

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**ГУ «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
РАДИАЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»**

А.А. Кудря

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА**

Практическое пособие для врачей



Гомель, 2021

УДК 616-097-07-08(072)

Составитель:

А.А. Кудря, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клеточных технологий государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Рецензенты:

Ю.И.Ярец, врач клинической лабораторной диагностики (заведующий) клинико-диагностической лабораторией государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», кандидат медицинских наук, доцент

Д.К.Новик, врач-гематолог высшей квалификационной категории (заведующий) гематологического отделения для взрослых государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Кудря А.А. Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома / А.А. Кудря – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2020. – с.

В практическом пособии приводится обзор основных видов антифосфолипидных антител, рекомендованных для лабораторной диагностики антифосфолипидного синдрома, механизмы их действия. Отдельно освещены вопросы оценки функционального состояния свертывающей системы, определения волчаночного антикоагулянта, антител к кардиолипину и $\beta 2$ -гликопротеину-1, как основных лабораторных маркеров антифосфолипидного синдрома. Пособие содержит диагностические критерии антифосфолипидного синдрома в соответствии с существующими отечественными и международными рекомендациями, алгоритм лабораторной диагностики антифосфолипидного синдрома. Пособие предназначено для врачей всех клинических специальностей, врачей клинической лабораторной диагностики.

Рекомендовано к изданию на заседании Ученого совета ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» протокол № ___ от _____.20__ г.

УДК 616-097-07-08(072)

© Составитель: Кудря А.А.
© ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2021

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

АФС	антифосфолипидный синдром
АФА	антифосфолипидные антитела
МКБ-10	Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем, десятого пересмотра
СКВ	системная красная волчанка
ТЭЛА	тромбоэмболия легочной артерии
ОРДС	острый респираторный дистресс-синдром
РА	ревматоидный артрит
ВА	волчаночный антикоагулянт
aCL	антитела к кардиолипину
a β 2-GP-1	антитела к β 2-гликопротеину-I
ИФА	иммуноферментный анализ
АЧТВ	активированное частичное тромбопластиновое время
ПВ	протромбиновое время
МНО	международное нормализованное отношение
ТВ	тромбиновое время
ФИБ	фибриноген
СО	скрининговое отношение
СО _{СП}	скрининговое отношение смеси плазм
ПО	подтверждающее отношение
НО	нормализованное отношение
УЗИ	ультразвуковое исследование
MPL	фосфолипидные единицы для IgM к кардиолипину
GPL	фосфолипидные единицы для IgG к кардиолипину

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Антифосфолипидный синдром: определение, классификация, клинические проявления	5
Антифосфолипидные антитела (АФА)	8
Лабораторная диагностика АФС	10
Оценка функционального состояния системы свертывания	12
Определение волчаночного антикоагулянта в плазме крови	13
Определение антител к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I	18
Другие виды антифосфолипидных антител	21
Диагностические критерии АФС	21
Алгоритм лабораторной диагностики АФС	24
Приложение 1	26
Список использованной литературы	27

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современной медицины является исследование патогенетических механизмов, лежащих в основе повреждения сосудов и нарушения процесса свертывания крови. Антифосфолипидный синдром (АФС) относится к числу наиболее актуальных мультидисциплинарных проблем современной медицины. В настоящее время АФС уделяется пристальное внимание со стороны специалистов, прежде всего, в области ревматологии, акушерства и гинекологии, кардиологии, неврологии.

Наименование нозологической формы заболевания (шифр по Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, десятого пересмотра, принятой в 1989 году сорок третьей сессией Всемирной ассамблеи здравоохранения): D68.8 Другие нарушения свертывания крови.

АНТИФОСФОЛИПИДНЫЙ СИНДРОМ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ, КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

Антифосфолипидный синдром – аутоиммунный клинико-лабораторный симптомокомплекс, в основе которого лежит образование антител к фосфолипидам (АФА), являющихся главными липидными компонентами клеточных мембран, в сочетании с рядом клинических проявлений, основными из которых являются венозные и артериальные тромбозы различной локализации, невынашивание беременности (спонтанные аборты, выкидыши, внутриутробная гибель плода), тромбоцитопения.

Впервые АФС описан у пациентов с СКВ под названием «антикардиолипиновый синдром» английским ревматологом G. Hughes в 1986 г. [G.Hughes et al., 1986], работавшем в больнице Святого Томаса в

Лондоне. В связи с этим, в литературе также можно встретить другое название АФС - «синдром Hughes» (с 1994 года).

Данные об истинной распространенности АФС отсутствуют. Антифосфолипидный синдром встречается наиболее часто у лиц среднего возраста (35-45 лет), но может выявляться у детей (в т. ч. новорожденных) и пожилых людей. АФС в 5 раз чаще диагностируется среди женщин молодого возраста (20-40 лет), нежели у мужчин. АФС может носить как спорадический, так и наследственный характер. В последнем случае наследование происходит по аутосомно-доминантному типу.

В основе развития АФС лежит невоспалительная тромботическая васкулопатия, возникающая вследствие повреждения сосудов антифосфолипидными антителами. Гиперпродукция АФА создает условия для гиперкоагуляции, а формирование тромба индуцируется дополнительными медиаторами, усиливающими активацию каскада свертывания крови.

