УДК 616-005.6-071+616-005.1-08

В.В. Красівська, О.В. Стасишин

Державна установа «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», Львів

Сучасні методи лабораторної діагностики вовчакового антикоагулянту у пацієнтів із антифосфоліпідним синдромом

Мета — дослідити інформативність для діагностики антифосфоліпідного синдрому (АФС) рутинних коагулологічних та сучасних методів виявлення вовчакового антикоагулянту (ВА) у пацієнтів із тромбозом і патологією вагітності. Об'єкт і методи. У 233 пацієнтів із підозрою на АФС із тромбозом різної локалізації та акушерською патологією виконували рутинні коагулологічні дослідження та визначали антифосфоліпідні антитіла, зокрема ВА. Результати. Згідно з міжнародними критеріями діагностики у 44,6% обстежених встановлено АФС, серед них первинний — у 85,6%, вторинний — у 14,4%. ВА виявлено у 42,5% обстежених (95,2% хворих із АФС). При виконанні рутинних досліджень системи гемостазу наявність активності ВА можна запідозрити за подовженням протромбінового часу (ПЧ) та активованого часткового тромбопластинового часу (АЧТЧ). На І скринінговому етапі діагностики ВА найбільша інформативність спостерігається при комбінуванні тестів, які ґрунтуються на відмінних принципах і відповідають за різні ланки системи гемостазу, зокрема часі зсідання з фосфоліпідзалежною отрутою змії, АЧТЧ із чутливим до ВА ревгентом та ПЧ із розведеним тромбопластином у 50 та 500 разів. Висновки. Результати групи коректійних тестів не є надійними та не дозволяють прийняти рішення щодо продовження чи припинення подальшого дослідження. Необхідність їх виконання слід розглядати індивідуально у кожному випадку. У зв'язку з високою інформативністю тести на підтвердження необхідно проводити на II етапі виявлення ВА. Отримані результати гармонізуються з останніми методичними рекомендаціями 2014 р., які можуть бути застосовані як стандарти у пошуку активності ВА.

Ключові слова: *вовчаковий антикоагулянт, антифосфоліпідні антитіла, антифосфоліпідний синдром, діагностика.*

Вступ

Антифосфоліпідний синдром (АФС) — набуте системне аутоімунне захворювання, яке характеризується розвитком тромбозу (Тз) та/чи акушерською патологією і патогенетично пов'язане з гіперпродукцією антифосфоліпідних антитіл (АФЛА). Крім клінічних, до серологічних маркерів АФС належать наявність у плазмі крові пацієнта вовчакового антикоагулянту (ВА) та/чи середні й високі титри антикардіоліпінових антитіл (АКЛА) ізотопів імуноглобуліну (Ig) G та/чи IgM, та/чи підвищений титр антитіл до анти-β_2-глікопротеїну I (анти-β_2-GPI) ізотопів IgG та/або IgM. Діагноз АФС вимагає одного клінічного та одного лабораторного критерію. Для всіх АФЛА результат має бути позитивним ≥2 разів з інтервалом 12 тиж. ВА виявляють за допомогою коагулологічних методів, АКЛА та антитіла до анти-β_2-GPI — за допомогою імуноферментних досліджень (ELISA). Відомо, що *in vivo* ВА є значним прокоагулянтом, а його наявність найкраще корелює з основними клінічними проявами АФС порівняно з виявленими за допомогою імунологічних досліджень АФЛА (Miyakis S. et al., 2006; Tripodi A., 2007; Tripodi A. et al., 2011; Giannakopoulos B. et al., 2009; Martinuzzo M., 2010; Swadzba J. et al., 2011; Devreese K.M.J., 2012; 2014; Keeling D. et al., 2012; Favaloro E.J., 2013; Chandler J. et al., 2014; Merashli M. et al., 2015; Pengo V. et al., 2016). Тому дослідження на наявність ВА необхідне і вкрай важливе для встановлення діагнозу.

Протягом останнього десятиліття міжнародні товариства декілька разів оновлювали попередні та видавали нові рекомендації з лабораторної діагностики ВА. Міжнародне товариство тромбозу та гемостазу опублікувало стандарти в 1983, 1991, 1995 та 2009 р., Британський комітет стандартизації в гематології — у 1991, 2000, 2012 р. та Інститут клінічних і лабораторних стандартів — у 2014 р. (Pengo V. et al., 2009; Keeling D. et al., 2012; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2014). У вищезазначених методичних рекомендаціях існують деякі відмінності, зокрема дані про кількість центрифугувань при підготовці зразків до дослідження, кількість тестів (застосування 1–2 базового та більше), типи та концентрацію застосованих у реактивах фосфоліпідів (Фл), виведення середніх значень і референтних інтервалів, розрахунок індексів та порядок виконання груп тестів (Martinuzzo M., 2010; Devreese K.M.J., 2012; 2014; Favaloro E.J., 2013; Moore G.W., 2014*a*; *b*). Тому імплементація та апробація сучасних методів діагностики ВА згідно з міжнародними стандартами лабораторної діагностики покращить якість цих досліджень, що дозволить вчасно встановити діагноз і якісно контролювати лікування хворих.

