บทความฟื้นวิชา

Laboratory Diagnosis of Lupus Anticoagulant : from Guidelines 1995 to 2009

เบญจพร อัคควัฒน์

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การตรวจพบ lupus anticoagulant (LA) ใน พลาสมาของผู้ป่วยเป็นข้อบ่งชี้สำคัญตัวหนึ่งของภาวะ antiphospholipid syndrome (APS) ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของภาวะหลอดเลือดอุดตันทั้งในหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดง การทดสอบ lupus anticoagulant เป็นการตรวจโดยใช้หลักการการแข็งตัวของเลือดที่ต้องใช้ phospholipid (PL) มาเกี่ยวข้องในปฏิกิริยาและวัดผลด้วยการจับเวลา clotting time

การตรวจนี้ควรทำควบคู่ไปพร้อมกับการตรวจหา anticardiolipin antibodies (aCL) และ anti-beta 2 glycoprotein I (aβ2GPI) ใน serum ที่ใช้หลักการของ antigen และ antibody ด้วยวิธี ELISA เสมอ ผู้ป่วย APS บางรายอาจให้ผลบวกเฉพาะการตรวจชนิดใดชนิดหนึ่งใน 3 ชนิดนี้ หรืออาจให้ผลบวกในการตรวจมากกว่าหนึ่งชนิดก็ได้ โดยการให้ผลบวกมากกว่าหนึ่งชนิดอาจแสดงถึงความเสี่ยงต่อภาวะหลอดเลือดอุดตันที่สูงกว่าการให้ผลบวกเพียงชนิดเดียว ดังนั้นผลการตรวจ LA ที่เป็นบวกย่อมมีผลต่อแนวทางการรักษาของแพทย์ไม่ว่าจะมีผล aCL และ aβ2GPI เป็นบวกหรือลบก็ตาม

เนื่องจากการตรวจหา LA มีวิธีการที่ยุ่งยากและซับซ้อนหลายขั้นตอน นอกจากนี้แอนติบอดีที่ทำให้เกิด LA มีความหลากหลาย (heterogeneity) บางกลุ่มย่อยอาจตรวจพบได้โดยการตรวจชนิดหนึ่งแต่ไม่พบด้วยการตรวจอีกชนิดหนึ่ง จนถึงปัจจุบันจึงยังไม่มีน้ำยาที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) พอที่จะตรวจพบ LA ทุกกลุ่มย่อยได้[1] Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody ของ Scientific and Standardization Committee (SSC) ของ International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) จึงได้ร่วมกันกำหนดแนวทาง (guideline) สำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการในการตรวจหา LA ไว้ตั้งแต่ปี 1991[2] และ 1995[3] เป็นที่ใช้กันแพร่หลายมากว่า 10 ปีแล้ว ในปี 2007 ที่ประชุมจึงได้ตกลงกันที่จะปรับปรุงแนวทางปฏิบัติดังกล่าวให้สอดคล้องกับข้อมูลที่เป็นปัจจุบันและน้ำยาใหม่ๆ ที่ผลิตออกมาภายหลัง อันจะเป็นแนวทางให้ผู้ปฏิบัติงานทำงานได้ง่ายขึ้น ลดข้อผิดพลาดที่ไม่สมควร ลดค่าใช้จ่ายที่ไม่จำเป็น และเพื่อให้ผลการตรวจมีความแม่นยำมากขึ้น

แนวทางปฏิบัติเดิม (Guidelines 1991 และ 1995)