Антифосфолипидный синдром может быть первичным или вторичным. Первичный антифосфолипидный АФС возникает в отсутствие каких-либо других связанных с ним заболеваний. Вторичный АФС развивается на фоне другой патологии: аутоиммунной (СКВ, РА, синдром Шегрена, васкулиты, артерииты, периартерииты и т.д.), онкологической, гематологической, инфекционной и др. Наследственный АФС является редким.

Спектр клинических проявлений АФС весьма широк и представлен сосудистыми, акушерскими, ревматологическими, неврологическими, кардиологическими, и пульмонологическими синдромами. Прежде всего, АФС проявляется венозными и артериальными тромбозами (64%), различными формами акушерской патологии, в первую очередь, привычным невынашиванием беременности (63%) (спонтанные аборты, выкидыши, внутриутробная гибель плода), артралгией и артритом (68%), мигренью и инсультами (66%), кожными проявлениями (40%), тромбоцитопенией и гемолитической анемией (30%), утолщением клапанов сердца и инфарктом

миокарда (27%), ТЭЛА и легочной гипертензией (20%) (R. Severa et al, ARTHRITIS & RHEUMATISM 46:1019 (2002)). Одним из наиболее тяжелых клинических проявлений является «катастрофическая» форма АФС, характеризующаяся острой полиорганной недостаточностью (ОРДС, инсульт, инфаркт миокарда и паренхиматозных органов, острая надпочечниковая недостаточность).

Выделяют также АФС разной диагностической точности: определенный (достоверный) и вероятный АФС. Впервые такая градация была предложена D.Alarcon-Segovia (1992). В 1999 году на международном симпозиуме по АФА (Саппоро, Япония) были разработаны, а 2005 году на XI Международном конгрессе по АФС в Сиднее пересмотрены международные критерии определенного АФС. Определенный АФС диагностируется при наличии двух и более клинических критериев и одного лабораторного (серологического) критерия. Диагноз определенного АФС требует обнаружения положительного ВА (коагуляционные методы) или повышения aCL (твердофазный иммунный метод) при повторном исследовании через 12 недель или более. Это связано с тем, что повышение АФА может быть транзиторным, обусловленным острыми инфекциями, приемом некоторых лекарственных препаратов или иными случайными причинами. АФА в этих случаях, как правило, являются независимыми от кофакторов, патогенетически незначимыми и не могут быть причиной тромбозов или других характерных для АФС клинических проявлений. Повторное исследование АФА в этой ситуации позволяет избежать гипердиагностики АФС. При наличии типичных клинических проявлений, но отсутствии, низком уровне или нестойком повышении АФА (отрицательные результаты при повторных исследованиях aCL и ВА) диагностируется вероятный АФС.

АНТИФОСФОЛИПИДНЫЕ АНТИТЕЛА (АФА)

Ключевая роль в развитии АФС принадлежит антифосфолипидным антителам. Факт существования АФА (в частности, антител к кардиолипину) известен давно, с момента введения в практику серологической реакции Вассермана для диагностики сифилиса (1906 год). Причины их синтеза до конца не ясны, частота выявления в популяции колеблется от 0 до 14 %. В низком титре они могут обнаруживаться в крови здоровых людей.

АФА – это большая группа гетерогенных антител, которые могут распознавать нейтральные или анионные фосфолипиды, протеины и фосфолипид-белковыми комплексы. К АФА относятся волчаночный антикоагулянт (ВА), антитела к кардиолипину (aCL), фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфотидилхолину, фосфотидилэтаноламину, сфингомиелину. К антифосфолипидсвязывающим относят антитела к β 2-гликопротеину-I ($\alpha\beta$ 2-GP-I), антитела к протромбину, антитела к аннексину V, антитела к протеинам C и S и др. Взаимодействуя с фосфолипидами мембран клеток эндотелия сосудов, тромбоцитов, нейтрофилов, АФА вызывают нарушение гемостаза, выражающиеся в склонности к гиперкоагуляции.

ВА представляет собой группу поликлональных аутоантител, которые относятся к иммуноглобулинам класса G и/или M и обладают способностью ингибировать процесс свертывания крови, приводя к ингибированию ряда фосфолипид-зависимых коагуляционных тестов.

aCL относится к 3 классам иммуноглобулинов - IgG, IgM и IgA, но основное клиническое значение имеет определение IgG и IgM. Они нарушают образование протромбинактивирующего комплекса, который состоит из X и V фактора, фосфолипидов, тромбоцитов и кальция. Для взаимодействия АФА и фосфолипидов необходим сывороточный кофактор - β 2-гликопротеин-I. Он обладает антикоагулянтной активностью *in vivo*, присутствует в нормальной плазме в концентрации примерно 200 мкг/мл в

ассоциации с липопротеинами. АФА распознают антигенные детерминанты не фосфолипидов, а конформационные детерминанты в молекуле β 2-гликопротеина-I в процессе ее взаимодействия с фосфолипидами. При этом β 2-гликопротеин-I-зависимое связывание АФА и эндотелиальных клеток приводит к активации эндотелия: гиперэкспрессии молекул адгезии (E-селектин, VCAM-1, ICAM-1), увеличению прилипания моноцитов к поверхности эндотелия.

α β 2-GP-1 классов IgG и IgM *in vitro* индуцируют экспрессию E-селектина (ELAM-1) на мембране эндотелиальных клеток и секрецию провоспалительных цитокинов (интерлейкинов 1 и 6) и простагландина E2.