Мета — з'ясувати значення та дослідити інформативність для діагностики АФС рутинних коагулологічних та сучасних методів виявлення ВА у пацієнтів із Тз та патологією вагітності.

Об'єкт і методи дослідження

Об'єктом дослідження були 233 пацієнти з підозрою на АФС (віком 7–59 років, 213 жінок та 20 чоловіків), які в період 2015–2016 рр. звернулися до ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» з Тз різної локалізації, акушерською патологією (переважно звичне невиношування вагітності), тромбоцитопенією (кількість тромбоцитів (Тц) <100·10^9/л), псевдопозитивною реакцією Вассермана, різними шкірними (сітчасте ліведо), неврологічними та серцевими порушеннями. Хворим проведено клінічні, клініко-генеалогічні, молекулярно-генетичні, цитологічні, цитогенетичні, гормональні, гематологічні, імунологічні, біохімічні та загальні коагулологічні дослідження. Для діагностики АФС за допомогою твердофазних імуноферментних методів (ELISA) визначали АКЛА класів IgG, IgM, антитіла до β_2-GPI класів IgG, IgM та проводили виявлення ВА на основі Фл-залежних коагулологічних методів. Підвищення рівня АФЛА >10 GPL або MPL вважали позитивним результатом.

Для коагулологічних досліджень плазму крові отримали шляхом венепункції. У пластиковій пробірці кров стабілізували 3,2% розчином цитрату натрію у співвідношенні 1 частина стабілізатора до 9 частин крові. Подальшу підготовку проводили шляхом послідовного центрифугування у двох режимах (7 хв при 110 g та 20 хв — при 2000 g) до отримання збідненої на Тц плазми. Для визначення наявності ВА плазму повторно центрифугували 20 хв при 2000 g.

Усі коагулологічні дослідження виконували на напівавтоматичному коагулометрі «Helena-C4» («Helena Bioscience Europe», Великобританія). Для загальної оцінки стану системи гемостазу визначали протромбіновий час (ПЧ) за Quick, активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ), концентрацію фібриногену (Фг) гравіметричним методом за Niewiarowski. Для коректного зіставлення результатів розраховували індекс АЧТЧ (іАЧТЧ) як відношення часу згортання (ЧЗ) у хворого до ЧЗ контрольної плазми. Судинно-тромбоцитарний гемостаз оцінювали на підставі кількості Тц та агрегації Тц під дією

аденозиндифосфорної кислоти (АДФ) (Kitchen S., McCraw A., 2000; Kitchen S. et al., 2010).

Дані нормальних показників системи гемостазу отримано від 50 здорових осіб (25 чоловіків і 25 жінок середнього віку), які не приймали жодних лікарських засобів. Результати усіх коагулологічних досліджень порівнювали з розрахованим середнім арифметичним (m), референтний інтервал становив 2 стандартні відхилення (m±2 SD) (Devreese K.M.J., 2014; Moore G.W., 2014*a*; *b*).

Діагностика ВА полягала у послідовному виконанні трьохетапного комплексу тестів для виявлення активності ВА відповідно до міжнародних критеріїв та сучасних рекомендацій (Pengo V. et al., 2009; Keeling D. et al., 2012; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2014).

На I етапі виконували скринінгові Фл-залежні коагуляційні тести: ЧЗ з розведеною (ЧЗ у контрольній плазмі 25–35 с) Фл-залежною отрутою змії гюрзи середньоазійської (лебетоксовий час — ЛЧ), АЧТЧ із реагентом, що має високу чутливість до ВА (АЧТЧ ВАч), ПЧ із розведеним тромбопластином (РТ) у 50 і 500 разів (ПЧ 1:50 та 1:500 відповідно). Для кожного скринінгового тесту розраховували індекс — відношення ЧЗ у хворого до середнього референтного значення. Для іЛЧ, іПЧ 1:50, нормальні межі становили 0,85–1,15, для іАЧТЧ ВАч, іАЧТЧ ВА-нечутливим та іПЧ 1:500 — 0,8–1,2 відповідно. Подовження індексу вказує на наявність патологічних інгібіторів (імунних до факторів згортання або ВА) або на дефіцит прокоагулянту. На наступних етапах досліджують лише ті скринінгові тести, значення яких перевищують верхню граничну межу (m+2 SD).

Згідно з останніми міжнародними рекомендаціями (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2014), II етап включає тести на підтвердження наявності ВА. Фл-залежну природу інгібітору підтверджують доданням у систему надлишкової кількості Фл. Ми застосовували відмиті, заморожені й розморожені Тц донорів (лізат Тц), що змішували з плазмою крові пацієнта у рівних об'ємах. Процедура приготування Тц описана S. Kitchen, A. McCraw (2000), S. Kitchen та співавторами (2010).