ได้มีการแบ่งการตรวจหา LA สรุปได้เป็น 4 ขั้นตอน คือ

1. ทำ Screening test ใช้น้ำยาที่มีความเข้มข้นของ phospholipid ต่ำๆ จะทำให้มีความไวสูงในการตรวจจับ LA หากพลาสมานั้นมี LA จะพบค่า clotting time ยาวผิดปกติ ควรเลือกวิธีใดก็ได้อย่างน้อย 2 วิธี ซึ่งตรวจคนละ pathway ของการแข็งตัวของเลือด
2. Mixing test เป็นการผสมพลาสมาผู้ป่วยกับ pooled normal plasma (PNP) โดยทั่วไปจะทำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แต่ก็มีการใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 4 สำหรับ kaolin clotting time (KCT) หรือ 4 ต่อ 1 ในกรณีที่ผู้ป่วยมี aPTT ผิดปกติเพียงเล็กน้อย หากความผิดปกติในข้อ 1 มีสาเหตุจากการขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (coagulation factor) ค่า clotting time จะสั้นเข้ามาอย่างมีนัยสำคัญ แต่หากเป็น LA หรือเป็น inhibitor อื่นๆ clotting time จะยังคงยาวอยู่
3. Confirmatory test เป็นการเติม phospholipid เพื่อแก้ไขความผิดปกติในข้อ 1 และ 2 phospholipid นี้อาจได้มาจากแหล่งต่างๆ เช่น phospholipid ที่สกัดได้จากวัว (bovine phospholipid) เกล็ดเลือดที่แช่แข็งแล้วละลายออกมา (frozen-thawed platelets) หรือ hexagonal phase phospholipid ก็ได้
4. มีการพิสูจน์ด้วยว่าไม่มี inhibitor ที่จำเพาะต่อปัจจัยการแข็งตัวของเลือดในพลาสมานั้น เช่น factor VIII

ได้รับต้นฉบับ 16 มกราคม 2554 ให้ลงตีพิมพ์ 30 มกราคม 2554

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ เบญจพร อัคควัฒน์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

e-mail : smedbam@gmail.com

inhibitor

ไม่มีการทดสอบวิธีใดวิธีเดียวที่เฉพาะเจาะจงกับ LA จึงจำเป็นที่จะต้องใช้อย่างน้อย 2 วิธีขึ้นไปในการตรวจหา LA แล้วนำผลมาแปลร่วมกัน ทุกวิธีจำเป็นต้องอาศัยหลักการเกิด fibrin clot ตาม coagulation cascade (แสดงในตารางที่ 1) บางวิธีใช้หลักการของ intrinsic pathway เช่น aPTT, Kaolin clotting time (KCT), Silica clotting time (SCT) บางวิธีใช้ extrinsic pathway เช่น Diluted prothrombin time /Diluted thromboplastin inhibition test (dPT/dTTI) หรือใช้ common pathway เช่น Diluted Russell viper venom time (dRVVT) แต่ละวิธีมีความไวต่อ LA ต่างกัน[4-8] หรือแม้แต่จะเป็นวิธีเดียวกัน เช่น aPTT น้ำยาที่ผลิตจากบริษัทต่างๆ ก็มีความแตกต่างกันในแง่ของความเข้มข้นและชนิดของ activator และ phospholipid หลายบริษัทผลิตน้ำยา aPTT ที่มีความไวสูงต่อ LA เพื่อใช้สำหรับงานตรวจ LA โดยเฉพาะ ไม่ควรนำน้ำยาเหล่านี้มาใช้ในการตรวจ aPTT ทั่วๆ ไปซึ่งใช้ตรวจหาภาวะเลือดออกง่ายไม่ใช่ตรวจหา LA

Screening test มีหลักอยู่ว่าให้เลือกใช้ 2 วิธีที่มีหลักการต่างกันคือใช้คนละ pathway ของการแข็งตัวของเลือด เช่น หากใช้ aPTT ก็ควรจะเลือกวิธีที่ 2 เป็น dRVVT หรือ dPT ไม่ควรใช้ KCT หรือ SCT

การทำ mixing test มีการประมวลผลได้หลายแบบ ทั้งการเปรียบเทียบค่า clotting time กับค่าปกติ การเปรียบเทียบค่า ratio กับค่าปกติ **และใช้สูตรในการคำนวณ index of correction**[9] เพื่อแปลผลดังนี้

$$\text{Index of correction} = \frac{b-c}{a} \times 100$$

เมื่อ a คือ clotting time ของผู้ป่วย b คือ clotting time ของผู้ป่วยผสมกับคนปกติ และ c คือ clotting time ของคนปกติ ซึ่งวิธีสุดท้ายนี้เป็นวิธีเดียวที่นำค่า clotting time ของผู้ป่วยเองมาถ่วงน้ำหนักด้วย แต่ก็ยังมีข้อควรระวังที่สำคัญคือ พลาสมาของคนปกติที่ใช้จะต้องเหลือเกล็ดเลือดอยู่น้อยที่สุด ซึ่งไม่มีการกำหนดรายละเอียดไว้ชัดเจน

