

บทความพิเศษ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหา lupus แอนติโคแอกกูแลนท์

(Laboratory Detection of Lupus Anticoagulant)

ดลภาค อภิวงศ์รัตน์¹ และ พรณา โปลิศ²

¹หน่วยโลหิตวิทยา กองอายุรกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ²สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

บทนำ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหา lupus แอนติโคแอกกูแลนท์ (lupus anticoagulants หรือ LA) ในพลาสมา เป็นการตรวจที่สำคัญสำหรับการวินิจฉัยกลุ่มอาการแอนติฟอสโฟลิปิด (antiphospholipid syndrome หรือ APS) ซึ่งเป็นโรคภูมิคุ้มกันตนเองที่พบได้ไม่บ่อย อุบัติการณ์โดยเฉลี่ยของ APS เท่ากับ 5 คนต่อประชากรแสนคน ต่อปี และความชุก เท่ากับ 40-50 คนต่อประชากรแสนคน¹ สาเหตุของกลุ่มอาการ APS ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าร่างกายของผู้ป่วยจะสร้างแอนติบอดีต่อสารฟอสโฟลิปิด (antiphospholipid antibody หรือ aPL) ประกอบด้วย แอนติคาดีโอไลปิน (anticardiolipin หรือ aCL) แอนติเบต้าทู ไกลโคโปรตีนวัน (anti- β_2 -glycoprotein I หรือ a β_2 -GPI) และ LA ซึ่งแอนติบอดีดังกล่าวเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตัน (thrombosis) ทั้งในหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดง รวมถึงหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงรกในขณะตั้งครรภ์ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแท้งซ้ำ ๆ ในผู้ป่วย²⁻³

LA เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ค่าการทดสอบการแข็งตัวของเลือดยาวผิดปกติ (prolonged clotting time) โดยเฉพาะในการตรวจ activated partial thromboplastin time (APTT) และไม่สามารถแก้ไขให้กลับมาสั้นลง (correct) ด้วยการผสมกับพลาสมาของคนปกติในการตรวจ mixing test ได้⁴⁻⁶ ปัจจุบันการตรวจ LA ใช้หลักการวัดการแข็งตัวของเลือด (clotting based assays) โดยอาศัยการยับยั้งสารฟอสโฟลิปิดที่มีอยู่ในน้ำยาทดสอบและวัดผลโดยการวัดค่าการแข็งตัวของเลือด ซึ่งหากในพลาสมามี LA อยู่จะทำให้ค่าการทดสอบการแข็งตัวของเลือดยาวผิดปกติ⁷⁻⁸ อย่างไรก็ตามการตรวจหา LA นั้นมีขั้นตอนที่ยากและซับซ้อน อีกทั้ง LA เป็นกลุ่มของแอนติบอดีที่มีความหลากหลายสูงและให้ผลบวกที่ไม่จำเพาะต่อการตรวจชนิดใดชนิดหนึ่ง⁹ ดังนั้นจนถึงปัจจุบันจึงยังไม่มีวิธีการตรวจใดที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูงพอที่จะใช้ในการตรวจหา LA ได้เพียงวิธีเดียว

และยังไม่มีวิธีใดที่เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) จึงต้องอาศัยการตรวจวัดการแข็งตัวของเลือดอย่างน้อย 2 การทดสอบซึ่งวัดปฏิกิริยาในกลไกการแข็งตัวของเลือด (coagulation pathway) ที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของการตรวจและการแปลผลในแต่ละห้องปฏิบัติการ อีกทั้งแนวทางปฏิบัติ (guideline) ในการตรวจ LA ในปัจจุบันมีหลายแนวทางปฏิบัติ การเลือกใช้แนวทางปฏิบัติใด ๆ จะส่งผลต่อทั้งความไวและความจำเพาะในการตรวจ และการแปลผล LA ที่แตกต่างกัน ในบทความนี้จะกล่าวในแง่ของการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง หลักการและขั้นตอนที่ใช้ในการตรวจ แนวทางปฏิบัติต่าง ๆ ในการตรวจ หลักการในการแปลผล ตลอดจนปัจจัยรบกวนการทดสอบในการตรวจหา LA

การตรวจ LA ในห้องปฏิบัติการ

การตรวจ LA ในพลาสมาเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจที่สำคัญร่วมกับการตรวจ aCL และ a β_2 -GPI เพื่อวินิจฉัยภาวะ APS ในผู้ป่วย ตามหลักเกณฑ์การวินิจฉัยฉบับปรับปรุงปี ค.ศ. 2006¹⁰ ผู้ป่วย APS อาจให้ผลบวกต่อแอนติบอดีชนิดใดชนิดหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน¹¹⁻¹³ การตรวจ LA นับเป็นการทดสอบที่มีความยุ่งยากซับซ้อนและถูกรบกวนจากหลายปัจจัย ต่างจากการตรวจ aCL และ a β_2 -GPI ที่ตรวจด้วยวิธี enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูง และถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาแอนติบอดี ดังนั้นผู้ทำการทดสอบควรมีความเข้าใจในหลักการตรวจและการแปลผล ปัจจัยที่อาจรบกวนการทดสอบ ตลอดจนข้อพึงระวังในการส่งตรวจ ทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดผลบวกปลอม (false positive) และผลลบปลอม (false negative) ทำให้ค่าการทดสอบมีความถูกต้องแม่นยำ เป็นผลดีต่อการวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วย