Нормалізоване співвідношення (НС) розраховували за формулою:

$$НС = \frac{I_1}{I_2},$$

де I_1 — відношення ЧЗ у подовженому скринінговому тесті пацієнта в секундах (с) до середнього значення скринінгового тесту нормальної плазми (с), I_2 — відношення ЧЗ у підтверджувальному тесті пацієнта (с) до ЧЗ у підтверджувальному тесті контрольної плазми (с).

Референтний інтервал розраховували як співвідношення ЧЗ у тесті до ЧЗ після додання до плазми суспензії Тц. Для всіх тестів значення НС у контрольній групі, які перевищували m+2 SD, вважали позитивними щодо наявності ВА. У нашому випадку значення становило ⩾1,15 для всіх тестів на підтвердження Фл-природи інгібітору.

III етап діагностики ВА включав тести на змішування для виключення дефіциту коагуляційних факторів або mix-тести, що демонструють наявність інгібітору. Проводили корекцію подовженого ЧЗ скринінгового тесту нормальною плазмою у співвідношенні 1:1 з досліджуваною плазмою. Для кожного тесту розраховували індекс циркулюючого антикоагулянту (іЦА) за формулою:

$$іЦА = \frac{в-с}{а} \cdot 100\%,$$

де *в* — ЧЗ суміші у корекційному тесті (с), *с* — середнє значення (m) ЧЗ контрольної плазми (с), *а* — ЧЗ досліджуваної плазми у порушеному скринінговому тесті.

Значення іЦА розраховували у відсотках за показником відповідного скринінгового тесту в контрольній групі. Для всіх тестів 2 SD становило 15,0%. При зростанні іЦА ⩾15,0% вважали, що наявний ВА — негайний аутоімунний інгібітор II типу.

Статистичну обробку виконували за допомогою пакетів прикладних програм «STATISTICA for Windows 10,0». Дані параметричних показників подавали як медіану (Me), мінімум — максимум, нижній — верхній квартилі. Порівняння окремих груп проводили за допомогою параметричного критерію різниці (тесту Стьюдента t). Для порівняння якісних характеристик (таблиці частот) застосовували критерій χ^2 у разі таблиць 2×2. Вірогідність результатів оцінювали на рівні достовірності ⩾95% (p<0,05).

Результати та їх обговорення

Згідно з міжнародними критеріями, 104 (44,6%) пацієнтам діагностовано АФС. До клінічних критеріїв АФС відносять: ⩾1 епізоду артеріального та/чи венозного Тз, Тз дрібних судин; патологію вагітності (⩾1 випадків внутрішньоутробної загибелі плода після 10 тиж гестації, ⩾1 випадків передчасних пологів морфологічно нормального плода після 34 тиж гестації з приводу еклампсії, тяжкої прееклампсії, вираженої фетоплацентарної недостатності, ⩾3 незрозумілих випадки переривання вагітності до 10 тиж гестації з виключенням анатомічних, генетичних, гормональних причин та хромосомних аномалій) (Miyakis S. et al., 2006; Keeling D. et al., 2012; Merashli M. et al., 2015). АФС поділяють на: первинний (не асоційований з іншими хворобами), вторинний (асоційований із захворюваннями, включно із системним червоним вовчаком), катастрофічний (агресивна форма АФС з масивними Тз, поліорганною недостатністю, високою смертністю), серонегативний (без типової клінічної маніфестації та без АФЛА) (Miyakis S. et al., 2006; Keeling D. et al., 2012; Merashli M. et al., 2015). У нашому дослідженні первинний АФС діагностовано у 89 (85,6%) хворих, у 15 (14,4%) виявлено вторинний АФС на тлі системного червоного вовчака та інших аутоімунних захворювань. ВА діагностовано 99 хворим (42,5% обстежених та 95,2% хворих з АФС).

У пацієнтів із АФС Me показників АФЛА не перевищувала норми (10,0 Од./мл) і становила: загальні АФЛА класів IgG та IgM — 1,56 та 3,2, АКЛ класів IgG та IgM — 1,3 та 1,1, антитіла до анти-β_2GPI класу IgG та IgM — 1,4 та 1,4 Од./мл відповідно.