ด้วยกระบวนการหลายขั้นตอนและความหลากหลายของน้ำยาทั้งที่เตรียมใช้เองในห้องปฏิบัติการและที่มีจำหน่ายเป็นน้ำยาชุดสำเร็จรูป อีกทั้งการอ่านและแปลผลกระทำโดยบุคลากรในห้องปฏิบัติการ จึงจำเป็นต้องมีการกำหนดมาตรฐานที่มีให้ความแม่นยำถูกต้องมากที่สุด จากข้อมูลการศึกษาวิจัยกันมาเป็นเวลากว่า 10 ปี Subcommittee on Lupus Anticogulant/Phospholipid dependent Antibodies ของ SSC จึงได้ตกลงกำหนดแนวทางปฏิบัติใหม่ดังจะกล่าวรายละเอียดต่อไป

แนวทางปฏิบัติใหม่ (Guideline 2009)[10]

1. การเลือกผู้ป่วย

มีการแบ่งผู้ป่วยเป็น 3 กลุ่มแยกตามอาการที่ตรวจพบ คือ กลุ่มที่มีความเป็นไปได้ที่จะพบ LA มาก ปานกลางและน้อย (ตารางที่ 2) โดยมีวัตถุประสงค์ให้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการส่งตรวจ LA เพื่อลดการสั่งตรวจที่ไม่จำเป็นลง การตรวจพบผลเป็นบวกในกลุ่มที่มีความเป็นไปได้ที่จะพบ LA น้อยหมายถึงมีโอกาสที่จะเป็นผลบวกปลอม (false positive) มากกว่าผลบวกที่พบในกลุ่มที่มีความเป็นไปได้มาก แต่ไม่ได้หมายความว่าจะเป็นผลบวกปลอมเสมอไป เมื่อพบผลเป็นบวกในผู้ป่วยแล้วควรมีการส่งตรวจซ้ำอีกครั้งหนึ่งหลังการตรวจครั้งแรกอย่างน้อย 3 เดือน[11]

ควรเจาะเลือดก่อนที่ผู้ป่วยจะได้รับยาละลายลิ่มเลือดทุกชนิด ผู้ป่วยที่มีภาวะหลอดเลือดอุดตันเฉียบพลันอาจจะมีระดับ factor VIII สูงกว่าปกติ หรือผู้ป่วยที่กำลังได้รับ unfractionated heparin และ/หรือ vitamin K antagonists (VKA) เหล่านี้มีผลกับ clotting time ทั้งสิ้น จึงควรส่งตรวจ LA เมื่อหยุด warfarin แล้ว 2 สัปดาห์ หรือเมื่อ international normalized ratio (INR) น้อยกว่า 1.5 ในระหว่างช่วงนี้ให้ low molecular weight heparin (LMWH) แทนชั่วคราว และให้เจาะเลือดหลังได้รับ LMWH อย่างน้อย 12 ชั่วโมง เนื่องจาก LMWH ที่มีสัดส่วนของ anti IIa ต่อ anti Xa สูงก็อาจมีผลทำให้ clotting time

ตารางที่ 1 Screening Assays for Lupus Anticoagulant

Activated partial thromboplastin time (aPTT)
aPTT – altered incubation time
Diluted aPTT
Taipan snake venom clotting time
Diluted prothrombin time (thromboplastin inhibition test)
Kaolin clotting time
Silica clotting time

ตารางที่ 2 Appropriateness to search for Lupus Anticoagulant

High	Unprovoked venous thromboembolism (VTE) in the young (< 50 yrs)
	Unexplained arterial thrombosis in the young
	Thrombosis at unusual sites
	Late pregnancy loss
	Thrombosis or pregnancy morbidity in patients with autoimmune diseases
Moderate	Prolonged aPTT in asymptomatic subjects
	Recurrent spontaneous early pregnancy loss
	Provoked VTE in young patients
Low	VTE or arterial thromboembolism in elderly patients