การเตรียมตัวอย่าง

สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการตรวจหา LA คือ เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำ โดยใช้ 3.2% sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็ง ในอัตราส่วนเลือดต่อสารกันเลือดแข็ง เท่ากับ 9 : 1 การปั่นเก็บพลาสมาผู้ป่วย ห้องปฏิบัติการควรทำการปั่น 2 ครั้ง (double centrifugation) โดยปั่นด้วยความเร็วอย่างน้อย 2,000 g นาน 10 นาที ในครั้งแรก แล้วจึงดูดส่วนพลาสมาปั่นครั้งที่ 2 ด้วยความเร็วอย่างน้อย 2,500 g นาน 15 นาที เพื่อลดปริมาณของเกล็ดเลือดในพลาสมาลงให้มากที่สุด เนื่องจากเกล็ดเลือดเป็นแหล่งของฟอสโฟลิปิดที่สำคัญ ซึ่งสามารถทำให้เกิดผลลบปลอมได้ ไม่แนะนำให้ใช้การกรองพลาสมาด้วยตัวกรอง (filter) เนื่องจากสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และพบว่าทำให้สูญเสียปัจจัยการแข็งตัวของเลือดบางชนิดไป ในกรณีที่ไม่สามารถทำการทดสอบได้ทันทีควรเก็บพลาสมาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C และทำละลายที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที แล้วจึงคว่ำหลอดไปมา (inverse mix) ให้พลาสมาเป็นเนื้อเดียวกันก่อนทำการทดสอบ¹⁴

หลักการที่ใช้ในการตรวจ

การตรวจ LA โดยใช้หลักการตรวจวัดการแข็งตัวของเลือด ประกอบด้วย การทดสอบซึ่งวัดปฏิกิริยาในกลไกการแข็งตัวของเลือดที่แตกต่างกัน¹⁵⁻²⁴ ได้แก่

1. Diluted Russell's viper venom clotting time (DRVVT) เป็นการทดสอบการแข็งตัวของเลือดในส่วน common pathway โดยใช้พิษของงูแมวเซา (Russell's viper) ในการกระตุ้นแฟกเตอร์ X (factor X, FX) ให้อยู่ในรูปที่ถูกกระตุ้น (FXa) จากนั้น FXa จะรวมตัวกับแฟกเตอร์ Va (factor Va, FVa), แฟกเตอร์ VIIa (factor VIIa, FVIIa) และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เป็นสารประกอบเชิงซ้อน เรียกว่า prothrombinase complex ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวจะอาศัยฟอสโฟลิปิดเข้าร่วมปฏิกิริยาดังนั้นหากมี LA ในพลาสมา จะทำให้ค่าการแข็งตัวของเลือดในการตรวจ DRVVT ยาวผิดปกติ เนื่องจาก LA จะทำปฏิกิริยากับฟอสโฟลิปิดในน้ำยาทดสอบ ทำให้ไม่เหลือฟอสโฟลิปิดเข้าร่วมในปฏิกิริยา การตรวจ DRVVT ถือเป็นการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะต่อ LA สูง¹⁵⁻¹⁸

2. Activated partial thromboplastin time (APTT) เป็นการทดสอบการแข็งตัวของเลือด ผ่าน intrinsic pathway โดยอาศัยฟอสโฟลิปิดเข้าร่วมปฏิกิริยาดังนั้นหากมี LA ใน

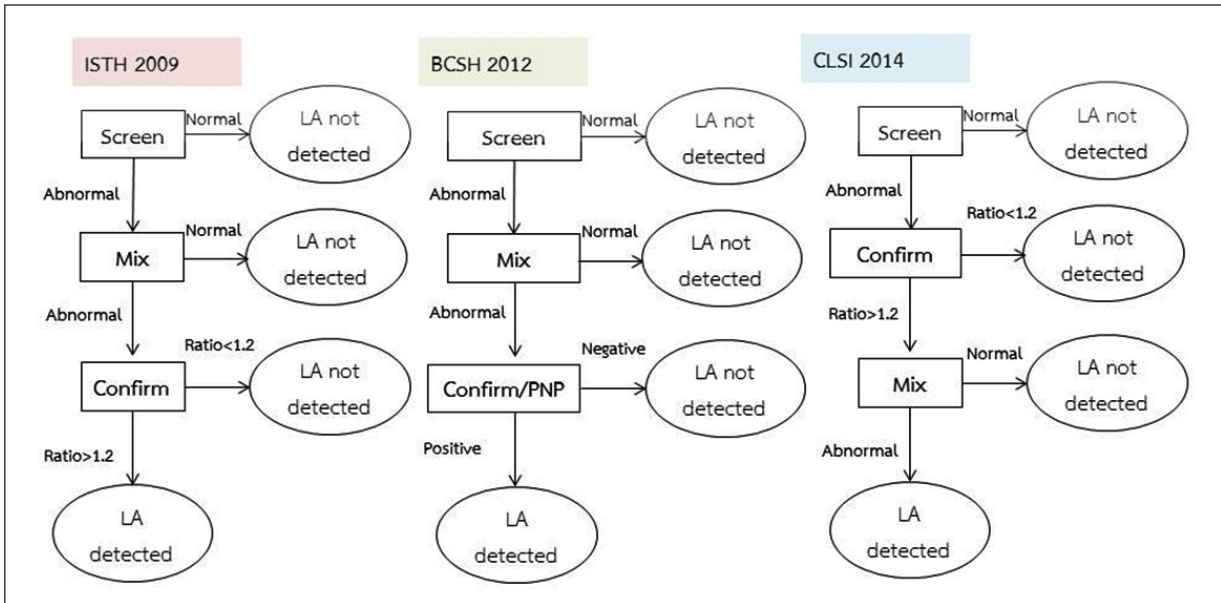
พลาสมา จะทำให้ค่าการแข็งตัวของเลือดในการตรวจ APTT ยาวผิดปกติ ทั้งนี้ความไวของการทดสอบ APTT ในการตรวจหา LA ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำยา ตัวกระตุ้นในน้ำยา และชนิดของฟอสโฟลิปิดที่ใช้ในน้ำยานั้น ๆ¹⁸⁻¹⁹ อย่างไรก็ตามน้ำยา APTT ที่ใช้ในการตรวจคัดกรอง LA ไม่ควรนำมาใช้ร่วมกับการตรวจในงานประจำวัน