Результати скринінгових досліджень системи гемостазу у хворих на АФС представлено в табл. 1. Показник ПЧ у пацієнтів з АФС був достовірно подовженим порівняно з контролем — Me 15,3 с проти 14,6 с (p=0,0011). Різниця між показниками ПІ хворих з АФС (Me 97,0%) та в контрольній групі (Me 98,0%) також була значуща (p=0,0166). АЧТЧ та іАЧТЧ у хворих на АФС з високою достовірністю (p=0,0000) були збільшеними порівняно з відповідними показниками здорових осіб (Me 34,2 проти 29 с та Me індексу 1,17 проти 1,0 відповідно). Окрім хвороби клаланів серця, сітчастого ліведо, тромбоцитопенії, нефропатії, неврологічних проявів, некритерійних антитіл до Фл, неспецифічним проявом АФС може бути подовжений АЧТЧ, часто незрозумілого походження (Miyakis S. et al., 2006; Keeling D. et al., 2012; Merashli M. et al., 2015). Отримані дані подовженого АЧТЧ та ПЧ дозволяють вже на етапі рутинних коагулологічних досліджень запідозрити наявність ВА і перейти до специфічних тестів на виявлення антикоагулянту. Усі інші скринінгові тести дослідження гемостазу у пацієнтів із АФС були в межах норми і не відрізнялися від показників здорових осіб (у всіх випадках p>0,05).

Дані щодо результатів тестів на виявлення ВА у 99 хворих з АФС та контрольної групи представлено у табл. 2. У досліджуваній групі всі показники скринінгових Фл-залежних тестів були подовжені, що може свідчити про гіпокоагуляцію, пов'язану із впливом патологічних АФЛА на систему згортання. Показники ЛЧ та іЛЧ підвищені порівняно зі здоровими особами — Me 35,0 с проти 28,0 с та 1,19 проти 0,96 відповідно; (у всіх випадках p=0,0000). АЧТЧ (ВАч) та іАЧТЧ (ВАч) у хворих з АФС також перевищували граничну межу (p=0,0000), встановлену в контролі, їх Me становили 46,0 с при нормі для АЧТЧ (ВАч) 37,9 с та 1,23 при нормі для іАЧТЧ (ВАч) 0,99 відповідно. У досліджуваній групі значення ПЧ у розведенні 1:50 та 1:500 є вірогідно подовженими — 33,0 та 58,0 с відповідно. З високою достовірністю іПЧ(1:50) та іПЧ (1:500) вищі за норму — 1,14 проти 1,0 та 1,16 проти 0,97 (p=0,0000). ВА — гетерогенна група аутоантитіл, яка *in vitro* перешкоджає процесу згортання та інгібує Фл-залежні реакції коагуляції, що призводить до пролонгації ЧЗ. Ці антитіла не є специфічними до самих Фл та безпосередньо не взаємодіють із факторами згортання. Вони спрямовані на неоантигенні епітопи Фл-зв'язувальних білків, таких як β_2-GPI або протромбін (ПТ) — фактор згортання II (Miyakis S. et al., 2006; Giannakopoulos B. et al., 2009; Swadzba J. et al., 2011). Патологічний вплив антикоагулянтів вовчакового типу може реалізуватися шляхом впливу на комплекс ПТ:тромбін, що призводить до блокади тромбіноутворення. Також антитіла ПТ-IgG:ВА конкурують за поверхню аніонних Фл з ПТ та іншими факторами згортання, що призводить до подовження ЧЗ у Фл-залежних коагуляційних тестах (Sakakura M. et al., 2000; de Groot P., Derksen R., 2005; Giannakopoulos B. et al., 2009; Tripodi A. et al., 2011).

За результатами тестів з надлишковою кількістю Фл на наявність ефектів ВА вказує зростання НС >1,15 (вкорочення ЧЗ порівняно з аналогічним подовженим скринінговим показником) та відсутність достовірної різниці з відповідним скринінговим показником у контрольній групі. При нейтралізації ВА зруйнованими Тц донора спостерігали корекцію подовженого ЛЧ до нормальних значень 28,0 с (p=0,120). Незважаючи на те що у пацієнтів із АФС ЧЗ з отрутою змії у підтверджувальному тесті є дещо довшим (p=0,0580), ніж час після

Таблиця 1. Скринінгові показники системи гемостазу та кількості Тц у пацієнтів із АФС

Тест	Пацієнти з АФС (n=99)	Контрольна група (n=50)
ПЧ, с	15,3 (11,0–42,0) [14,0–16,4]*	14,6 (11,5–16,4) [14,0–15,0]
Протромбіновий індекс, %	97,0 (35,7–109,0) [89,0–100,0]*	98,0 (90,0–106,0) [94,8–100,5]
АЧТЧ, с	34,2 (23,7–115,0) [30,8–37,0]*	29,0 (24,0–34,2) [27,4–30,4]
ІАЧТЧ	1,17 (0,8–3,6) [1,0–1,29]*	1,0 (0,8–1,2) [1,0–1,0]
Фг, мг/мл	2,75 (1,75–9,0) [2,3–3,3]	2,6 (2,0–4,0) [2,3–3,3]
Агрегативна функція Тц з АДФ, с	14,8 (10,0–164,0) [12,8–16,0]	14,6 (12,0–17,6) [13,0–16,0]
Кількість Тц, · 10^9/л	214,0 (16,0–359,0) [177,5–243,0]	180,0–320,0

Дані подано як Me (мінімум – максимум) (25% спостережень – нижній, 75% спостережень – верхній квартиль); *різниця з показником контрольної групи значуща ($p<0,05$).