ยาวกว่าปกติได้ ถ้า INR อยู่ในช่วง 1.5 – 3.0 อาจใช้วิธีเจือจางทั้งพลาสมาผู้ป่วยและ pooled normal plasma ลงเท่าตัว[1] แต่ก็อาจมีความลำบากในการแปลผลเนื่องจาก LA ก็ถูกเจือจางลงเท่าตัวด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ hydroxychloroquine มีผลต่อการเกิด IgG-β2GPIcomplex บนผิว phospholipid bilayer จึงมีผลต่อการทดสอบ LA ส่วน aspirin และ clopidogrel ไม่มีผลต่อ LA ส่วน factor VIII ที่สูงขึ้นในช่วงตั้งครรภ์ก็มีผลให้ clotting time สั้นลงได้เช่นกัน

2. การเก็บตัวอย่าง

ควรใช้ 3.2% sodium citrate เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือดในอัตราส่วนของเลือดต่อสารต้านการแข็งตัวของเลือดเท่ากับ 9 ต่อ 1

การปั่น (centrifugation) ควรทำสองครั้งเพื่อกำจัดเกล็ดเลือดให้เหลืออยู่ในพลาสมาน้อยที่สุด

ครั้งแรกปั่นด้วยความแรงที่ 2,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องซึ่งจะยังคงมีเกล็ดเลือดเหลืออยู่ส่วนหนึ่งซึ่งหากนำพลาสมาไปแช่แข็ง เกล็ดเลือดเหล่านี้จะแตกและปล่อย phospholipid ออกมารบกวนผลการทดสอบได้ จึงให้แยกเอาพลาสมาออกมาปั่นอีก

ครั้งที่สองปั่นด้วยความแรงอย่างน้อย 2,500 g ขึ้นไป เป็นเวลาอีก 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดแยกพลาสมาออกมาโดยระวังไม่ให้ตะกอนเกล็ดเลือดสีขาวที่ก้นหลอดติดขึ้นมา

ไม่แนะนำให้กรองพลาสมาด้วย filter เพื่อกำจัดเกล็ดเลือดแทนการปั่นครั้งที่สองเหมือนกับที่เคยกำหนดไว้ในแนวทางปฏิบัติปี 1995 เนื่องจากชนิดของ filter มีความหลากหลาย ปริมาณของพลาสมาที่ผ่าน filter มากหรือน้อยก็มีผลต่อคุณภาพของพลาสมา และแม้จะกำหนดปริมาณมาตรฐานได้ การกรองก็ทำให้ส่วนประกอบในพลาสมาเปลี่ยนไปเนื่องจากสารโมเลกุลใหญ่ เช่น von Willebrand factor multimer ไม่สามารถผ่าน filter ได้ อีกทั้งเพิ่มค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการโดยไม่จำเป็น

พลาสมาที่แยกออกมา หากยังไม่ได้ทำการทดสอบทันที ให้แช่แข็งที่ -70˚C ทันที ยิ่งใช้เวลาที่สั้นที่สุดที่ทำให้พลาสมาเป็นน้ำแข็งจะยิ่งคงคุณสมบัติของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดไว้ได้ดี เช่น แช่ลงในไนโตรเจนเหลวซึ่งจะใช้เวลาไม่ถึง 1 นาที แต่ถ้าแช่ในตู้แช่แข็งที่ -80˚C ก็จะใช้เวลาอย่างน้อย 10 นาทีขึ้นไปกว่าจะเป็นน้ำแข็งทั่วกันหมด

เมื่อจะทำการทดสอบให้ละลาย พลาสมา ที่ 37˚C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ cryoprecipitate ละลายให้หมด คว่ำหลอดไปมาให้พลาสมาเป็นเนื้อเดียวกันดีแล้วจึงทำการทดสอบ