3. Kaolin clotting time (KCT) เป็นการทดสอบการแข็งตัวของเลือดใน intrinsic pathway โดยใช้แป้งคาโอลิน (kaolin) ซึ่งมีประจุลบบนผิว สามารถกระตุ้นแฟกเตอร์ XII (factor XII, FXII), prekallikrein และ high molecular weight kininogen (HMWK) ทำให้เกิดก้อนลิ่มเลือด (clot) โดยปราศจากฟอสโฟลิปิดในระบบ แต่อาศัยฟอสโฟลิปิดที่มีในพลาสมาของผู้ป่วยเท่านั้น ดังนั้นหากฟอสโฟลิปิดของผู้ป่วยถูกทำลายโดย LA จะทำให้ค่าการแข็งตัวของเลือดในการตรวจ KCT ยาวผิดปกติ²⁰⁻²²

4. Silica clotting time (SCT) เป็นการทดสอบการแข็งตัวของเลือดใน intrinsic pathway เช่นเดียวกับ APTT โดยใช้ซิลิกา (silica) เป็นตัวกระตุ้น เป็นการตรวจที่มีความไวต่อ LA สูง²³ โดยน้ำยาที่ใช้สำหรับการตรวจคัดกรองและการตรวจเพื่อยืนยัน LA จะมีปริมาณของฟอสโฟลิปิดที่ต่างกัน

5. Tissue thromboplastin inhibition time (TTIT) เป็นการทดสอบการแข็งตัวของเลือดใน intrinsic pathway เพื่อตรวจหา LA โดยดูจากการยับยั้งฟอสโฟลิปิดปริมาณน้อยที่มีในน้ำยาทดสอบ prothrombin time (PT) โดยทำการเจือจางน้ำยา thromboplastin ในอัตราส่วน 1 : 100 และ 1 : 1,000 แล้วนำมาทดสอบเพื่อหา ค่าการแข็งตัวของเลือดในผู้ป่วย จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาหารด้วยค่าเฉลี่ยของคนปกติเพื่อหาค่าสัดส่วน (ratio) ซึ่งการทดสอบจะให้ผลบวกต่อ LA เมื่อค่า ratio มากกว่าหรือเท่ากับ 1.3 โดยพบว่าการทดสอบนี้มีความไวและความจำเพาะต่อ LA ค่อนข้างต่ำ และไม่สามารถแยกกับผู้ป่วยที่มีสารต้านปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (specific factor inhibitor) ได้²⁴

ทั้งนี้การเลือกว่าจะใช้การทดสอบใดควรยึดตามแนวทางปฏิบัติที่ใช้ในการตรวจ โดยทั่วไปแนะนำให้ใช้ DRVVT เป็นการทดสอบหลัก ร่วมกับการทดสอบอื่น ๆ ซึ่งวัดปฏิกิริยาในกลไกการแข็งตัวของเลือดที่ต่างกัน และไม่ควรเลือกการทดสอบที่วัดปฏิกิริยาในกลไกการแข็งตัวของเลือดเดียวกันมาใช้ร่วมกันในการตรวจ เช่น หากเลือกใช้ APTT เป็นการทดสอบหลัก อีกการทดสอบไม่ควรใช้ KCT หรือ SCT เป็นต้น อย่างไรก็ตามควรเลือกใช้เพียง 2 การทดสอบ เนื่องจากการใช้จำนวนการทดสอบที่มากขึ้น จะทำให้เกิดผลบวกปลอมมากขึ้นด้วยเช่นกัน



