

## Uit de laboratoriumpraktijk

# Nieuwe richtlijn voor de lupus-anticoagulansbepaling: vertaling naar de praktijk

M.J.W. JANSSEN, C.T.M. HEUVELMANS, M.M.A. MELSEN en C.M.W. van ENCKEVORT

Naar aanleiding van het verschijnen van een nieuwe internationale richtlijn (Pengo et al. J Thromb Haemost 2009) voor de lupus-anticoagulans(LAC)bepaling zijn diverse LAC-reagentia (Actin® FS(L), Pathromtin® SL, LA1/LA2, dPT-Innovin®) met elkaar vergeleken welke geschikt zijn voor gebruik op de Sysmex® CA-1500 (Siemens) stollingsautomaat. De 99,0<sup>e</sup>-percentiel-afkapgrenzen werden afzonderlijk vastgesteld voor zowel de screening-, meng - als confirmatietesten met behulp van 41 gezonde donoren. Screening- en mengtesten werden uitgedrukt in de eenheden seconde en genormaliseerde ratio. Mengtesten werden daarnaast uitgedrukt in 'index of circulating anticoagulant' (ICA), en confirmatietesten werden uitgedrukt in genormaliseerde ratio en 'percentage of shortening'. Afkapgrenzen kunnen per reagens statistisch significant verschillen. De afkapgrenzen van genormaliseerde screening- en mengtesten zijn niet per definitie gelijk. Ook is de afkapgrens voor confirmatietesten indien uitgedrukt in genormaliseerde ratio niet per se 1,2. Er kan geconcludeerd worden dat afkapgrenzen te allen tijde zelf vastgesteld dienen te worden. Het percentage positieve resultaten in een geselecteerde groep van 55 patiëntenmonsters was vergelijkbaar voor alle screeningtesten en voor alle mengtesten indien uitgedrukt in seconde en/of genormaliseerde ratio. De mengtesten uitgedrukt in ICA gaven een beduidend lager percentage positieve resultaten. De resultaten van de confirmatietesten verschilden per reagens en per eenheidsvorm. Onze voorkeur voor de routine LAC-diagnostiek gaat uit naar de reagenscombinaties LA1/LA2 en Pathromtin® SL/Actin® FS, en de eenheidsvorm genormaliseerde ratio voor zowel screening-, meng - als confirmatietesten.

*Trefwoorden: afkapgrenzen; APTT; dRVVT; lupus-anticoagulans (LAC); richtlijn; Sysmex stollingsautomaat*

*VieCuri Medisch Centrum voor Noord-Limburg, Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium*

Correspondentie: dr. M.J.W. Janssen, VieCuri Medisch Centrum voor Noord-Limburg, afdeling KCHL, Tegelseweg 210, 5912 BL Venlo  
E-mail: marceljanssen@viecuri.nl

Onlangs is er een nieuwe internationale richtlijn voor de laboratoriumdetectie van lupus-anticoagulans (LAC) verschenen (1). De aanbevelingen hebben betrekking op de preanalytische fase, testkeuze, wijze van uitvoering van meng - en confirmatietesten, resultaatweergave en interpretatie. Er wordt in de nieuwe richtlijn speciale aandacht geschonken aan de wijze waarop afkapgrenzen voor screening-, meng - en confirmatietesten vastgesteld en geïnterpreteerd dienen te worden.

Naar aanleiding van het verschijnen van de nieuwe richtlijn voor de LAC-bepaling hebben we bij VieCuri Medisch Centrum de interne procedure voor deze bepaling nog eens kritisch bekeken. De preanalytische fase, het gebruik van de dRVVT-test als eerste screening- en confirmatietest, het hanteren van mengtesten en het in eigen huis vaststellen van afkapgrenzen voor de screeningtesten bleken conform de richtlijn. Echter, er bestonden ook verschillen met de richtlijn.