Мишенью для АФА могут являться отдельные протеины, являющиеся естественными антикоагулянтами, такие как протеин C и S, тромбомодулин. Установлено, что одним из важнейших механизмов развития АФС является вмешательство АФА в систему протеинов C и S. АФА ингибируют зависимость от эндотелиальных клеток и тромбомодулина активацию протеина C, деградацию фактора Va комплексом протеинов C и S в присутствии фосфатидилхолин-фосфатидилсериновых липосом. aCL связываются с белком S только в присутствии β 2-гликопротеина-I и кардиолипина. Это вызывает дефицит свободного протеина S. Данный каскад коагуляционных изменений в конечном итоге приводит к нарушению процесса естественной гипокоагуляции и, как следствие, развитию тромбозов.

Большой интерес представляет связь между синтезом АФА и программированной гибелью клеток эндотелия. Основной чертой апоптоза, предшествующей фрагментации ДНК и нарушению целостности клеточной мембраны, является расположение фосфатидилсерина на ее наружной поверхности, в то время как в нормальных условиях фосфатидилсерин локализуется на цитоплазматической (внутренней) ее стороне.

Аннексин V покрывает фосфатидилсерин по типу ковра, оказывая местный антикоагулянтный эффект, ингибируя фактор VIII- и фактор IXa-

зависимую активацию фактора X на эндотелиальных клетках, возникающую при активации тромбоцитов. Поэтому во время физиологической беременности, несмотря на длительное расположение фосфатидилсерина на поверхности трофобласта, не происходит постоянного тромбообразования. Антитела к аннексину V классов IgG и IgM вытесняют аннексин V с поверхности эндотелиоцитов и клеток трофобласта, что приводит к гиперкоагуляции и развитию тромбозов и инфарктов плаценты.

Антитела к протромбину классов IgG и IgM напрямую ингибируют факторы коагуляции, что приводит к удлинению времени фосфолипид-зависимых коагуляционных тестов. Протромбин (фактор II свертывания) – витамин K-зависимый гликопротеин синтезируется в печени и участвует в свертывании крови. Протромбин обеспечивает создание на мембране поврежденных клеток комплекса факторов Va, Ха и фосфолипидов. В результате этого образуется протромбиназный комплекс, который осуществляет расщепление протромбина до тромбина, что в дальнейшем приводит к превращению фибриногена в фибрин. Протромбин является кофактором действия ВА.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АФС

Антифосфолипидный синдром – это клинико-лабораторный диагноз. Диагностика АФС предусматривает комплексную оценку анамнестических, клинических и лабораторных данных. Однако, необходимо отметить, что клинические симптомы недостаточно специфичны для установления заключительного диагноза, ввиду чего лабораторные тесты играют ключевую роль в диагностике АФС. Лабораторная диагностика АФС заключается в определении антифосфолипидных антител.

История лабораторной диагностики АФС включает несколько значимых событий:

- 1983 год Harris EN – разработка первых тестов для выявления антител к кардиолипину на основе РИА;
- 1983 год – Graham Hughes сопоставил клинические проявления и лабораторные данные АФС;
- 1986 год – первые попытки стандартизации антикардиолипидных антител;
- 1989 и 1990 годы – McNeil HP – открытие белкового кофактора и идентификация β 2-гликопротеина-1;
- 1999 год – публикация первых клинико-лабораторных критериев АФС (Sapropo 1998);
- 2006 год – пересмотр критериев АФС (Sydney 2005);
- 2010 год – 13-й Международный Конгресс по АФА (Галвестон, Техас, США);
- 2012 год – рекомендации Комитета по Науке и Стандартизации Международного Общества по Тромбозу и Гемостазу;
- 2017 год – 15-й международный конгресс по АФС (Кипр).

В Республике Беларусь подходы к диагностике АФС изложены в приложении «Клинический протокол диагностики и лечения пациентов с антифосфолипидным синдромом», утвержденным приказом МЗ РБ от 08.06.2012 № 694 «Об утверждении клинического протокола о диагностике, профилактике и лечения пациентов с антифосфолипидным синдромом».

Согласно вышеуказанному документу, а также международным рекомендациям определены диагностически значимые лабораторные параметры АФС. Они включают в себя:

- 1) оценку функционального состояния системы свертывания крови (определение АЧТВ, ПВ, МНО и других показателей коагулограммы);
- 2) определение ВА в плазме крови (коагуляционные тесты);
- 3) количественное определение антител класса IgM / IgG к кардиолипину (aCL) методом ИФА;
- 4) количественное определение антител класса IgM / IgG к β 2-гликопротеину-1 (a β 2-GP-I) методом ИФА.

Коагуляционные тесты, определяющие ВА, имеют высокую специфичность, но низкую чувствительность. Кроме того, существенное влияние на результат этих тестов может оказывать состояние свертывающей и противосвертывающей систем и использование в лечении пациента ряда препаратов (антикоагулянты и др.). Определение же АФА методом ИФА напротив обладают высокой чувствительностью, но недостаточно специфичны. Они дают возможность количественного определения серологических маркеров и достаточно просты в использовании.

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ

Оценка функционального состояния системы свертывания является этапом скрининга, направлена на выявление гипокоагуляционных изменений и проводится путем выполнения коагулограммы, включающей стандартные показатели: активированное частичное тромбoplastинное время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время, фибриноген. Рутинные коагуляционные тесты позволяют заподозрить наличие АФА.