รูปที่ 1 ลำดับขั้นตอนการตรวจหา lupus anticoagulant ในแต่ละแนวทางปฏิบัติ

ขั้นตอนการตรวจ

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ การตรวจคัดกรอง (LA screening test), การตรวจยืนยัน (LA confirmatory test) และการตรวจ mixing test สำหรับ LA (LA mixing test) ซึ่งลำดับขั้นตอนการทดสอบจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแนวทางปฏิบัติที่แต่ละห้องปฏิบัติการเลือกใช้²⁵ (รูปที่ 1) โดยแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

1. LA screening test น้ำยาของแต่ละหลักการที่นำมาทดสอบจะต้องเป็นน้ำยาที่มีปริมาณของ ฟอสโฟลิปิดต่ำ (low-phospholipids reagent) เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจหา LA ในพลาสมาของผู้ป่วย โดย LA จะไปทำลายฟอสโฟลิปิดปริมาณน้อยในน้ำยาและทำให้ค่าการแข็งตัวของเลือดยาวผิดปกติ เนื่องจากไม่มีฟอสโฟลิปิดเข้าร่วมในปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด

2. LA confirmatory test ควรทำเมื่อให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง โดยแต่ละหลักการจะใช้น้ำยาที่มีปริมาณของฟอสโฟลิปิดสูง (high-phospholipids reagent) เพื่อทำปฏิกิริยากับ LA ที่มีอยู่ในพลาสมาของผู้ป่วยจนหมด จากนั้นฟอสโฟลิปิดที่เหลือจะเข้าร่วมในปฏิกิริยาการแข็งตัวของพลาสมา ทำให้ค่า การแข็งตัวของเลือดของผู้ป่วยกลับมามีค่าน้อยลง เมื่อเทียบกับค่าการแข็งตัวของเลือดในการตรวจคัดกรอง โดยอาจแปลผลจากค่าสัดส่วน LA ratio ซึ่งคำนวณจากสูตร

$$LA \text{ ratio} =$$

[ค่าการแข็งตัวของเลือดในการตรวจคัดกรอง (clotting time of screening test)]

[ค่าการแข็งตัวของเลือดในการตรวจยืนยัน (clotting time of confirmatory test)]

แต่ละห้องปฏิบัติการควรทำการทดสอบเพื่อหาค่าจุดตัดในการวินิจฉัย (cut-off) ซึ่งโดยทั่วไปหาได้จากการทำการทดสอบกับพลาสมาคนปกติอย่างน้อย 30 ราย และใช้ค่า LA ratio ที่ percentile ที่ 97.5 หรือ 99.0 เป็นค่า cut-off โดยนอกจากนี้การหาค่า normalized ratio ในแต่ละขั้นตอนโดยนำค่าการแข็งตัวของเลือดของผู้ป่วยที่ตรวจได้มาหารด้วยค่าเฉลี่ยของการทดสอบในคนปกติ ก่อนนำมาหา LA ratio และเทียบกับ cut-off จะช่วยเพิ่มความจำเพาะในการทดสอบได้²⁵

3. LA mixing test เป็นการตรวจโดยใช้การผสมพลาสมาของผู้ป่วยกับพลาสมาของคนปกติ (normal pooled plasma; NP) ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำพลาสมาผสมนั้นไปทำการทดสอบหา LA ซึ่งหากในพลาสมาของผู้ป่วยมี LA อยู่ ค่าการทดสอบการแข็งตัวของเลือดในพลาสมาผสมจะยังคงผิดปกติ กล่าวได้ว่าพลาสมาคนปกติที่นำมาผสมไม่สามารถแก้ไขค่าการแข็งตัวของเลือดของผู้ป่วยให้สั้นลงหรือกลับมาปกติได้ ขั้นตอนนี้ถือเป็นการทดสอบที่สำคัญเพื่อพิสูจน์ว่าพลาสมาของผู้ป่วยดังกล่าวมี LA อยู่จริง หรือค่าที่ผิดปกตินั้นเกิดจากการถูกรบกวนโดยสารต้านต่อระบบการแข็งตัวของเลือด (inhibitor) การรบกวนจากการรักษาด้วยยาต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant therapy) หรือเป็นพลาสมาของผู้ป่วยที่ขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (factor deficiency) หรือไม่ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ อาจทำให้การแปลผลการทดสอบ LA ผิดพลาดได้ โดยในกรณีที่พลาสมาของผู้ป่วยที่ขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด หรือพลาสมาที่มีการรบกวนจากการรักษาด้วยยาต้าน

การแข็งตัวของเลือด ค่าการทดสอบของพลาสมาผสมจะสั้นลงหรือกลับมากปกติได้ โดยแต่ละห้องปฏิบัติการควรหาค่าจุดตัดจำเพาะ (specific cut-off) ของการทำ mixing test ด้วยตัวเอง สำหรับใช้ในการแปลผล²⁶

อย่างไรก็ตามควรมีการควบคุมคุณภาพของพลาสมาของคนปกติที่นำมาใช้ในการทดสอบ mixing test โดยในขั้นตอนการเตรียม NP ควรทำการปั่นแยกพลาสมาด้วยการปั่นซ้ำ 2 ครั้ง เช่นเดียวกับพลาสมาผู้ป่วย การเก็บรักษาควรเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C และขั้นตอนทำการทดสอบควรทำหลอดควบคุม โดยผสม NP กับสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น Owren's veronal buffer หรือ normal saline ในอัตราส่วน 1 : 1 ร่วมด้วยทุกครั้ง โดยค่าการแข็งตัวของเลือดในหลอดควบคุมไม่ควรยาวกว่าช่วงปกติของการทดสอบ