3. วิธีการทดสอบ

3.1 Screening test

แนวทางปฏิบัติใหม่นี้ให้เลือกใช้ 2 วิธีเท่านั้น คือ dRVVT และ aPTT หากใช้มากกว่านี้ผลบวกปลอม (false positive) จะเพิ่มขึ้น มีรายงานว่า dRVVT มีความจำเพาะสูงกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงต่อภาวะหลอดเลือดอุดตัน[3] สำหรับ aPTT ที่มีความหลากหลายของน้ำยาจึงแนะนำให้เลือกใช้ชนิดที่มี silica เป็นตัวกระตุ้นเท่านั้นการตรวจจึงจะไวต่อ LA ส่วนตัวกระตุ้นที่เป็น ellagic acid นั้นไม่ไวต่อ LA

วิธีอื่นๆ ที่ใช้หลักการเดียวกับ aPTT ไม่ควรเลือกใช้ เช่น Kaolin clotting time (KCT) เนื่องจากไม่มี phospholipid ผสมอยู่ในน้ำยาเลยจึงมีความไวสูงมากเกิน มีผลให้ค่าไม่นิ่ง แกว่งง่ายจากปัจจัยรบกวน และยังจำเป็นต้องทำด้วยวิธี manual เท่านั้น เนื่องจากเครื่อง automated coagulation analyzer จะอ่านค่าไม่ได้ เพราะความขุ่นของ kaolin ส่วน dPT (dTTI) ก็มีปัญหามากจากความหลากหลายของน้ำยา thromboplastin ที่มีจำหน่ายกันอยู่

3.2 Mixing tests

การควบคุมมาตรฐานของ mixing tests ต้องเริ่มต้นจากพลาสมาปกติที่จะใช้ ห้องปฏิบัติการควรเตรียม pooled normal plasma ขึ้นมาสำหรับทำ mixing test โดยเฉพาะ โดยใช้วิธีทำนองเดียว

กับ pooled normal plasma สำหรับการตรวจการแข็งตัวของเลือดแต่ต้องปั่น 2 ครั้งเหมือน พลาสมาผู้ป่วยก่อนจึงจะนำมารวมกัน (pool) อย่างน้อย 20 ราย จะได้ pooled normal plasma ที่มี เกล็ดเลือดไม่เกิน 10^7/มล และมีปัจจัยการแข็งตัวของเลือดใกล้เคียง 100% หรืออาจใช้พลาสมาแห้ง (lyophilized normal plasma) ที่มีการยืนยันจากผู้ขายว่าใช้สำหรับทดสอบ LA แทนได้ pooled normal plasma ที่ปั่นครั้งเดียวสำหรับการตรวจการแข็งตัวของเลือดทั่วไปหากใช้ทำ mixing tests เพื่อหา LA ยังมีเกล็ดเลือดอยู่มากเกิน ทำให้กลายเป็นการเติม phospholipid ที่ได้จากเกล็ดเลือดลงไป เกิดผลลบลวง (false negative) ได้

สำหรับการทำให้ผสม 1 ส่วนของ pooled normal plasma กับ 1 ส่วนของพลาสมาผู้ป่วย ทำการทดสอบที่ให้ผล screening test ยาวทันทีโดยไม่ต้องนำไปอุ่น (incubation) ก่อนเหมือนกับการหา inhibitor ต่อปัจจัยการแข็งตัวของเลือด และต้องทำ positive และ negative control ไปพร้อมกันทุกครั้ง สาเหตุที่ mixing test ยังคงให้ผลยาวอยู่นั้น นอกจากจะมาจาก LA แล้ว อาจมีสาเหตุได้จากในพลาสมานั้นมี heparin อยู่ ซึ่งอาศัยการทำ thrombin time (TT) ช่วยตรวจสอบได้ โดย TT จะยาวมากในพลาสมาที่มี heparin หรือผู้ป่วยอาจมี inhibitor ต่อปัจจัยการแข็งตัวของเลือด ซึ่งกรณีนี้ผู้ป่วยมักมากับประวัติเลือดออกง่ายไม่ใช่ภาวะลิ่มเลือดอุดตัน