додання до плазми крові здорових осіб зруйнованих Тц (Me 27,0 с), НС ЛЧ достовірно перевищувало 1,15 і Me становила 1,27 проти 1,02 у контролі (p=0,0110). У досліджуваній групі нейтралізація ВА надлишком Фл відбувалась у тесті АЧТЧ (ВАч) зі зростанням НС АЧТЧ (ВАч) >1,15. Me ЧЗ не відрізнялася від АЧТЧ (ВАч) групи порівняння — 36,2 с проти 37,0 с на етапі скринінгу та 35,6 с — після додання зруйнованих заморожуванням Тц (p=0,1551 та p=0,2563 відповідно). У хворих із АФС Me НС АЧТЧ (ВАч) становила 1,28 проти 1,07 у здорових осіб (p=0,0000), що вказує на наявність антифосфоліпідної активності у досліджуваній групі. Значна корекція подовжених на скринінговому етапі ПЧ (1:50) до 28,2 с та ПЧ (1:500) до 49,0 с відбувалася на етапі підтвердження наявності ВА з надлишком Фг; достовірної різниці з відповідними показниками у контрольній групі не виявлено (p=0,1698 та p=0,1223 відповідно). Наявність ВА підтверджували достовірно підвищені показники НС ПЧ (1:50) та НС ПЧ (1:500) до 1,23 проти 1,0 у контролі та до 1,2 проти 1,1 відповідно (p=0,0000). Крім лізованих заморожуванням і розморожуванням відмитих Тц донора у якості Фл можна застосовувати гексагональні (II) Фл або реактиви з надлишковою концентрацією Фл у своєму складі. Взаємодіючи з надлишку з ВА, Фл нейтралізують його інгібіторний вплив на гемостаз та ЧЗ подовжених на скринінгу тестів приходить до норми (Miyaks S. et al., 2006; Pengo V. et al., 2009; Keeling D. et al., 2012; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2014).

На останньому етапі діагностики ВА — тести на змішування — на дефіцит прокоагулянтів вказує значне вкорочення ЧЗ відповідних подовжених скринінгових тестів (ІЦА <15,0%). Відсутність корекції при доданні нормальної плазми та зростання ІЦА ≥15,0% буде свідчити про наявність негайних аутоімунних інгібіторів типу ВА. Порівняно з контрольною групою здорових осіб у хворих із АФС ЛЧ був достовірно подовженим — Me 34,0 с проти 28,0 с (p=0,0000) та ІЦА ЛЧ перевищував 15,0% і становив 15,6%, що свідчить про наявність інгібіції. Хоча корекції нормальною плазмою у тесті АЧТЧ (ВАч) не відзначено (Me 41,6 с проти 37,9 с; p=0,0000), ІЦА АЧТЧ (ВАч) у досліджуваній групі не перевищував 15,0% і Me була 6,7%. Таку саму ситуацію спостерігали у mix-тестах, зокрема з РТ. При змішуванні плазми крові пацієнта з нормальною плазмою у співвідношенні 1:1 до системи надходять фактори згортання. Якщо подовження ЧЗ пов'язане з дефіцитом прокоагулянту, побачимо нормалізацію подовженого на етапі скринінгу показника. При наявності ВА, який не пригнічує активність факторів, ЧЗ залишається подовженим. Тому у разі відсутності корекції можна запідозрити аутоімунний негайний інгібітор, який неспецифічно інгібує коагуляційні реакції згортання за рахунок анти-Фл-активності. Отримані нами на цьому етапі результати здебільшого виключають дефіцит фактора згортання, але не дають чіткої інформації щодо наявності впливу на згортання інгібіторів, зокрема ВА. Тому ці тести можна вважати орієнтовними й допоміжними, які можуть лише у окремих випадках запідозрити та/чи підтвердити наявність патологічного інгібітору. Деякі автори вважають, що при дуже високих або дуже низьких титрах ВА ця група тестів може бути достатньо інформативною і дозволяє відрізнити ВА від іншої коагулопатії (Pengo V. et al., 2009; Martinuzzo M., 2010; Tripodi A., 2012; Favaloro E.J., 2013; Akkawat B., Rojnuckarin P., 2014; Kumano O. et al., 2013; Chandler J.B. et al., 2014; Moore G.W., 2014a; 2016). З іншого боку, у пацієнтів, які отримують антикоагулянтну терапію, результати тестів на змішування необхідно інтерпретувати з обережністю (Devreese K.M.J., De Laat B., 2015). У кожному випадку необхідно індивідуально вирішувати питання щодо їх виконання, спираючись на клінічні прояви (Favaloro E.J. et al., 2010; Tripodi A., 2012; Chandler J.B. et al., 2014).