Как правило, в плазме крови пациентов с АФС происходит удлинение АЧТВ в 2-2,5 раза (иногда ПВ), что обусловлено присутствием ВА. Однако, к удлинению АЧТВ может приводить целый ряд других факторов (терапия гепарином, дефицит или дефект плазменных факторов свертывания, гипокоагуляционная стадия ДВС-синдрома, гипо- и афибриногенемия и др.), что диктует необходимость проводить тесты для дифференциальной диагностики.

Исключение влияния нефракционированного гепарина на показатели гемостаза осуществляется путем определения в плазме пациента тромбинового времени, которое удлиняется под действием гепарина. В присутствии ВА тромбиновое время остается в норме.

Гипо- и афибриногенемия устанавливается путем определения концентрации фибриногена в плазме крови также в рамках коагулограммы. Как правило, при АФС концентрация фибриногена в плазме остается в пределах нормальных значений.

При получении данных за возможное наличие в плазме крови пациента ингибитора свертывания (удлинение АЧТВ, ПВ, нормальное ТВ и нормальное содержание фибриногена) необходимо провести комплекс коагуляционных исследований, направленных на обнаружение и подтверждение ВА.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Основными клиническими проявлениями АФС являются венозные и артериальные тромбозы. Однако, *in vitro* в плазме пациентов с АФС регистрируют явления гипокоагуляции. Этот парадокс обусловлен способностью АФА нейтрализовывать (ингибировать) фосфолипиды. Такой эффект впервые был выявлен в крови пациентов с СКВ, поэтому антифосфолипидные антитела стали называть «волчаночный антикоагулянт» (ВА).

Биологическим материалом для определения наличия или отсутствия ВА служит бедная тромбоцитами плазма крови. Взятие крови производится путем венепункции, при этом время наложения жгута не должно превышать 60 с. Для взятия крови необходимо использовать безопасные вакуумные (поршневые) системы (голубой цвет крышки), содержащие в качестве антикоагулянта 3,2% (3,8%) цитрат натрия в соотношении 1:9 (1 часть антикоагулянта и 9 частей крови). Вакуумные системы позволяют стандартизировать этап взятия крови и минимизировать влияние факторов преаналитического этапа на конечный результат исследования.

Требования к центрифугированию для получения бедной тромбоцитами плазмы в разных руководствах отличаются. Главное, что должен обеспечивать применяемый режим центрифугирования – минимальное количество тромбоцитов в исследуемой плазме.

Согласно рекомендациям Британского общества гематологии бедную тромбоцитами плазму крови для определения ВА получают путем двойного центрифугирования биологического образца, которое необходимо выполнить не позднее 1 часа с момента взятия крови. Первое центрифугирование проводят в течение 15 мин при величине центробежного ускорения 2000g. Затем верхний слой плазмы крови переносят в другую пластиковую пробирку и повторно центрифугируют 5 мин при 10000g для максимального освобождения биологического образца от тромбоцитов.

Также для получения бедной тромбоцитами плазмы возможно использование метода фильтрации с помощью специальных фильтров 0,2 мкм. Однако, применение фильтров может привести к потере таких высокомолекулярных белков, как фактор Виллебранда и VIII фактор свертывания, которые могут быть причиной удлинения АЧТВ.

Ультрацентрифугирование не рекомендуется, так как оно может привести к фрагментации тромбоцитов и высвобождению в плазму дополнительных фосфолипидов.

По разным рекомендациям количество тромбоцитов в конечной пробе плазмы не должно превышать $1-10 \times 10^9/\text{л}$. Полученные образцы плазмы крови для анализа ВА не должны быть гемолизированы, не должны содержать сгустки и примесь эритроцитов.

Время хранения исследуемой плазмы до анализа - не более 4 часов при комнатной температуре и не более 8 часов при $2 - 8^\circ\text{C}$. Замораживание плазмы не рекомендуется, так как оно приводит к высвобождению тромбоцитарных фосфолипидов.

Алгоритм определения ВА принципиально основан на последовательном проведении скрининговых и подтверждающих тестов.

Причем, обнаружение ВА в плазме крови должно проводиться дважды с промежутком не менее 12 недель.

Комитет по Науке и Стандартизации Международного Общества по Тромбозу и Гемостазу рекомендует использование комбинации основных двух скрининговых тестов:

- определение АЧТВ, чувствительного к ВА;
- время разбавленного яда гадюки Рассела (dilute Russell viper venom time - dRVVT).

При этой комбинации тестов процент выявления ВА составляет 80-85%. Добавляя к данной комбинации третий тест (ПВ с разбавленным тромбопластином или каолиновое время), процент выявления ВА повышается до 100%. Наиболее специфическим скрининговым тестом для выявления ВА является время разбавленного яда гадюки Рассела (dilute Russell viper venom time - dRVVT). Однако, применение только одного теста резко увеличивает процент ложноотрицательных результатов.

Результаты скрининговых тестов обычно выражают в виде скринингового отношения (СО):

$$CO = Tб/Tн,$$

где $Tб$ – время скринингового теста исследуемой плазмы;
 $Tн$ – время скринингового теста нормального пула бедной тромбоцитами донорской плазмы.

В норме скрининговое отношение равно 0,8-1,2. При удлинении одного или нескольких скрининговых тестов более, чем на 20% от нормы, т.е. при $CO \geq 1,2$ проводят тесты со смешением плазм и подтверждающие тесты с теми же реагентами, но содержащими повышенное содержание фосфолипидов.