แนวทางปฏิบัติในการตรวจ

ปัจจุบันมีหลายแนวทางปฏิบัติ ได้แก่ International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) ในปี ค.ศ. 2009, British Committee for Standard in Hematology (BCSH) ในปี ค.ศ. 2012 และ The Clinical and Laboratory Standard

Institute (CLSI) ในปี ค.ศ. 2014 โดยแต่ละแนวทางปฏิบัติมีความแตกต่างกันนับตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง หลักการตรวจ ขั้นตอนที่ใช้ตรวจ ชนิดของน้ำยาที่ใช้ตรวจ และหลักการในการแปลผล (ตารางที่ 1) ซึ่งการเลือกใช้แต่ละแนวทางปฏิบัติจะส่งผลต่อความไวและความจำเพาะในการตรวจ รวมถึงการแปลผล LA ที่แตกต่างกัน²⁷⁻²⁹

จากการศึกษาของ Gary W. Moore และคณะในปี 2017²⁵ พบว่าการใช้แนวทางการตรวจ LA ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ขั้นตอนการตรวจ screening test, mixing test และ confirmatory test ตามลำดับ (ตามแนวทางปฏิบัติ ISTH 2009 และ BCSH 2012) จะให้ผลลบปลอมในขั้นตอน mixing test ค่อนข้างมาก ทำให้ไม่สามารถตรวจพบในผู้ป่วยที่มีปริมาณของ LA ในพลาสมาต่ำ ๆ ได้ พบว่าเมื่อปรับเปลี่ยนลำดับขั้นตอนในการตรวจ LA เป็น screening test, confirmatory test และ mixing test ตามลำดับ (ตามแนวทางปฏิบัติ CLSI 2014) สามารถลดการเกิดผลลบปลอมในการตรวจได้อย่างมาก นอกจากนี้การคำนวณ normalized ratio สำหรับการแปลผลสามารถช่วยเพิ่มโอกาสการตรวจพบ LA ผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวได้มากขึ้น

ตารางที่ 1 แนวทางปฏิบัติและคำแนะนำในการตรวจหา lupus anticoagulant

ข้อพิจารณา	แนวทางปฏิบัติ		
	ISTH 2009	BCSH 2012	CLSI 2014
การเตรียมตัวอย่างทดสอบ	เตรียมพลาสมาโดยการปั่นแยก 2 ครั้ง (Double centrifugation)		
หลักการที่ใช้	DRVVT และ APTT	DRVVT ร่วมกับ APTT หรือหลักการอื่น ๆ	DRVVT และ APTT และ/หรือหลักการอื่น ๆ
ขั้นตอนการตรวจ	Screen-mix-confirm	Screen-mix-confirm	Screen-confirm -mix
การหาค่าส่วนปกติ (normalized ratio)	หารด้วยค่าของคนปกติในแต่ละรอบการทดสอบ	หารด้วยค่าของคนปกติในแต่ละรอบการทดสอบ	หารด้วยค่ากลางของช่วงอ้างอิง
การหาจุดตัด (cut-off)	99 th percentile	97.5 th percentile	97.5 th percentile
การคำนวณ LA ratio โดยอาศัยปริมาณฟอสโฟลิปิดที่แตกต่างกัน	ค่าการแข็งตัวของเลือดในขั้นตอน screen หารด้วย confirm	ค่าการแข็งตัวของเลือดในขั้นตอน screen หารด้วย confirm	ค่าการแข็งตัวของเลือดในขั้นตอน screen หารด้วย confirm
Mixing test	ผสมด้วย NP สัดส่วน 1 : 1 แปลผลด้วย ICA หรือใช้จุดตัดที่จำเพาะ	ผสมด้วย NP สัดส่วน 1 : 1	ผสมด้วย NP สัดส่วน 1 : 1 แปลผลด้วย ICA หรือใช้จุดตัดที่จำเพาะ
การแปลผล LA ในใบรายงานผล	แนะนำ	แนะนำ	แนะนำ

APTT, Activated partial thromboplastin time; BCSH, British committee for standard in hematology; CLSI, The clinical and laboratory standard institute; DRVVT, Diluted russell's viper venom clotting time; ICA, Index of circulating anticoagulants; ISTH, International society of thrombosis and hemostasis; NP, normal pooled plasma