Ten eerste hanteerden wij de 'diluted' PT (dPT) als tweede screeningtest. Deze test wordt in de richtlijn sterk ontraden. De richtlijn adviseert gebruik te maken van een gevoelige APTT-test (lage fosfolipiden concentratie en silica als activator) als tweede screeningtest. Er bestaan twee LAC-gevoelige APTT-reagentia voor gebruik op onze stollingsautomaat Sysmex® CA-1500 (Siemens), te weten Dade Actin® FSL en Pathromtin® SL, waaraan respectievelijk elaginezuur en silica als activator toegevoegd zijn. Beide reagentia werden in deze studie onderzocht op reproduceerbaarheid en vergelijkbaarheid. Voorheen was het niet mogelijk om een confirmatietest uit te voeren bij monsters met een afwijkende dPT-test. In deze studie werd het Dade Actin® FS-reagens gebruikt als confirmatietest voor monsters met een afwijkende APTT-screeningtest (zowel Actin® FSL als Pathromtin® SL). Het Actin® FS reagens bevat een hoge concentratie fosfolipi-

Afkortingen: dPT, 'diluted' PT; dRVVT, 'diluted Russell viper venom time'; ICA, 'index of circulating anticoagulant'; LAC, lupus-anticoagulans; PS, 'percentage of shortening'; SHP, standaardhumaanplasma

den en elaginezuur als activator. Er bestaat helaas geen confirmatiereagens met hoge concentratie fosfolipiden en silica als activator beschikbaar voor gebruik op de Sysmex® stollingsautomaat.

Ten tweede drukten wij de resultaten van de screening- en mengtesten uit in seconde (s). Het advies is echter om deze resultaten te normaliseren, dat wil zeggen uit te drukken als ratio patiënt (s) t.o.v. een normale plasmapool (s). Als alternatief kan het resultaat van een mengtest ook uitgedrukt worden als 'index of circulating anticoagulant' (ICA). Idealiter zou de normale plasmapool in eigen huis bereid moeten worden, echter commerciële gelyofiliseerde of bevroren normaalplasma's zijn volgens de richtlijn ook toegestaan na validatie. Dit geldt ook voor het gebruik van een normale plasmapool om mee te mengen bij mengtesten. In deze studie werd standaardhumaanplasma (SHP) van de firma Siemens gebruikt voor beide toepassingen. Een groot voordeel van het normaliseren van resultaten is dat de afkapgrenzen daarmee onafhankelijk worden van het gebruikte lotnummer reagens. Afkapgrenzen hoeven dan slechts opnieuw vastgesteld te worden bij ingebruikname van een nieuw lotnummer SHP. In deze studie werd het gebruik van genormaliseerde afkapgrenzen vergeleken met afkapgrenzen uitgedrukt in seconden.

Ten derde drukten wij de resultaten van de confirmatietesten uit als ratio van genormaliseerde screeningtest t.o.v. genormaliseerde confirmatietest. De richtlijn adviseert echter om deze resultaten uit te drukken als 'percentage of shortening' (PS). Beide werkwijzen werden in deze studie met elkaar vergeleken.

Ten vierde en tot slot hanteerden wij voor het vaststellen van de afkapgrenzen voor de screeningtesten de 99,9<sup>e</sup>-percentiel (gemiddelde + 3,00 sd) grens berekend uit de resultaatverdeling van gezonde vrijwilligers. Deze afkapgrens gebruikten wij ook voor de mengtesten. Voor de confirmatietest gold de vaste afkapgrens 1,2 welke niet in huis vastgesteld werd. De richtlijn adviseert echter om de 99,0<sup>e</sup>-percentiel (gemiddelde + 2,33 sd) grens te gebruiken als afkapgrens welke afzonderlijk vastgesteld dient te worden voor zowel de screening-, meng- als confirmatietesten. In deze studie zijn de verschillen tussen beide percentiel grenzen niet onderzocht. Alle afkapgrenzen werden gedefinieerd als 99,0<sup>e</sup>-percentielgrenzen.