Питання щодо вибору кількості тестів, необхідних для надійної діагностики ВА, залишається відкритим. Кількість тестів залишається на розсуд лабораторії, яка виконує ці дослідження. У разі, якщо результати лабораторних досліджень відповідають клінічним проявам і є ефект від подальшого лікування на основі встановленого діагнозу, міжнародні експерти рекомендують застосовувати вже вибраний арсенал методик (Pengo V. et al., 2009; Devreese K.M.J., 2012; 2014; Fritsma G.A. et al., 2012; Keeling D. et al., 2012; Favaloro E.J., 2013; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2014; Moore G.W., 2014a; *b*; 2016; Pengo V. et al., 2016). Оскільки АФЛА є дуже гетерогенною групою антитіл, які можуть взаємодіяти з різними мішенями, застосовані тести мають охоплювати різні ланки системи згортання. АЧТЧ характеризує внутрішній шлях коагуляції та у разі відсутності ВА відповідає за дефіцит факторів II, V, VIII, IX, X, XI, XII, прекалікреїну, низькомолекулярного кініногену та вміст Фг. ПЧ охоплює зовнішній шлях, і його подовження пов'язане зі зниженням вмісту факторів X, VII, V, II та Фг. ЛЧ із ослабленою отрутою характеризує загальний шлях згортання на основі активації фактора X і відповідає за концентрацію прокоагулянтів II, V, X, вміст Фг (Fritsma G.A. et al., 2012; Moore G.W., 2014b; 2016). На нашу думку, урізноманітнення панелі тестів — застосування двох базових (тесту з Фл-залежною отрутою змії та АЧТЧ) і ПЧ із РТ дозволить отримати максимум інформації та уникнути гіподіагностики.

Висновки

1. Характерні для АФС симптоми не є специфічними, встановлення діагнозу відбувається за результатами лабораторних досліджень. Серед 233 обстежених АФС встановлено у 44,6%. Первинний АФС діагностовано у 85,6%, вторинний — у 14,0% хворих. ВА виявлено у 42,5% випадків, що становить 95,2% хворих із АФС.

2. У досліджуваній групі Me титрів АКЛА, антитіл до анти-β_2-GPI та загальних АФЛА не перевищували граничне значення і становили <10 Од./мл.

3. При виконанні рутинних досліджень системи гемостазу наявність ВА можна запідозрити за подовженням ПЧ та особливо АЧТЧ. Вміст Фг, кількість і агрегативна функція Тц з агоністом АДФ залишаються у межах норми і не можуть слугувати маркерами наявності анти-Фл-активності.

4. На скринінговому етапі діагностики ВА найбільша інформативність з'являється у разі комбінування тестів, які ґрунтуються

Таблиця 2. Показники тестів на виявлення ВА у пацієнтів із АФС

Група	ЛЧ, с	ІЛЧ	АЧТЧ (ВАч), с	ІАЧТЧ (ВАч)	ПЧ (1:50), с	ІПЧ (1:50)	ПЧ (1:500), с	ІПЧ (1:500)
Скринінгові тести								
Пацієнти з АФС (n=99)	35,0 (21,0–240,0) [30,0–43,7]*	1,2 (0,8–7,2) [1,0–1,4]*	45,0 (32,0–161,0) [41,4–53,6]*	1,2 (0,9–3,6) [1,1–1,37]*	33,0 (22,0–121,0) [29,0–38,0]*	1,1 (0,8–3,9) [1,0–1,3]*	58,0 (30,0–420,0) [52,0–69,0]*	1,2 (0,7–7,6) [1,1–1,3]*
Контрольна група (n=50)	28,0 (23,3–38,0) [27,0–31,0]	1,0(0,8–1,3) [0,9–1,0]	37,9 (31,2–48,0) [35,0–40,2]	1,0 (0,8–1,3) [0,9–1,1]	29,0 (24,0–35,0) [27,0–30,0]	1,0 (0,8–1,2) [1,0–1,1]	50,0 (42,0–65,0) [49,6–55,0]	1,0 (0,8–1,3) [1,0–1,1]
Тести на підтвердження ВА								
Пацієнти з АФС (n=99)	28,0 (24,0–34,2) [27,0–29,0]*	1,3 (0,9–6,2) [1,1–1,9]*	36,2 (25,0–57,0) [33,0–39,0]	1,3 (1,0–2,7) [1,2–1,4]*	28,2 (23,0–42,0) [26,0–32,1]*	1,2 (1,0–1,9) [1,2–1,3]*	49,0 (40,0–82,0) [47,0–53,0]*	1,2(1,1–1,9) [1,1–1,4]*
Контрольна група (n=50)	27,0 (24,0–29,0) [25,0–27,4]	1,0 (0,9–1,1) [1,0–1,0]	35,6 (31,2–42,6) [33,0–39,0]	1,1 (0,8–1,2) [1,0–1,1]	28,2 (23,0–33,0) [26,0–30,0]	1,0 (0,8–1,1) [0,9–1,1]	48,6 (37,1–54,0) [43,0–50,0]	1,1 (0,8–1,1) [0,9–1,1]
Корекційні (міх-) тести								
Пацієнти з АФС (n=99)	34,0 (25,4–130,0) [30,3–40,0]*	15,6 (1,0–58,8) [9,5–20,0]	41,6 (31,3–65,0) [39,0–47,0]*	8,7 (1,0–43,5) [4,6–13,2]	33,0 (25,0–123,0) [28,9–39,0]*	9,7 (1,0–67,7) [3,6–20,5]	59,0 (44,0–180,0) [53,0–63,0]*	10,8 (1,0–58,5) [4,3–17,0]