Метод смешения исследуемой плазмы с пулом нормальной бедной тромбоцитами донорской плазмы (микст-тест, проба переноса) служит для дифференциальной диагностики дисфункции одного или нескольких факторов свертывания и присутствия в плазме пациента ингибитора свертывания. Применяемая нормальная плазма должна быть аттестована по

нормальному содержанию факторов свертывания. Коммерческие нормальные плазмы могут быть не бестромбоцитарными и поэтому после лиофилизации содержать дополнительные фосфолипиды. Чаще всего плазмы смешивают в соотношении 1:1. В случае присутствия ВА в исследуемом образце донорская плазма, содержащая все необходимые факторы свертывания, не корригирует результат, таким образом, удлинение АЧТВ (и/или ПВ) будет сохраняться. При дефиците или дисфункции одного из плазменных факторов свертывания добавление контрольной плазмы к исследуемой плазме пациента приводит к нормализации АЧТВ.

При проведении теста смешения плазм необходимо ориентироваться на отношение АЧТВ смеси к АЧТВ нормальной контрольной плазмы (скрининговое отношение смеси плазм- $CO_{сп}$):

при $CO_{сп} < 1,2$ – нет данных за присутствие ВА;

при $CO_{сп} > 1,2$ – необходимо дальнейшее определение ВА.

Следует помнить, что если у пациента имеются клинические проявления АФС, определение ВА необходимо проводить, несмотря на коррекцию АЧТВ в тесте смешения плазм.

При удлинении АЧТВ, которое не корректируется путем добавления к исследуемому образцу нормальной контрольной (донорской) плазмы и не связано с другими причинами, при значении $CO_{сп}$ более 1,2 - необходимо проводить дальнейшие лабораторные исследования по определению ВА в плазме крови с помощью подтверждающих тестов.

Целью этих тестов является подтверждение фосфолипид-зависимой природы ингибитора свертывания. Принцип действия подтверждающих тестов основан на способности истощения (нейтрализации) антикоагулянтного эффекта ВА избытком фосфолипидов. При этом, укорочение (нормализация) АЧТВ будет свидетельствовать о наличии в исследуемой плазме ВА. Отсутствие коррекции времени свертывания свидетельствует о специфическом ингибиторе одного из факторов свертывания.

В настоящее время ряд производителей реагентов для исследования системы гемостаза предлагают решения в виде готовых диагностических наборов реагентов для скрининговых (screen reagent) и подтверждающих (confirmation reagent) тестов с помощью автоматических гемакоагулометров.

Результаты подтверждающих тестов выражают в виде подтверждающего отношения (Confirm Ratio), подтверждающее отношение – ПО): $ПО = Тб / Тн$,

где Тб – время свертывания плазмы пациента в подтверждающем тесте;

Тн – время свертывания нормального пула бедной тромбоцитами донорской плазмы в подтверждающем тесте (данный показатель каждая лаборатория устанавливает самостоятельно) или коммерческой нормальной донорской плазмы.

Окончательное решение о наличии в плазме пациента ВА принимают на основании значений нормализованного отношения (НО), рассчитываемого по формуле: $НО = СО / ПО$,

где СО – скрининговое отношение, ПО – подтверждающее отношение.

Интерпретация результата НО проводится по следующей схеме:

- референтное значение НО составляет 0,8–1,2;
- при $НО < 1,2$ – волчаночный антикоагулянт отсутствует;
- при $НО > 1,2$ – присутствие волчаночного антикоагулянта;
- при $НО = 1,2-1,5$ – ВА слабоположительный;
- при $НО = 1,5-2,0$ – ВА положительный;
- при $НО > 2,0$ – ВА сильно положительный.

Получение положительных результатов в подтверждающих тестах свидетельствует о наличии ВА и служит подтверждением диагноза АФС.

Подтверждение наличия ВА проводят также в тесте нейтрализации тромбоцитов. Так как тромбоциты могут «шунтировать» действие ВА, то добавление к исследуемой плазме активированных отмытых экзогенных тромбоцитов будет коррегировать время свертывания в пробах с ВА, но не в пробах с недостаточностью факторов свертывания. В основе метода лежит

определение АЧТВ: сначала определяют базовые значения АЧТВ исследуемой и нормальной донорской плазмы, затем – значения АЧТВ смеси исследуемой и нормальной донорской плазмы при добавлении равного объема физиологического раствора (1 проба) и лизата тромбоцитов (2 проба). Если АЧТВ смеси исследуемой и нормальной плазмы с физиологическим раствором превышает АЧТВ смеси исследуемой и нормальной плазмы с лизатом тромбоцитов более чем на 5 секунд, делают вывод о наличии ВА в исследуемой плазме.