ตารางที่ 2 การแปลผลการตรวจ lupus anticoagulant

ขั้นตอนการตรวจ			Mixing test	การแปลผล
Screening	Confirmatory	LA Ratio เทียบกับ cut-off		
ปกติ	ไม่ทำการทดสอบ	ไม่ทำการทดสอบ	ไม่ทำการทดสอบ	ตรวจไม่พบ LA
ผิดปกติ	ปกติ	มากกว่า	แก้ไขไม่ได้	ตรวจพบ LA
ผิดปกติ	ผิดปกติ	มากกว่า	แก้ไขไม่ได้	ตรวจพบ LA (ซึ่งอาจมีปริมาณสูงมาก)
ผิดปกติ	ผิดปกติ	น้อยกว่า*	แก้ไขได้	ตรวจไม่พบ LA แต่ค่าผิดปกติดังกล่าวอาจเกิดจากการขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด หรือถูกรบกวนจากยาต้านการแข็งตัวของเลือด
ผิดปกติ	ผิดปกติ	น้อยกว่า*	แก้ไขไม่ได้	ตรวจไม่พบ LA แต่ค่าผิดปกติดังกล่าวอาจเกิดจากการการมีสารต้านปัจจัยการแข็งตัวของเลือด หรือถูกรบกวนจากยาต้านการแข็งตัวของเลือด

LA, lupus anticoagulant

*ในกรณีที่ผลการตรวจ screening test และ confirmatory test ให้ผลผิดปกติ แต่ค่า LA ratio น้อยกว่าค่า cut-off ควรทำการตรวจ mixing test เพื่อหาสาเหตุของความผิดปกติ

การแปลผล

การแปลผล LA ขึ้นอยู่กับแนวทางปฏิบัติที่ห้องปฏิบัติการเลือกใช้ โดยทั่วไปเมื่อให้ผลบวกต่อการทดสอบหลักการใดหลักการหนึ่งจะถือว่าให้ผลบวกต่อ LA ทั้งนี้ต้องแปลผลร่วมกันทั้ง screening, confirmatory และ mixing test ดังตัวอย่างการแปลผลในตารางที่ 2

ปัจจัยรบกวนการทดสอบ

เนื่องจากการตรวจ LA เป็นการทดสอบที่ใช้หลักการการตรวจวัดการแข็งตัวของเลือดซึ่งถูกรบกวนได้จากหลายปัจจัย และมีผลอย่างมากต่อการแปลผลการทดสอบ ดังนั้นก่อนทำการทดสอบควรคำนึงถึงปัจจัยดังต่อไปนี้

1. **ปัจจัยจากการเตรียมสิ่งส่งตรวจ** ตั้งแต่การเจาะเก็บเลือด สัตว์ส่วนของเลือดและสารกันเลือดแข็ง การนำส่งห้องปฏิบัติการ การปั่นแยกพลาสมา ควรปฏิบัติตามขั้นตอนอย่างเคร่งครัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปั่นแยกพลาสมาควรปั่นด้วยวิธีปั่นซ้ำ 2 ครั้งเสมอเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลลบลอย นอกจานี้ควรสังเกตสีของพลาสมาว่ามีการแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis), มีสีเหลืองมากผิดปกติ (icteric plasma) หรือพลาสมาขุ่นมีไขมัน (lipemic plasma) หรือไม่ เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้สามารถรบกวนการวัดการดูดกลืนของแสงด้วยเครื่องอัตโนมัติได้

2. ผลการรักษาด้วยยาต้านการแข็งตัวของเลือด

Warfarin ซึ่งเป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือดที่นิยมใช้

มานาน พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับยา warfarin เป็นเวลานาน จะมีผลรบกวนการทดสอบ DRVVT ส่วนการทดสอบ APTT อาจมีค่าการแข็งตัวของเลือดปกติหรือยาวขึ้นเล็กน้อย ในการตรวจ mixing test สามารถแก้ไขค่าการแข็งตัวของเลือดให้กลับมามาปกติได้ อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษารายงานว่า warfarin ไม่มีผลกระทบต่อการตรวจ LA³¹

Unfractionated heparin (UFH) หรือ low molecular weight heparin (LMWH) พบว่า ทำให้เกิดผลลบลอยในการทดสอบ LA ทั้ง screening และ confirm สำหรับการตรวจ mixing test อาจแก้ไขค่าให้กลับมาสั้นลงหรือได้ก็ได้ แต่ผู้ป่วยที่ได้รับยาสามารถแยกกับผู้ป่วย APS ได้จากการตรวจ thrombin time (TT) และ reptilase time (RT) หากมีความจำเป็นต้องตรวจ LA ในผู้ป่วยที่ได้รับ heparin ควรเลือกใช้ยาที่มี heparin neutralizers³²

Fondaparinux สามารถรบกวนการทดสอบทั้ง APTT และ DRVVT ผลของยาจะสัมพันธ์กับเวลาที่ผู้ป่วยได้รับยา³³ ดังนั้นหากมีความจำเป็นต้องตรวจ LA ในผู้ป่วย ควรตรวจก่อนได้รับยาครั้งถัดไป (trough level)

Direct oral anticoagulants (DOACs) เป็นยาที่มีความจำเพาะในการออกฤทธิ์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่มีผลยับยั้ง FXa ได้แก่ rivaroxaban, apixaban และ edoxaban และกลุ่มที่มีผลยับยั้ง FIIa (direct thrombin inhibitors, DTI) ได้แก่ dabigatran ซึ่งพบว่าสามารถทำให้เกิดผลลบลอยในการทดสอบ LA โดย