## Materialen en methoden

Preanalytische condities op patiëntenmateriaal waren conform de richtlijn. Alle testen werden uitgevoerd volgens instructies van de firma Siemens. Gebruikte controlematerialen waren 'LA Control Low' en 'Control Plasma N'. De plasmapool voor de reproduceerbaarheidsstudie werd bereid uit citraatplasma van 10 gezonde vrijwilligers en werd in porties ingevroren. De dRVVT-test werd uitgevoerd met het Siemens reagens LA1 voor screening en LA2 voor confirmatie. De dPT werd uitgevoerd met het tromboplastinereagens Dade Innovin®.

Voor het vaststellen van de afkapgrenzen werd op het priklaboratorium citraatbloed afgenomen van 41 volwassenen jonger dan 50 jaar na 'informed consent'. Er werden alleen vrijwilligers geïncludeerd die naar

het priklaboratorium waren verwezen door een huisarts, en die aangaven geen chronische ziekte te hebben en geen antistollingsmedicatie te gebruiken. De individuele plasma's werden in porties ingevroren alvorens analyse plaats kon vinden. Afkapgrenzen werden berekend met behulp van 'EP Evaluator Release 9', module Establishing Reference Intervals (David G. Rhoads Associates, Kennet Square, PA, USA). De afkapgrens werd gedefinieerd als bovengrens van het centrale 98%-interval.

Resultaten van de individuele donorplasma's werden, naast als stoltijden in seconden (s), ook uitgedrukt als:

### Screeningtest

$$\text{Genormaliseerde ratio} = \frac{\text{patiëntplasma (s)}}{\text{SHP (s)}}$$

### Mengtest

$$\text{Genormaliseerde ratio} = \frac{\text{mengplasma (s)}}{\text{SHP (s)}}$$

$$\text{ICA} = \frac{\text{mengplasma (s)} - \text{SHP (s)}}{\text{patiëntplasma (s)}} \times 100$$

### Confirmatietest

$$\text{Genorm. ratio} = \frac{\text{patiëntplasma (s)}_{\text{screening}} \times \text{SHP (s)}}{\text{SHP (s)}_{\text{screening}} \times \text{patiëntplasma (s)}_{\text{confirmatie}}}$$

$$\text{PS} = \frac{\text{patiëntplasma}_{\text{screening}} \text{ (s)} - \text{patiëntplasma}_{\text{confirmatie}} \text{ (s)}}{\text{patiëntplasma}_{\text{screening}} \text{ (s)}}$$

De patiëntenmonsters waren verkregen in het kader van de routinematige LAC-diagnostiek in ons laboratorium, en waren minder dan 1 jaar opgeslagen bij -70 °C. De verhouding tussen de aantallen geselecteerde patiëntenmonsters waarbij in het verleden de screeningtesten negatief waren een screeningtest positief was maar de meng- of confirmatietest negatief en een confirmatietest positief was, is 7:-3:-1. Deze verhouding geldt voor ons oude LAC-laboratorium-protocol met de beperkingen zoals besproken in de inleiding.

## Resultaten en discussie

*Reproduceerbaarheid Actin® FSL en Pathromtin® SL*  
De reproduceerbaarheid van de APTT-screeningtesten Actin® FSL en Pathromtin® SL werd bepaald door de stoltijden van twee commerciële controlematerialen en een poolplasma 10 dagen lang, twee runs per dag, in duplo (n=40) te meten. De berekende totale variatiecoëfficiënten zijn weergegeven in tabel 1. De reproduceerbaarheid van de APTT-screeningtesten Actin® FSL en Pathromtin® SL is goed.

### Afkapgrenzen screening- en mengtesten

De afkapgrenzen werden vastgesteld voor vier verschillende screening- en mengtesten (tabel 2). Twee

donorplasma's werden geëxcludeerd vanwege een verlengde PT. De afkapgrenzen voor de screeningstesten uitgedrukt in genormaliseerde ratio kunnen verschillen van elkaar. Statistisch niet significant verschillend ( $p < 0,05$ ) zijn de grenzen voor Actin<sup>®</sup> FSL en Pathromtin<sup>®</sup> SL, Pathromtin<sup>®</sup> SL en dPT en de grenzen voor LA1 en dPT. Idem de afkapgrenzen voor de mengtesten uitgedrukt in genormaliseerde ratio. Statistisch significant gelijk zijn de grenzen voor Actin<sup>®</sup> FSL en Pathromtin<sup>®</sup> SL, Actin<sup>®</sup> FSL en dPT en de grenzen voor LA1 en dPT. Als de afkapgrenzen uitgedrukt worden in ICA dan zijn de grenzen voor Actin<sup>®</sup> FSL en Pathromtin<sup>®</sup> SL, Actin<sup>®</sup> FSL en dPT, Pathromtin<sup>®</sup> SL en dPT en de grenzen voor LA1 en dPT significant gelijk.