Таким образом, согласно рекомендациям Подкомитета по Волчаночному Антикоагулянту Комитета по Науке и Стандартизации Международного Общества по Тромбозам и Гемостазу критериями для определения эффекта присутствия ВА в плазме крови являются:

- а) удлинение времени свертывания плазмы в одном и более фосфолипид-зависимых скрининговых коагуляционных тестах: АЧТВ, протромбиновое время с избытком тромбопластина, время разбавленного яда гадюки Рассела (dilute Russell viper venom time - dRVVT), каолиновое время;
- б) отсутствие коррекции удлинения теста при смешивании исследуемого образца с нормальной плазмой;
- в) укорочение времени свертывания скрининговых тестов при добавлении избытка фосфолипидов;
- д) отсутствие специфических ингибиторов любых факторов свертывающей системы крови (например ингибитора VIII фактора свертывания крови или гепарина), удлиняющих фосфолипид-зависимые тесты свертывания крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К КАРДИОЛИПИНУ И β 2-ГЛИКОПРОТЕИНУ-I

Антикардиолипиновые антитела распознают как сам кардиолипин, так и его комплекс с β 2-гликопротеином-I. β 2-гликопротеин-I является

необходимым условием связывания антител к кардиолипину с самим кардиолипином.

Выявление антикардиолипиновых антител при многих заболеваниях (СКВ, РА, другие аутоиммунные заболевания, инфаркты, инсульты, различные инфекции, тромбоцитопения, гемолитическая анемия и т.д.) в значительной мере снижает специфичность данного теста для АФС. Поэтому, в отличие от ВА, антикардиолипиновые антитела и антитела к β 2-гликопротеину-I являются рекомендованными дополнительными маркерами АФС.

Определение антител к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I также проводятся в случае наличия у пациента характерных клинических признаков АФС, но сомнительных или отрицательных результатах подтверждающих тестов на присутствие ВА.

Кроме того, данные антитела являются независимыми факторами риска возникновения сосудистых тромбозов и невынашивания беременности. Пациенты, позитивные по нескольким видам антител, имеют более тяжелое течение заболевания и более частые рецидивы, несмотря на лечение.

Биологическим материалом для определения АФА является сыворотка крови. Взятие материала осуществляют путем венепункции с использованием безопасных вакуумных (поршневых) систем, предназначенных для получения сыворотки крови: красный цвет пробки, с/без активатора свертывания крови. Допускается использовать системы с разделительным гелем (желтый цвет пробки).

Согласно существующим рекомендациям количественное определение антител к кардиолипину и β 2-гликопротеину-I следует проводить методом иммуноферментного анализа минимум дважды, с 12-ти недельным интервалом между исследованиями.

На практике было показано, что эффективнее всего определять антитела к кардиолипину классов IgG и/или IgM. Такая комбинация антикардиолипиновых антител выявляется в 86% случаев АФС (Comparative

study Dr. Madlener, Bad Nauheim, Germany). Частота выявления антител к кардиолипину только класса IgG или только класса IgM при АФС равна 48% и 10% соответственно. Частота выявления антител к β 2-GP-1 классов IgG и/или IgM при АФС также равна 86%. Однако, если определять антитела к β 2-GP-1 классов IgG и IgM по отдельности, то частота их выявления существенно снижается – до 10% и 19% соответственно.

Согласно международного референсного стандарта содержание антител к кардиолипину указывается в «фосфолипидных единицах» - GPL для IgG, MPL для IgM (Harris 1983). Положительным может считаться превышение референсного уровня в 2 и более раз. Как правило, положительным считают уровень выше 40 GPL Ед/мл и MPL Ед/мл. Значение изолированного обнаружения антител IgM (т.е. в отсутствие антител IgG) не ясно.

Результаты иммуноферментного анализа на присутствие aCL оценивают как «высокопозитивные» (более 80 GPL Ед/мл и MPL Ед/мл), «среднепозитивные» (40-80 GPL Ед/мл и MPL Ед/мл), «низкопозитивные» (10-40 GPL Ед/мл и MPL Ед/мл). Результаты менее 10 GPL Ед/мл и MPL Ед/мл рассматривают как отрицательные.

Референтные значения антител к β 2-GP-1 классов IgG и IgM зависят от применяемых в конкретной лаборатории наборов реагентов.

Необходимо учитывать, что существует серонегативный вариант АФС. При серонегативном варианте, классические серологические маркеры не выявляются, в то время как клинические симптомы (прежде всего тромбозы) свидетельствуют о возможном АФС. Это связано со снижением уровня антител ниже порога чувствительности методов определения вследствие потребления их при тромбозе. В таких случаях требуется повторное определение ВА, aCL (G и M), а β 2-GP-I (G и M) через 12 недель.

Появление АФА у здоровых людей может быть связано с получением лекарственных препаратов (хлорпромазин, фенотиазины, прокаинамид,

фенитоин, гидралазин), инфекциями (вирусными, бактериальными, паразитарными), со злокачественной лимфомой, парапротеинемией.

ДРУГИЕ ВИДЫ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ

Помимо стандартизированных лабораторных тестов, включенных в критерии классификации, существует ряд других АФА, которые могут быть серологическими маркерами заболевания:

- антитела к фосфотидилсерину (IgG, IgM),
- антитела к фосфотидилинозитолу (IgG, IgM),
- антитела к фосфотидиловой кислоте (IgG, IgM),
- антитела к протромбину (IgG, IgM),
- антитела к комплексу фосфатидилсерин/протромбин,
- антитела к аннексину-V (IgG, IgM),
- антитела к протеинам C, S и другие.

Определение данных АФА может расширить возможности лабораторной диагностики АФС, однако, не способно заменить определение aCL и $\alpha 2$ -GP-1. Поэтому вышеуказанные антитела принято считать имеющими отношение к АФС.