3.3 Confirmatory tests

ชนิดของ phospholipid ที่จะเติมลงในการทดสอบย่อมมีผลต่อความไวของการทดสอบนั้นๆ ควรใช้ phospholipid รูปแบบที่เป็น bilayer หรือ hexagonal (II) phase เท่านั้น ไม่ควรใช้เกล็ดเลือดที่แช่แข็งและละลายออกมา (freezed/thawed platelet) ที่เรียกว่า platelet neutralization procedure เพราะเกล็ดเลือดที่ล้างและเตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการแต่ละครั้งมีความแตกต่างกัน ขาดการทำให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน (standardization) เมื่อนำมาใช้ในการตรวจที่ซับซ้อนและต้องการการแปลผล เป็นสาเหตุให้ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของการทดสอบคลาดเคลื่อนได้

4. จุดตัดในการวินิจฉัย (Cut-Off point)

ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งจำเป็นต้องทำค่า cut-off ของตนเองจากพลาสมาคนปกติเดี่ยวๆ ที่ปั่น 2 ครั้งเช่นเดียวกับของผู้ป่วย ทำการทดสอบด้วยน้ำยาชนิดเดียวกันไปพร้อมกับ pooled normal plasma (PNP) ด้วย อย่างน้อย 40 คนขึ้นไป และแนะนำให้ทำค่า cut-off เฉพาะสำหรับผู้ป่วยรายที่ตั้งครรภ์จากการทำแบบเดียวกันในหญิงปกติที่ตั้งครรภ์

4.1 Screening test : ทำ screening test ในคนปกติเดี่ยวๆ แล้วนำค่า clotting time (CT) ที่ได้มาคำนวณ screening ratio ของคนปกติแต่ละคน เช่น screening ratio N1 = CT N1/ CT PNP แล้วนำค่าทั้งหมดมาคำนวณ percentile ที่ 99 ของ screening ratio ของ N1 ถึง N40 เป็นค่า cut-off

4.2 Mixing test: นำ clotting time (CT) ของส่วนผสมคนปกติเดี่ยวๆ กับ PNP ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 หารด้วยค่า clotting time ของ PNP เขียนเป็นสูตรได้ดังนี้ mixing ratio N1 = CT (N1 + PNP) / CT PNP หรืออาจใช้วิธีคำนวณ index of correction ของคนปกติแต่ละคน ดังที่อธิบายไว้ในแนวทางปฏิบัติ 1991 และ 1995 ซึ่งในแนวทางฉบับใหม่นี้จะกำหนดชื่อใหม่ว่า Index of Circulating Anticoagulant (ICA) สำหรับใช้อ่านผลการทำ mixing study ของการตรวจ aPTT ได้ด้วยเช่นกัน นำค่าที่ได้จากคนปกติ 40 คนมาคำนวณ percentile ที่ 99 แล้วใช้เป็นค่า cut-off ผลของผู้ป่วยจะตัดสินจาก mixing test ที่ยาวกว่าค่า cut-off นี้ ไม่ใช่การกลับเข้ามาอยู่ในค่าปกติของ screening test

4.3 Confirmatory test : ทำ confirmatory test ในคนปกติเดี่ยวๆ แล้วนำค่า clotting time (CT) ที่ได้มาคำนวณ confirmatory ratio N1 = CT N1/ CT PNP

จากนั้นจึงนำค่า screening ratio และ confirmatory ratio มาคำนวณค่า % correction ของคนปกติแต่ละคนดังนี้ % correction N1 = [(screen ratio N1-confirm ratio N1)/screen ratio N1 x 100] แล้วนำค่า % correction ของทั้ง 40 คนปกตินั้นมาหาค่า mean เพื่อเป็นค่า cut-off หากผู้ป่วยมี % correction สูงกว่า cut-off ให้ถือว่า LA positive

ปัจจุบันมีน้ำยาชุดตรวจที่ประกอบด้วย screening test และ confirmatory test ในกล่องเดียวกัน โดยมีความเข้มข้นของ phospholipid ในการตรวจต่ำและสูงตามลำดับ ข้อดีก็คือบริษัทผู้ผลิตมักจะเติมสาร polybrene หรือ heparinase ซึ่งเป็น antiheparin agent ในน้ำยาด้วยทำให้สามารถลดผลจากการรบกวนของ heparin ได้ถึง 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร[1] มีทั้งแบบทำ mixing test และข้ามขั้นตอนนี้ไป โดยมีค่า cut-off ที่คำนวณเป็น % correction หรือ LA ratio (screen/confirm) มาให้ด้วย แต่ห้องปฏิบัติการก็ควรจัดทำขึ้นเองและควรนำค่า clotting time ของ pooled normal plasma (PNP) ที่ทำไปพร้อมกันมาคำนวณด้วยดังนี้