Een belangrijk resultaat is dat voor elk reagens geldt dat de afkapgrens voor de screeningstest statistisch significant verschilt met de grens voor de mengtest. Dit geldt zowel voor de grenzen uitgedrukt in seconden als genormaliseerde ratio. De conclusie is dat te allen tijde afkapgrenzen voor alle reagentia zelf vastgesteld dienen te worden, zowel voor screeningstesten als voor mengtesten.

#### Afkapgrenzen confirmatietesten

De afkapgrenzen werden vastgesteld voor drie verschillende confirmatietesten (tabel 3). Indien uitgedrukt in genormaliseerde ratio zijn de grenzen voor de reagenscombinaties Actin<sup>®</sup> FSL/Actin<sup>®</sup> FS en LA1/LA2 niet significant verschillend ( $p < 0,05$ ). De waarde van deze afkapgrenzen komt overeen met de waarde 1,2 zoals deze voorheen door ons en nog steeds door vele laboratoria gebruikt wordt. Echter, de waarde van de grens voor de reagenscombinatie Pathromtin<sup>®</sup> SL/

Actin<sup>®</sup> FS komt hiermee niet overeen. Als de afkapgrenzen uitgedrukt worden in PS, dan zijn de reagenscombinaties Pathromtin<sup>®</sup> SL/Actin<sup>®</sup> FS en LA1/LA2 significant gelijk.

Een belangrijke conclusie wederom is dat voor elke reagenscombinatie te allen tijde de afkapgrenzen zelf vastgesteld dienen te worden.

#### Interpretatie van screening-, meng- en confirmatietesten

De LAC-screeningstesten werden uitgevoerd op 55 patiëntenmonsters (tabel 4). Het percentage positieve resultaten is voor alle screeningstesten nagenoeg gelijk. De eenheid waarin de screeningstesten uitgedrukt worden is hierbij niet van belang.

Van alle patiëntenmonsters met een positieve screeningstest, ongeacht gehanteerde eenheid, werd een mengtest uitgevoerd (tabel 5). Het absolute aantal onderzochte monsters (n) verschilt hierbij minimaal per categorie reagens waarbij grotendeels een overlap van monsters bestaat. Een belangrijke bevinding is dat het percentage positieve resultaten uitgedrukt in ICA beduidend lager is dan het percentage positieve resultaten uitgedrukt in seconde en/of genormaliseerde ratio. De verschillen tussen de percentages positieve resultaten per type screeningstest uitgedrukt in seconde en/of genormaliseerde ratio zijn niet groot.

Van de patiëntenmonsters met een positieve mengtest, uitgedrukt in seconde en/of genormaliseerde ratio, werd een confirmatietest uitgevoerd (tabel 6). Monsters waarbij de mengtest alleen positief was indien uitgedrukt in ICA werden geëxcludeerd. Wederom verschilt het absolute aantal onderzochte monsters (n) per categorie reagens. Het percentage positieve resultaten uit-

**Tabel 1.** Reproduceerbaarheid (n=40) van de LAC screeningstesten Actin<sup>®</sup> FSL en Pathromtin<sup>®</sup> SL

Materiaal	Actin <sup>®</sup> FSL		Pathromtin <sup>®</sup> SL	
	Gem. (s)	VC (%)	Gem. (s)	VC (%)
Control plasma N	26,9	1,1	31,2	1,4
LA control low plasmapool	41,6	1,7	41,3	1,5
	27,8	0,7	28,4	1,5