*Різниця з показником контрольної групи значуща ($p<0,05$); †різниця з показником тестів на підтвердження ВА у контрольній групі значуща ($p<0,05$).

на відмінних принципах і відповідають за різні ланки системи гемостазу. Застосування двох базових тестів (ЧЗ із Фл-залежною отрутою змії гюрзи та АЧТЧ із чутливим до ВА реагентом) можна доповнити тестами ПЧ із РТ у 50 та 500 разів, що дозволить уникнути гіподіагностики.

5. У зв'язку з високою інформативністю тести на підтвердження слід виконувати на II етапі виявлення ВА. Виконання групи корекційних тестів необов'язкове, оскільки їх результати не є надійними та не дозволяють прийняти рішення щодо продовження чи припинення подальшого дослідження.

Список використаної літератури

Akkawat B., Rojnuckarin P. (2014) A modified mixing test with a proposed cutoff value to screen for cotting factor inhibitors. J. Hematol. Transfus. Med., 24: 137–143.

Chandler J.B., Torres R., Rinder H.M. (2014) Lupus anticoagulant testing and anticoagulation do not mix: quantitation of discrepant results and potential approaches to reduce false positives. Br. J. Haematol., 167: 697–726.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014) Laboratory testing for the lupus anticoagulant: approved guideline. Wayne, USA, 94 p.

de Groot P., Derksen R. (2005) Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. J. Thromb. Haemost., 3: 1854–1860.

Devreese K.M.J. (2012) Standardization of antiphospholipid antibody assays. Where do we stand? Lupus, 21: 718–721.

Devreese K.M.J. (2014) Antiphospholipid antibody testing and standardization. Int. Jnl. Lab. Hem., 36: 352–363.

Devreese K.M.J., De Laat B. (2015) Mixing studies in lupus anticoagulant testing are required at least in some type of samples. J. Thromb. Haemost., 13: 1475–1478.

Favaloro E.J. (2013) Variability and diagnostic utility of antiphospholipid antibodies including lupus anticoagulants. Int. Jnl. Lab. Hem., 35: 269–274.

Favaloro E.J., Bonar R., Zebelian D. et al. (2010) Laboratory investigation of lupus anticoagulants: Mixing studies are sometimes required. J. Thromb. Haemost., 8: 2828–2831.

Fritsma G.A., Dembitzer F.R., Randhawa A. et al. (2012) Recommendations for appropriate activated partial thromboplastin time reagent selection and utilization. Am. J. Clin. Pathol., 137: 904–908.

Giannakopoulos B., Passam F., Ioannou Y., Krilis S.A. (2009) How we diagnose the antiphospholipid syndrome. Blood, 113(5): 985–994.

Keeling D., Mackie I., Moore G.W. et al. (2012) Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. Br. J. Haematol., 157: 47–58.

Kitchen S., McCraw A. (2000) Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders. A laboratory manual. WFH, Montreal, Canada, 105 p.

Kitchen S., McCraw A., Echenagucia M. (2010) Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders. A laboratory manual. 2nd ed., WFH, Montreal, Canada, 144 p.

Kumano O., Ieko M., Naito S. et al. (2013) Index of circulating anticoagulant cut-off value establishment in activated partial thromboplastin time mixing test for lupus anticoagulant diagnosis. J. Thromb. Haemost.; 11: 1919–1922.

Martinuzzo M. (2010) Laboratory criteria of antiphospholipid syndrome need to be updated or strictly followed? Open Autoim. Jnl., 2: 28–37.

Merashli M., Noureldine M.H.A., Uthman I. et al. (2015) Antiphospholipid syndrome: an update. Eur. J. Clin. Investig., 45: 653–662.

Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T. et al. (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J. Thromb. Haemost., 4: 295–306.

Moore G.W. (2014a) Commonalities and contrasts in recent guidelines for lupus anticoagulant detection. Int. Jnl. Lab. Hem., 36: 364–373.

Moore G.W. (2014b) Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. Semin. Thromb. Hemost., 40: 163–171.

Moore G.W. (2016) Current controversies in lupus anticoagulant detection. Antibodies, 5: 22.