มีผลรบกวนการทดสอบ DRVVT ทำให้ค่าการแข็งตัวของเลือดยาวออกมาก³⁴ มีรายงานว่าผู้ป่วยที่ได้รับยาในกลุ่ม DOACs แม้จะมีระดับของยาในพลาสมาต่ำกว่าค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (lower limit of detection) ก็สามารถรบกวนการตรวจ LA ได้³⁵ หากมีความจำเป็นต้องตรวจ LA ในผู้ป่วยที่ได้รับยาในกลุ่ม DOACs ควรเจาะหลังให้ยาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง³⁵⁻³⁶ และระมัดระวังเรื่องการแปลผล

ผู้ป่วยที่ขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด จะมีค่าการแข็งตัวของเลือดยาวกว่าปกติ ซึ่งรบกวนการตรวจวัดด้วยหลักการการตรวจวัดการแข็งตัวของเลือด และให้ผลบวกปลอมกับการตรวจ LA แต่สามารถแก้ไขค่าให้กลับมาสั้นลงได้ในขั้นตอนการตรวจ mixing test ดังนั้นหากทำการทดสอบแล้วให้ผลบวกต่อ LA และสามารถแก้ไขค่าให้กลับมาสั้นลงใน mixing test ควรยืนยันด้วยการตรวจวัดระดับปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (factor assays) ในผู้ป่วยร่วมด้วย เพื่อหาสาเหตุของความผิดปกติของการทดสอบ

ผู้ป่วยที่มีสารต้านต่อปัจจัยการแข็งตัวของเลือด พบว่า ทำให้ค่าการแข็งตัวของเลือดในการตรวจ LA ทั้ง screening test และ confirmatory test ยาวขึ้น อีกทั้งไม่สามารถแก้ไขให้กลับมาสั้นลงด้วยการเพิ่มปริมาณฟอสโฟลิปิด หรือการเติม NP ในขั้นตอนการตรวจ mixing test ได้

สรุป

การตรวจ LA ในพลาสมาของผู้ป่วยเป็นการตรวจที่สำคัญสำหรับการวินิจฉัยภาวะ APS ในประเทศไทยยังไม่มีที่แพร่หลายและไม่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการของทุกโรงพยาบาล เนื่องจากมีวิธีการตรวจที่ยุ่งยากหลายขั้นตอน ถูกรบกวนจากหลายปัจจัย อีกทั้งต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญในการแปลผล แม้ว่าปัจจุบันจะมีชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจคัดกรองและการตรวจยืนยันโดยเครื่องอัตโนมัติจำหน่ายหลากหลายบริษัท รวมถึงมีการเติมสาร heparin neutralizers ในน้ำยาเพื่อลดการรบกวนจากการใช้ยาในกลุ่ม heparin ซึ่งมีประโยชน์ต่อการแปลผลอย่างมาก อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อจำกัดในการตรวจอีกหลายประการที่ต้องคำนึงถึง ดังนั้นห้องปฏิบัติการที่ทำการทดสอบควรมีความรู้ความเข้าใจในหลักการและข้อจำกัดของการทดสอบ นอกจากนี้แพทย์ควรหลีกเลี่ยงการส่งตรวจในขณะที่มีผู้ป่วยมีภาวะหรืออยู่ระหว่างการใช้ยาใด ๆ ที่มีผลต่อการทดสอบ ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องแม่นยำ นำไปสู่การวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Gomez-Puerta JA, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2014;48-49:20-5.
- Limper M, Scire CA, Talarico R, Amoura Z, Avcin T, Basile T. Antiphospholipid syndrome: state of the art on clinical practice guidelines. *RMD Open.* 2018 (Suppl 1);0:e000785.
- Antovic A, Sennström M, Bremme K, Svenungsson E. Obstetric antiphospholipid syndrome. *Lupus Sci Med.* 2018(Suppl 1);5:e000197.
- Tcherniantchouk O, Laposata M, Marques MB. The isolated prolonged PTT. *Am J Hematol.* 2013;88(1):82-5.
- Ames PRJ, Graf M, Archer J, Scarpato N, Iannaccone L. Prolonged activated partial thromboplastin time: Difficulties in discriminating coexistent factor VIII inhibitor and lupus anticoagulant. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015;21(2):149-54.
- Chng WJ, Sum C, Kuperan P. Causes of isolated prolonged activated partial thromboplastin time in an acute care general hospital. *Singapore Med J.* 2005;46(9):450-6.
- Ortel TL. Antiphospholipid syndrome laboratory testing and diagnostic strategies. *Am J Hematol.* 2012;87(Suppl 1):S75-81.
- Vernylen J, Arnout J. Influence of the lupus anticoagulant on clotting tests. *Clin Rheumatol.* 1990;9(1 Suppl 1):45-8.
- Kandiah DA, Krilis SA. Heterogeneity of lupus anticoagulant (LA) antibodies: LA activity in dilute Russell's Viper Venom Time and dilute Kaolin Clotting Time detect different populations of antibodies in patients with the "antiphospholipid" syndrome. *Thromb Haemost.* 1998;80(2):250-7.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):295-306.
- Gardiner C, Hills J, Machin SJ, Cohen H. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical practice. *Lupus.* 2013;22(1):18-25.
- Proven A, Bartlett RP, Moder KG, Miller AC, Cardel LK, Heit JA. Clinical importance of positive test results for lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies. *Mayo Clin Proc.* 2004;79(4):467-75.
- Saraiva SS, Mazetto BM, Tobaldine LQ, Colella PM, Paula EVD, Bizzachi JA. The impact of antibody profile in thrombosis associated with primary antiphospholipid syndrome. *Am J Hematol.* 2017;92(11):1163-9.
- Akkawat B. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulant: from guidelines 1995 to 2009. *J Hematol Transfus Med.* 2011;21(1):41-6.
- Aryurachai K, Rachakom B, Angchaisuksiri P, Atichartakarn V. Laboratory identification of lupus anticoagulants. *J Hematol Transfus Med.* 2002;12(3):209-18.