LA ratio ผู้ป่วย = CT screen ผู้ป่วย/CT confirm ผู้ป่วย แล้วคำนวณ normalized ratio จากการหารด้วย LA ratio ของ PNP = CT screen PNP/CT confirm PNP อีกทีหนึ่ง (normalized ratio = LA ratio ผู้ป่วย/ LA ratio PNP)

5. การแปลและรายงานผล

ผลการทดสอบที่ยาวผิดปกติใน screening test และ mixing test แล้วกลับสั้นเข้าใน confirmatory test จนมากกว่าค่า cut-off ที่คำนวณเป็น % correction หรือ LA ratio แม้เพียงวิธีใดวิธีหนึ่งหรือทั้ง aPTT และ dRVVT ให้ถือว่าผล LA เป็นบวก ให้รายงานผลการทดสอบแต่ละชนิดพร้อมค่าปกติที่ทำขึ้นเองของแต่ละห้องปฏิบัติการ อาจรายงานเป็นเป็นค่า clotting time (วินาที) และ/หรือเป็นค่า ratio ด้วย ค่า ratio ให้คำนวณจาก clotting time ของผู้ป่วยหารด้วย clotting time ของ pooled normal plasma ที่ทำคู่กันไปกับผู้ป่วยในวันนั้นด้วยน้ำยาจากขวดเดียวกัน แล้วสรุปความเห็นด้วยว่า ผล LA เป็นบวกหรือลบในแต่ละการทดสอบ หลีกเลี่ยงการรายงานผลคลุมเครือ เช่น borderline กรณีผลไม่ชัดเจนหรือมีข้อสงสัยให้แนะนำส่งตรวจซ้ำใน 1 สัปดาห์

สรุปและข้อเสนอแนะ

แนวทางปฏิบัติใหม่ (Guidelines 2009) มีความแตกต่างหลายประการจากแนวทางเดิม (ตารางที่ 3) คือ มีข้อกำหนดที่ชัดเจน สะดวกในการปฏิบัติงานให้เป็นมาตรฐานเดียวกันซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับการทดสอบที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน ปัจจุบันยังไม่มีน้ำยาสำเร็จรูปในขั้นตอนเดียวและไม่มีวิธีใดเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ผู้ปฏิบัติงานจึงต้องเข้าใจหลักการและเลือกหาวิธีและน้ำยาที่เหมาะสม ผู้ขายก็ควรต้องมีความรู้ความเข้าใจไม่น้อยไปกว่าผู้ซื้อ แพทย์ผู้ส่งตรวจก็จำเป็นต้องทราบว่าภาวะใดบ้างยังไม่ควรส่งตรวจ LA ทั้งนี้ก็เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดผลบวกปลอมและให้ได้ผลที่แม่นยำถูกต้องแก่ผู้ป่วยนั่นเอง

ในการคำนวณค่า cut-off จากค่า mean ของ % correction ในการทำ confirmatory test นั้น จากประสบการณ์ของผู้เขียนพบว่า ในคนปกติจะมีผู้ที่มีค่า % correction เป็นบวกและลบพอๆ กัน ดังนั้นเมื่อนำมาคำนวณก็จะได้ค่า mean ที่ใกล้เคียงกับ 0 หรือเป็นบวกเล็กน้อย หากนำมาใช้เป็นค่า cut-off จะทำให้ผลเลือดของผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นบวกไปหมดซึ่งก็คือผลบวกปลอมนั่นเอง ผู้เขียนมีความเห็นว่าการนำ % correction มาคำนวณ percentile ที่ 99 หรือคำนวณ mean+2SD ซึ่งให้ผลไม่ต่างกันมากนักน่าจะใกล้เคียงความจริงมากกว่า