Gem. = gemiddelde

**Tabel 2.** 99,0<sup>e</sup>-percentiel afkapgrenzen (n=39) voor de LAC-screeningstesten en mengtesten

Reagens	Eenheid	Screeningstest	Mengtest
Actin <sup>®</sup> FSL	s	30,8	29,0
Actin <sup>®</sup> FSL	genorm. ratio	1,12	1,06
Actin <sup>®</sup> FSL	ICA		5,90
Pathromtin <sup>®</sup> SL	s	37,4	34,9
Pathromtin <sup>®</sup> SL	genorm. ratio	1,13	1,03
Pathromtin <sup>®</sup> SL	ICA		4,81
LA1	s	51,9	45,5
LA1	genorm. ratio	1,32	1,16
LA1	ICA		13,9
dPT	s	61,4	55,2
dPT	genorm. ratio	1,22	1,10
dPT	ICA		9,93

ICA: 'index of circulating anticoagulant'

**Tabel 3.** 99,0<sup>e</sup>-percentielafkapgrenzen (n=39) voor de LAC confirmatietesten

Reagentia	Eenheid	Confirmatietest
Actin <sup>®</sup> FSL/Actin <sup>®</sup> FS	genorm. ratio	1,23
Actin <sup>®</sup> FSL/Actin <sup>®</sup> FS	PS	18,3
Pathromtin <sup>®</sup> SL/Actin <sup>®</sup> FS	genorm. ratio	1,13
Pathromtin <sup>®</sup> SL/Actin <sup>®</sup> FS	PS	28,3
LA1/LA2	genorm. ratio	1,22
LA1/LA2	PS	27,6

PS: 'percentage of shortening'

**Tabel 4.** Resultaten van de LAC-screeningstesten uitgevoerd op patiëntenmonsters (n=55)

Reagens	Eenheid	Negatief (%)	Positief (%)
Actin <sup>®</sup> FSL	s	75	25
Actin <sup>®</sup> FSL	genorm. ratio	75	25
Pathromtin <sup>®</sup> SL	s	69	31
Pathromtin <sup>®</sup> SL	genorm. ratio	73	27
LA1	s	69	31
LA1	genorm. ratio	75	25
dPT	s	64	36
dPT	genorm. ratio	67	33

gedrukt in genormaliseerde ratio is lager dan het percentage positieve resultaten uitgedrukt in PS. Dit geldt voor alle reagentia. Het percentage positieve resultaten is voor de reagenscombinatie Actin® FSL/Actin® FS lager dan voor de andere reagenscombinaties.

## Conclusie

In deze studie kunnen geen uitspraken gedaan worden over juistheid vanwege het ontbreken van klinisch goed gedefinieerde patiëntenmonsters en vanwege het gebrek aan standaardisatie van LAC-testen. Echter, minstens net zo interessant, is de onderlinge vergelijkbaarheid van de LAC-testen. De dPT-test wordt in de richtlijn ontraden. Als screening- en mengtest presenteert de dPT test echter vergelijkbaar met de andere dRVVT- en LAC-gevoelige APTT-testen. Een onoverkomelijk nadeel van de dPT-test is het ontbreken van een confirmatietest. Ter vervanging van de dPT test werden de LAC-gevoelige APTT testen Actin® FSL en Pathromtin® SL onderzocht. De reproduceerbaarheid van beide testen is goed. Gezien het hogere percentage positieve resultaten in de confirmatietest en omdat de richtlijn silica als activator adviseert, hebben wij gekozen voor het Pathromtin® SL-reagens.

Er kunnen statistisch significante verschillen in af-

**Tabel 5.** Resultaten van de LAC-mengtesten uitgevoerd op patiëntenmonsters welke eerder (zie tabel 4) positief bevonden werden met de screeningtest ongeacht gehanteerde eenheid

Reagens	Eenheid	Negatief (%)	Positief (%)
Actin® FSL	s	43	57
Actin® FSL	genorm. ratio	43	57
Actin® FSL	ICA	71	29
Pathromtin® SL	s	29	71
Pathromtin® SL	genorm. ratio	35	65
Pathromtin® SL	ICA	71	29
LA1	s	19	81
LA1	genorm. ratio	56	44
LA1	ICA	75	25
dPT	s	17	83
dPT	genorm. ratio	33	67
dPT	ICA	44	56

ICA: 'index of circulating anticoagulant'

**Tabel 6.** Resultaten van de LAC-confirmatietesten uitgevoerd op patiëntenmonsters welke eerder (zie tabel 5) positief bevonden werden met de mengtest uitgedrukt in seconde en/of genormaliseerde ratio.

