
 - Verschil bereiding NPP en patiëntenmonsters
 - (Automatische berekeningen van ratios)
 - Opnieuw berekenen/verifiëren van RI bij nieuw lot# reagens!

LAC – testvolgorde

- Screeningstesten, Bevestigingstesten, Mengproeven
- Screeningstest

$$\text{Genormaliseerde screenratio} = \frac{\text{screenetest patiënt}}{\text{screenetest NPP}}$$

of

$$\text{Genormaliseerde screenratio} = \frac{\text{screenetest patiënt}}{\text{RI-mean screenetest}}$$

- Geen verhoogde ratio in twee screeningstesten?
 - Klaar! (ISTH & BCSH)
 - Hoge klinische verdenking? Nog een test (CLSI)

LAC – testvolgorde

- Screeningstesten, Bevestigingstesten, Mengproeven
- Na de screeningstest
 - Mengproef (ISTH)
 - Verhoging specificiteit
 - Mengproef (BCSH)
 - Mogelijk missen van zwakke antistoffen (vals negatieve uitslag)
 - Normalisatie meng- en bevestigingsproef: LAC positief
 - Meng + bevestiging dus!
 - Bevestigingstest (CLSI)
 - Mengproef = kans op vals negatieve uitslag
 - Mengproef alleen als bevestigingstest niet corrigeert
 - Ook verlengde bevestigingstest? Mogelijk zeer sterke LAC; screen + bevestiging mengen

LAC – testvolgorde

- Screeningstesten, Bevestigingstesten, Mengproeven
- Bevestigingstest (3 richtlijnen)
 - Bevestiging van PL afhankelijkheid; toevoegen PL
 - Hetzelfde testprincipe als de positieve screeningstest
- *Percentage correction of ratio* (ISTH, BCSH, CLSI)
 - $$= \frac{\text{Screenratio} - \text{Bevestigingsratio}}{\text{Screenratio}} \times 100$$
- *Normalized screen:confirm ratio* (CLSI, BCSH)
 - $$= \frac{\text{Screenratio}}{\text{Bevestigingsratio}}$$

LAC – testvolgorde

- Screeningstesten, Bevestigingstesten, Mengproeven
- Mengproef (3 richtlijnen)
 - 1:1 met NPP
 - Direct na positieve screening (ISTH, BCSH)
 - Pas bij negatieve bevestiging (CLSI)
 - Mengproef specifieke RI (nauwer door normalisatie met NPP) (ISTH,CLSI)
 - Alternatief: *Index of circulating anticoagulant* (ICA) (ISTH,CLSI)
 - $$= \frac{\text{Screen 1:1 mix} - \text{screen NPP}}{\text{screen onverdund patiëntplasma}} \times 100$$
 - Relatief tov het gebruikte NPP, ondervangen interassay variatie

LAC – Rapportage

- Geef interpretatie van de uitslag (ISTH, CLSI)
 - Kwantitatief en interpretatie
 - Positief of niet detecteerbaar
 - Bij positief; herhaling na interval van minimaal 12 weken
- Borderline/Indeterminate
 - Niet doen (ISTH; hooguit “to be tested again in 1 week”)
 - Kan nuttig zijn (CLSI)
- Tripple antistoffen & dubbel LAC
 - Relevant voor prognose (hoger risico bij meer antistoffen!)
 - Tripple pos: Latino *et al.* Lupus. 2017 Jan 1:961203317692432
 - *poor response to conventional treatment in pregnant women*
 - Dubbel LAC : Swadzba J *et al.* J Thromb Haemost. 2011 Sep;9(9):1776-83
 - Met name op trombose risico

LAC – bij antistolling

- Liever niet! (3 richtlijnen)
 - Vitamine K antagonisten
 - INR <1,5 onverdund testen (ISTH, CLSI)
 - INR 1,5 – 3,0 verdunnen (1:1 met NPP) (ISTH, CLSI, BCSH)
 - INR >3,0 niet inzetten (ISTH)
 - Wees kritisch op negatieve uitslagen (3 richtlijnen)
 - Heparine
 - Ongefractioneerd
 - Niet doen (BCSH)
 - Wees voorzichtig (ISTH, CLSI [neutralisatie tot bepaald niveau])
 - LMWH
 - Mogelijk met neutralisatie (3 richtlijnen)
 - DOACs (CLSI)
 - Mengproef helpt niet
 - Directe trombine remmers (DTI)
 - groot risico op vals positieve uitslagen, soms ook in bevestigingstest
 - Factor Xa remmers
 - Misschien mogelijk met alternatieve assays; trombinetijd, taipan snake venom time
 - Weinig ervaring