อนึ่ง ปัจจุบันนี้การตรวจ LA ยังไม่สามารถทำได้ในทุกห้องปฏิบัติการในประเทศไทย การส่งต่อพลาสมาไปยังห้องปฏิบัติการหลักจึงเป็นจุดที่ควรระวังให้มาก การปั่นเลือดเพียงครั้งเดียวแล้วแช่แข็งระหว่างการส่งเช่นเดียวกับการส่งตรวจปัจจัยการแข็งตัวของเลือดทั่วไปย่อมไม่ใช่สิ่งที่ถูกต้องสำหรับการส่งตรวจ LA ในแนวทางปฏิบัติใหม่นี้ไม่มีคำแนะนำเกี่ยวกับการส่งต่อห้องปฏิบัติการ แต่ผู้เขียนแนะนำว่าห้องปฏิบัติการผู้ส่งจึงควรพิจารณาจัดการให้มีเกล็ดเลือดเหลืออยู่น้อยที่สุด หากปั่น 2 ครั้งตามที่ได้กล่าวข้างต้นได้ก็ควรปั่นก่อนที่จะแช่แข็ง หากไม่มีเครื่องปั่นความเร็วสูง การปั่นครั้งที่ 2 ให้แรงที่สุดบวกกับเวลาที่นานขึ้นก็อาจช่วยลดจำนวนเกล็ดเลือดลงได้บ้าง ในขณะเดียวกันผู้จัดส่งก็จำเป็นที่จะต้องเข้าใจในหลักการและจัดให้มีการรักษาสภาพของตัวอย่างให้เหมาะสมที่สุด การขนส่งที่ 4 °C โดยไม่แช่แข็งก็มีผลให้เกิดการกระตุ้น factor VII ได้จึงควรหลีกเลี่ยง

ตารางที่ 3 Comparison between 1995 and 2009 guidelines

	1995	2009
Patient selection	not mentioned	3 groups according to clinical characteristics
Plasma preparation	double centrifugation or 0.22μ filtration	2,000 g 15 min. and >2,500g 10 min. RT filtration not recommended
Choice of tests	at least 2 tests	only 2, to avoid false positive
Screening test	aPTT, dil. aPTT, KCT dPT (dTTI), dRVVT, SCT	only dRVVT and aPTT (silica as activator)
Mixing test	time-dependent if immediate mixing is corrected	1:1 with PNP (double centrifugation) without incubation
Confirmatory test	freezed/thawed platelets, Rabbit brain extract and Textarin/Ecarin are acceptable	freezed/thawed platelets and Textarin/Ecarin are not recommended
Cut-off points	no explanation	clearly defined for each step

เอกสารอ้างอิง

1. *Tripodi A. Testing for lupus anticoagulants: all that a clinician should know. Lupus. 2009;18:291-8.*
2. *Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. SSC Subcommittee for the Standardization of Lupus Anticoagulants. Thromb Haemost 1991;65:320-2.*
3. *Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. 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 1995;74:1185–90.*
4. *Tripodi A, Biasiolo A, Chantarangkul V, Pengo V. Lupus anticoagulant (LA) testing: performance of clinical laboratories assessed by a national survey using lyophilized affinity purified immunoglobulin with LA activity. Clin Chem 2003;49:1608-14.*
5. *Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE, Greaves M. Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) for Blood Coagulation. Thromb Haemost. 1997;77:934-7.*
6. *Favaloro EJ, Bonar R, Sioufi J, et al. Multilaboratory testing of thrombophilia: current and past practice in Australasia as assessed through the Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Program for Hematology. Semin Thromb Hemost. 2005;31:49-58.*
7. *Arnout J, Meijer P, Vermylen J. Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European Concerted Action on Thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human beta2-glycoprotein I. Thromb Haemost. 1999;81:929-34.*
8. *Pengo V, Biasiolo A, Gresele P, et al. Participating Centres of Italian Federation of Thrombosis Centres (FCSA). Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. J Thromb Haemost 2007;5:925-30.*
9. *Rosner E, Pauzner R, Lusky A, Modan M, Many A. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. Thromb Haemost 1987;57:144–7.*
10. *Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. J Thromb Haemost 2009;7:1737-40.*
11. *Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 2006;4:295–306.*