Определение антител, имеющих отношение к АФС, показано при серонегативном варианте АФС, когда основные серологические маркеры не выявляются, однако, имеются клинические проявления заболевания.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ АФС

Диагностические критерии АФС разделяются на клинические и лабораторные. Согласно приказу МЗ РБ от 08.06.2012 № 694 «Об утверждении клинического протокола о диагностике, профилактике и лечения пациентов с антифосфолипидным синдромом» диагноз АФС устанавливают при наличии как минимум одного клинического и одного

лабораторного критериев в соответствии с решением комиссии экспертов IX Международного конгресса по АФС (Sydney Consensus Workshop, 2005 год) (таблица 1).

Таблица 1. Диагностические критерии АФС.

Критерии	Характеристика признака (критерия)
Клинические критерии	
Сосудистый тромбоз	Один и более клинических эпизодов артериального, венозного тромбозов или тромбоза мелких сосудов в любом органе или ткани. Тромбоз должен быть подтвержден объективными исследованиями. Для гистологического подтверждения тромбоза не должно быть выраженных воспалительных изменений в стенке сосуда.
Патология беременности	а) одна и более необъяснимые смерти морфологически нормального плода (по данным УЗИ или патологоанатомического исследования) в сроках 10-ти и более недель беременности; б) одни и более преждевременные роды до 34 недель беременности, протекающие с тяжелым гестозом или тяжелой фетоплацентарной недостаточностью, с рождением морфологически нормального плода; в) три или более необъяснимых последовательных прерываний беременности в сроках до 10 недель с исключением анатомических и гормональных причин, а также хромосомных аномалий со стороны отца и матери.
Лабораторные критерии	
Волчаночный антикоагулянт	Обнаруживается в плазме в 2-х и более исследованиях, полученных с 12-недельным

	промежутком. ВА определяют в соответствии с рекомендациями Подкомитета по Волчаночному Антикоагулянту Комитета по Науке и Стандартизации Международного Общества по Тромбозам и Гемостазу.
Антитела к кардиолипину (aCL)	Наличие среднего или высокого титра антител к кардиолипину класса IgG и/или IgM (т.е. более 40 GPL Ед/мл и MPL Ед/мл или более 99 персентиля) в сыворотке или плазме в 2 и более исследованиях с интервалом не менее 12 недель. Определение aCL должно осуществляться с помощью метода иммуноферментного анализа.
Антитела к β 2-гликопротеину-I (a β 2-GP-I)	Наличие среднего или высокого титра антител к β 2-гликопротеину-I класса IgG и/или IgM (в титре, более 99 персентиля) в сыворотке или плазме в 2 и более случаях с интервалом не менее 12 недель. Определение a β 2-GP-I должно осуществляться с помощью метода иммуноферментного анализа.

АФС исключается, если менее 12 недель или более 5 лет выявляются АФА без клинических проявлений или клинические проявления без АФА. Однако, такие пациенты требуют динамического наблюдения, так как имеют более высокий риск развития тромбозов.

Согласно рекомендациям 13-го Международного Конгресса по АФА (Галвестон, Техас, США, апрель 2010г.) определённый профиль АФА может быть идентифицирован как высокий или низкий риск для последующих тромбозов:

- высокий риск:
 - позитивность по волчаночному антикоагулянту (ВА),
 - позитивность трёх типов АФА (ВА + aCL + a β 2-GP-I),

- позитивность двух типов АФА (любая комбинация ВА, аСL или аβ2-GR-I),
- изолированная постоянная позитивность по аСL в высоких и средних уровнях (исследовано только для СКВ);
 - низкий риск
- изолированное периодическое повышение каждого из АФА в средних и низких уровнях.

АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АФС

Алгоритм лабораторной диагностики АФС включает оценку функционального состояния свертывающей системы крови, определение ВА и основных серологических маркеров.

Для удобства использования разработана графическая схема алгоритма лабораторной диагностики АФС (Приложение 1).

Соответствующие изменения в рутинной коагулограмме позволяют заподозрить наличие ВА. Данный этап, как и этап непосредственного определения ВА, можно дополнить тестом смешения плазм (микст-тестом), который прост в проведении, не требует дополнительного оборудования и реагентов и может быть выполнен в лаборатории любого уровня.

Согласно выводам последнего конгресса по АФС (Кипр, 2017) в качестве лабораторного подтверждения АФС рекомендуется проводить параллельное определение всех трех лабораторных маркеров: ВА, аСL, аβ2-GR-I. Наличие тройной позитивности (положительный результат по всем трем маркерам) в сочетании с доказанным венозным и/или артериальным тромбозом дает 100% уверенность в диагнозе АФС.