Pengo V., Banzato A., Bison E. et al. (2016) Laboratory testing for antiphospholipid syndrome. Int. Jnl. Lab. Hem., 38(1): 27–31.

Pengo V., Tripodi A., Reber G. et al. (2009) Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J. Thromb. Haemost., 7: 1737–1740.

Sakakura M., Wada H., Watanabe R. et al. (2000) Coagulation tests and antiphospholipid antibodies in patients positive for lupus anticoagulant. Clin. Applied Thromb. Hemost., 6: 144–150.

Swadzba J., Iwaniec T., Pulka M. et al. (2011) Lupus anticoagulant: performance of the tests as recommended by the latest ISTH guidelines. J. Thromb. Haemost., 9: 1776–1783.

Tripodi A. (2007) Laboratory testing for lupus anticoagulants: a review of issues affecting results. Clin. Chemistry, 53(9): 1629–1635.

Tripodi A. (2012) To mix or not to mix in lupus anticoagulant testing? That is the question. Semin. Thromb. Hemost., 38: 385–389.

Tripodi A., deGroot P.G., Pengo V. (2011) Antiphospholipid syndrome: laboratory detection, mechanisms of action and treatment. J. Intern. Med., 270: 110–122.

Современные методы лабораторной диагностики волчаночного антикоагулянта у пациентов с антифосфолипидным синдромом

В.В. Красивская, А.В. Стасишин

Резюме. *Цель — исследовать информативность для диагностики антифосфолипидного синдрома (АФС) рутинных коагулологических и современных методов выявления волчаночного антикоагулянта (ВА) у пациентов с тромбозом и патологией беременности. Объект и методы. У 233 пациентов с подозрением на АФС с тромбозом различной локализации и акушерской патологией выполняли рутинные коагулологические исследования и определяли антифосфолипидные антитела, в частности ВА. Результаты. Согласно международным критериям диагностики у 44,6% обследованных установлен АФС, среди них первичный — у 85,6%, вторичный — у 14,4%. ВА выявлен у 42,5% обследованных, что составляет 95,2% пациентов с АФС. При выполнении рутинных исследований системы гемостаза наличие активности ВА можно заподозрить по удлинению протромбинового времени (ПВ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). На I скрининговом этапе диагностики ВА наибольшая информативность отмечена при комбинировании тестов, основанных на отличных принципах и отвечающих за различные звенья системы гемостаза, в частности времени свертывания с фосфолипидзависимым ядом змеи, АЧТВ с чувствительным к ВА реагентом и ПВ с разведенным тромбопластином в 50 и 500 раз. Выводы. Результаты группы коррекционных тестов не являются надежными и не позволяют принять решение о продолжении или прекращении дальнейшего исследования. Необходимость их выполнения следует рассматривать индивидуально в каждом случае. В связи с высокой информативностью тесты на подтверждение необходимо проводить на II этапе выявления ВА. Полученные результаты сопоставимы с последними методическими рекомендациями 2014 г., которые могут быть применены в качестве стандартов в поиске активности ВА.*

Ключевые слова: *волчаночный антикоагулянт, антифосфолипидные антитела, антифосфолипидный синдром, диагностика.*

Modern metods for laboratory detection of lupus anticoagulant in patients with antiphospholipid syndrome

V.V. Krasivska, O.V. Stasyshyn

Summary. *Aim — to research the informational content for antiphospholipid syndrome (APS) diagnostics of routine coagulological and modern methods of lupus anticoagulant (LA) detection in patients with thrombosis and pregnancy complications. Object and methods. Routine coagulogical research and antiphospholipid antibodies identification, including LA, were carried out in 233 patients with the suspicion of APS with thrombosis in different locations and obstetrical pathologies. Results. According to the international criteria of diagnostics 44.6% patients were diagnosed with APS, among which primary APS — in 85.6% and secondary — in 14.4%. LA was identified in 42.5% patients, which is 95.2% of all patients with APS. While carrying out the routine research of haemostasis system, LA can be detected with the help of prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin time (APTT). On the I screening stage of LA detection the most detailed informational value appears while combining the tests based on differential principals and responsible for various parts of haemostasis, in particular the clotting time with phospholipid dependent diluted viper venom time, APTT with LA-sensitive reagent and prothrombin time with diluted to 50 and 500 times thromboplastin. Conclusions. The correctional tests results are not dependable and do not allow to make a decision as to continuation or termination of the further research. The necessity of their execution should be considered individually. Due to the high informational value, confirmation tests should be carried out on the second stage of LA detection. The obtained results are according to the latest 2014 guidelines, which can be used as standards in LA activity research.*

Key words: *lupus anticoagulant, antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome, diagnosis.*

Адреса для листування:
Красівська Валерія Валеріївна
79044, Львів, вул. Генерала Чупринки, 45
ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»
E-mail: valeriya-krasi@ukr.net

Одержано 18.10.2017