Reagens	Eenheid	Negatief (%)	Positief (%)
Actin® FSL/Actin® FS	genorm. ratio	100	0
Actin® FSL/Actin® FS	PS	50	50
Pathromtin® SL/Actin® FS	genorm. ratio	64	36
Pathromtin® SL/Actin® FS	PS	27	73
LA1/LA2	genorm. ratio	43	57
LA1/LA2	PS	0	100

PS: 'percentage of shortening'

kapgrenzen, uitgedrukt in genormaliseerde ratio, per reagens bestaan. Tevens kunnen de afkapgrenzen van screening - en mengtesten onderling significant verschillen. De afkapgrens voor de confirmatietest uitgedrukt in genormaliseerde ratio is niet per definitie gelijk aan 1,2. De conclusie is dat afkapgrenzen te allen tijden zelf vastgesteld dienen te worden. De diverse eenheden waarin screening-, meng - en confirmatietesten uitgedrukt kunnen worden zijn in deze studie met elkaar vergeleken. Er worden met name verschillen gezien bij de meng - en confirmatietesten. Een opvallende bevinding bij de mengtest is dat het percentage positieve resultaten uitgedrukt in ICA beduidend lager is dan het percentage positieve resultaten uitgedrukt in seconde en/of genormaliseerde ratio. De verschillen tussen de overige eenheden zijn minder groot. Wij hebben gekozen om de resultaten van zowel screening-, meng - als confirmatietesten uit te drukken in genormaliseerde ratio. Een groot logistiek voordeel hierbij is dat afkapgrenzen dan onafhankelijk zijn van het gebruikte lotnummer reagens.

## Referenties

1. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de Groot PG. Update of the guidelines for lupus-anticoagulant detection - Official communication of the SSC. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 1737-40.

## Summary

*Janssen MJW, Heuvelmans CTM, Melssen MMA, van Enckevort CMW. New guidelines for Lupus Anticoagulans detection: practical applications. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 2-5.*

Various reagents (Actin® FS(L), Pathromtin® SL, LA1/LA2, dPT-Innovin®) for the detection of lupus-anticoagulant (LAC) on the Sysmex® CA-1500 coagulation analyser (Siemens) were compared. Reason for this comparison was the recently published update of the guidelines for LAC detection (Pengo et al. *J Thromb Haemost* 2009). The 99.0<sup>e</sup> percentile cut-off values were established separately for the screening, mixing as well as the confirmation tests from the result distributions of 41 healthy donors. Screening and mixing tests were expressed as seconds and normalised ratios. Mixing tests were also expressed as 'index of circulating anticoagulant' (ICA). Confirmation tests were expressed as normalised ratio and 'percentage of shortening'.

Statistically significant differences can exist between the cut-off values for the various reagents. The cut-off values for normalised screening and mixing tests are not equal per definition. Also the cut-off value for confirmation tests expressed in normalised ratio is not 1.2 per se. It can be concluded that cut-off values in any case have to be determined in-house. The percentage of positive results in a selected group of 55 patient samples was similar for all screening tests and for all mixing tests expressed in seconds and/or normalised ratios. This percentage was considerably lower for the mixing tests when expressed in ICA. The results of the confirmation tests were different between the various reagents and expression units. For routine LAC detection, we prefer to use the reagent combinations LA1/LA2 en Pathromtin® SL/Actin® FS and to express results in normalised ratios for screening, mixing as well as confirmation tests.

*Keywords: APTT; cut-off values; dRVVT; guidelines; lupus-anticoagulant (LAC); Sysmex coagulation analyser*