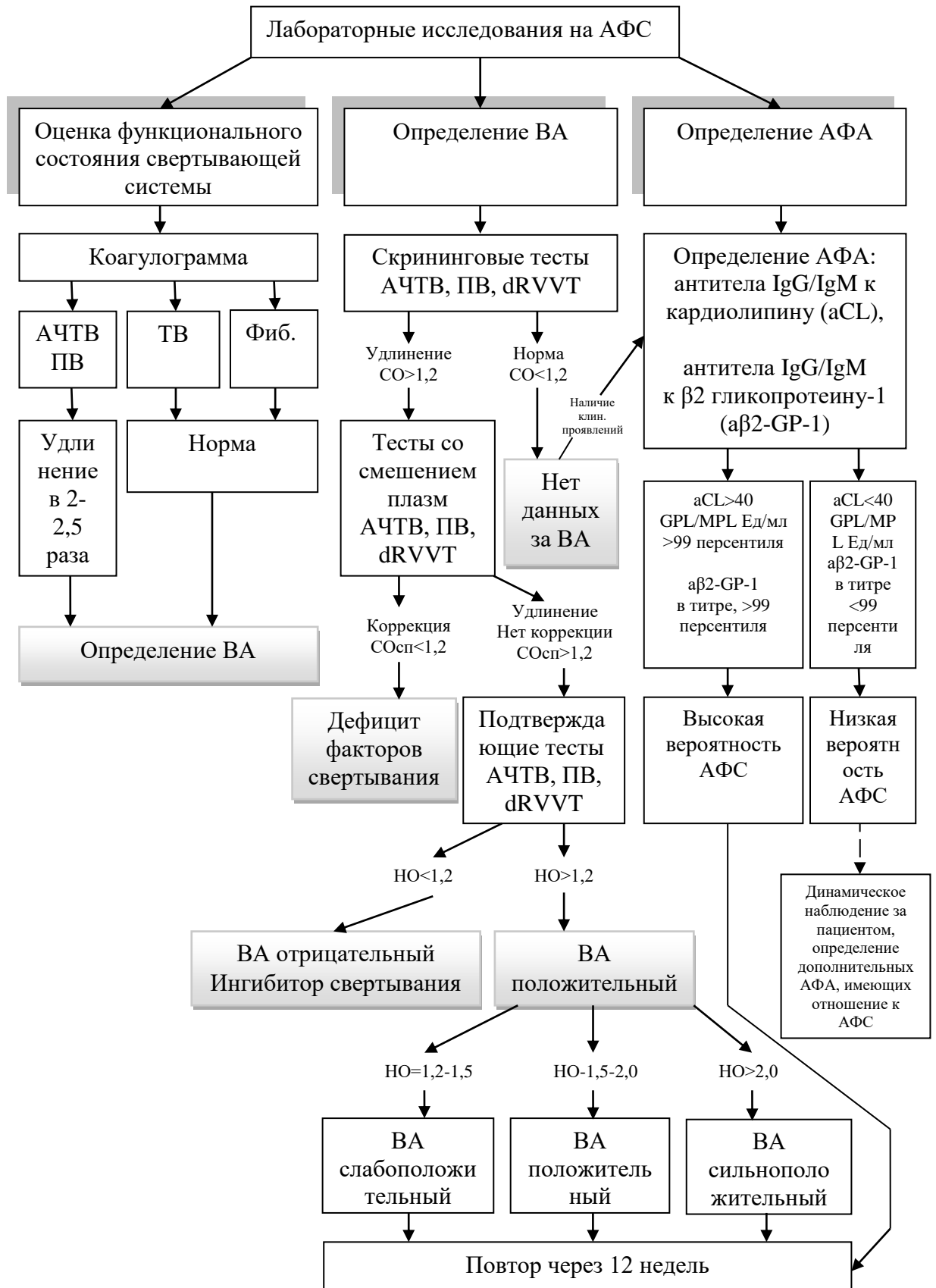
Одновременное определение трех основных маркеров АФС имеет следующие преимущества:

- тройная серологическая позитивность имеет высокую корреляцию с тромбозами,

- при тройной позитивности нет необходимости проводить повторное определение через 12 недель,

- получение трех положительных результатов не зависит от применяемой методологии определения ВА, аCL, а β 2-GP-I.

Алгоритм лабораторной диагностики АФС



Список использованной литературы:

1. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы. Москва: Медицина, 1988. - 126 с.
2. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром: клиническая и иммунологическая характеристика // Клин. мед. 1989. - № 1. - С. 5 - 13.
3. Можейко Л.Ф., Терешко Е.В. Антифосфолипидный синдром: диагностика, клиника, прегравидарная подготовка, ведение беременности, родов и послеродового периода : учеб.- метод. пособие / – Минск: БГМУ, 2013. – 27 с.
4. Гомоляко А.В., Новикова И.А. Антифосфолипидный синдром. Диагностика и лечение: учеб. пособие для студентов медицинских вузов / - Гомель: учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», 2013. - 51 с.
5. Антифосфолипидный синдром. Издательство «Литтера», Москва, 2004, 424 с. Под редакцией Е.Л. Насонова.
6. Алекберова З.С., Решетняк Т.М., Кошелева Н.М. и др. Антифосфолипидный синдром при системной красной волчанке, оценка диагностических и классификационных критериев // Клин.мед. -1996. № 6 - С. 39-42
7. Решетняк Т.М., Алекберова З.С. Антифосфолипидный синдром - уникальная модель аутоиммунной тромботической васкулопатии. // Врач. 2000. - № 3. - С. 6 - 8.
8. Miyakis S, Lockshin M, 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.
9. Antiphospholipid Syndrome: Insights and Highlights from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies D. Erkan and S.S. Pierangeli (eds.), DOI 10.1007/978-1-4614-3194-7_17, © Springer Science+Business Media New York 2012.

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. *J Thromb Haemost.* 2009;7,1737-40.
11. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2010;8,237-42.
12. Guyatt GH, Cook DJ, Jaeschke R, Pauker SG, Schunemann HJ. Grades of recommendation for antithrombotic agents: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th edition). *Chest.* 2008;133.123S-131.
13. Greaves M, Cohen H, MacHin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2000;109:704-715.