16. Aryurachai K, Archararit N, Rachakom B, Angchaisuksiri P, Atichartakarn V, Rattanasiri S. Comparison of diluted Russell's viper venom time by a conversional method with an automated kit assay for the detection of lupus anticoagulants. *J Hematol Transfus Med.* 2005;15(3):155-63.
17. Pengo V, Bison E, Banzato A, Zoppellaro G, Jose SP, Denas G. Lupus anticoagulant testing: Diluted Russell viper venom time (dRVVT). *Methods Mol Biol.* 2017;1646:169-76.
18. Swadzba J, Iwaniec T, Pulka M, De Laat B, De Groot PG, Musial J. Lupus anticoagulant: performance of the tests as recommended by the latest ISTH guidelines. *J Thromb Haemost.* 2011; 9(9):1776-83.
19. Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N. APTT reagent with ellagic acid as activator shows adequate lupus anticoagulant sensitivity in comparison to silica-based reagent. *J Thromb Haemost.* 2012;10(11):2338-43.
20. Aryurachai K, Angchaisuksiri P, Siriputtanapong K. Evaluation of kaolin clotting time for the diagnosis of lupus anticoagulants by using different calculation methods. *J Hematol Transfus Med.* 2014;24(4):379-88.
21. Pengo V, Biasiolo A, Rampazzo P, Brocco T. dRVVT is more sensitive than KCT or TTI for detecting lupus anticoagulant activity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies. *Thromb Haemost.* 1999;81(2):256-8.
22. Galli M, Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin Clotting Time and Dilute Russell's Viper Venom Time distinguish between prothrombin-dependent and B2-Glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood.* 1995;86(2):617-23.
23. Lee HR, Kim JE, Ha SH, Kim HK, Park S, Cho HI. Usefulness of silica clotting time for detection of lupus anticoagulants. *Korean J Lab Med.* 2009;29(6):497-504.
24. Liu HW, Wong KL, Lin CK, Wong WS, Tse PW, Chan GT. The reappraisal of dilute tissue thromboplastin inhibition test in the diagnosis of lupus anticoagulant. *Br J Haematol.* 1989;72(2):229-34.
25. Moore GW, Maloney JC, de Jager N, Dunsmore CL, Gorman DK, Polgrean RF, et al. Applications of different lupus anticoagulant diagnostic algorithms to the same assay data leads to interpretive discrepancies in some samples. *Res Pract Thromb Haemost.* 2017;1(1):62-8.
26. Kumano O, Moore GW. Lupus anticoagulant mixing tests for multiple reagents are more sensitive if interpreted with a mixing test-specific cut-off than index of circulating anticoagulant. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(1):105-13.
27. Moore GW. Commonalities and contrasts in recent guidelines for lupus anticoagulant detection. *Int Jnl Lab Hem.* 2014;36(3):364-73.
28. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, 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(10):1737-40.
29. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost.* 2014;40(2):163-71.
30. Moore GW. Current Controversies in lupus anticoagulant detection. *Antibodies.* 2016;5(22):e10.3390.
31. Olteanu H, Downes KA, Patel J, Praprotnik D, Sarode R. Warfarin does not interfere with lupus anticoagulant detection by dilute Russell's viper venom time. *Clin Lab.* 2009;55(3-4):138-42.
32. Sangale NA, Rodgers GM, Smock KJ. Prevalence of heparin in samples submitted for lupus anticoagulant testing. *Lab Hematol.* 2011;17(1):6-11.
33. Gosselin RC, King JH, Janatpur KA, Dager WH, Larkin EC, Owings JT. Effects of pentasaccharide (Fondaparinux) and direct thrombin inhibitors on coagulation testing. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128(10):1142-5.
34. Murer LM, Pirruccello SJ, Koepsell SA. Rivaroxaban therapy, false-positive lupus anticoagulant screening results, and confirmatory assay results. *Lab Medicine.* 2016;47(4):275-8.
35. Hoxha A, Banzato A, Ruffatti A, Pengo V. Detection of lupus anticoagulant in the era of direct oral anticoagulants. *Autoimmun Rev.* 2017;16(2):173-8.
36. Kovacs MR, Lazo-Langner A, Louzada ML, Kovacs MJ. Lupus anticoagulant testing in patients receiving Rivaroxaban or Apixaban for the treatment of venous thromboembolism. *Blood.* 2016;128(22):5017.