LAC – in LabWest

- Opstellen referentiewaarden
 - 51 gezonde vrijwilligers
 - Minimaal 40 (ISTH, CLSI)
 - Minimaal 120, 20-60 voor verificatie firma (BCSH)
 - 99^{ste} percentiel (ISTH)
 - 2 testen (Sysmex CS 2100i, Siemens)
 - Screen aPTT FSL & dRVVT LA1
 - Bevestiging aPTT FS & dRVVT LA2

Test	Ratio
Screening	
aPTT FSL	1,27
dRVVT LA1	1,58
Bevestiging	
aPTT FSL/FS	1,03
dRVVT LA1/LA2	1,43
Mengproef	
aPTT FSL (1:1)	1,27
dRVVT LA1 (1:1)	1,36

LAC – in LabWest

- Opstellen referentiewaarden
 - Ratio's tov SHP
 - Uitslag bevestiging als $\frac{\text{Screenratio}}{\text{Bevestigingsratio}}$
 - *Geen percentage correction of ratio*
 - Bij negatieve screening; LAC niet aantoonbaar
 - Bij positieve screening; meng + bevestiging
 - Uitslag inclusief interpretatie (door KC)
 - Check eerste of tweede uitslag (12 wk interval)
 - Ook uitslagen anti-cardiolipine / anti- β 2 glycoproteïne I
 - (Nog) niet; dubbele uitslag LAC, ratios

Test	Ratio
Screening	
aPTT FSL	1,27
dRVVT LA1	1,58
Bevestiging	
aPTT FSL/FS	1,03
dRVVT LA1/LA2	1,43
Mengproef	
aPTT FSL (1:1)	1,27
dRVVT LA1 (1:1)	1,36

LAC – take home

- Zeer complexe fysiologie en diagnostiek
- Geen gouden standaard
- Uitslagen van belang voor behandeling/prognose!
- 3 uitgebreide richtlijnen, met discrepanties
 - Type assays
 - Testvolgorde (plaats van de mengproef)
 - Referentiewaarden / Afkappunten
 - Hoe om te gaan met patiënten op anticoagulantia
- Maak geïnformeerde keuzes!



Table 1 Summary of commonalities and contrasts between recent ISTH, BCSH, and CLSI guidelines for lupus anticoagulant detection

Area of recommendation	ISTH 2009	BCSH 2012	CLSI 2014
Sample preparation	Double centrifugation	Double centrifugation	Double centrifugation
Assays to use	dRVVT and aPTT	dRVVT plus aPTT or others	dRVVT and aPTT and/or others
Testing order	Screen-mix-confirm	Screen-mix-confirm	Screen-confirm-mix
Ratio derivation	NPP denominator	NPP denominator	RI mean denominator
RI/cutoffs	99th percentile	97.5th percentile (if Gaussian)	97.5th percentile (if Gaussian)
Calculations for phospholipid-dependence	% correction of screen by confirm, or LA ratio (screen/confirm)	% correction of screen by confirm, or LA ratio (screen/confirm)	% correction of screen by confirm, or LA ratio (screen/confirm)
Mixing test	Perform on 1:1 mixture with NPP; Interpret with ICA or mixing test-specific cutoff	Perform on 1:1 mixture with NPP	Perform on 1:1 mixture with NPP; Interpret with ICA or mixing test-specific cutoff
Testing patients on VKAs	Undiluted plasma if INR < 1.5; Mix with NPP if INR > 1.5 < 3.0	Screen and confirm on 1:1 mixture with NPP; TSVT + ET or PNP	Screen and confirm on 1:1 mixture with NPP; TSVT + ET or PNP
Testing patients on UFH	Interpret with caution	Not recommended	Can detect LA in some cases where heparin neutralizer is effective
Interpretive reporting	Recommended	Recommended	Recommended

LAC – bedankt!

