

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВОЛЧАНОЧОГО АНТИКОАГУЛЯНТА.

Мельник А.А., к.б.н.

В последнее время широкое распространение получает исследование и диагностика тромбофилий. К наиболее значимым приобретенным тромбофилиям относится антифосфолипидный синдром (АФС), который представляет собой гетерогенное аутоиммунное заболевание, характеризующееся артериальными и венозными тромбоэмболическими осложнениями с наличием антифосфолипидных антител (аФЛ) (1-3). Поскольку клинические проявления АФС не имеют специфичности, диагноз существенно зависит от обнаружения циркулирующих аФЛ. Эти антифосфолипидные антитела являются аутоантителами, направленными против комплекса фосфолипидов и фосфолипид-связывающих белков (1-4).

Рассмотрение хронологии достижений в области медицинских знаний может дать полезную информацию о патогенезе, диагностике и лечении заболеваний. История изучения антифосфолипидных антител начинается в начале 20-го века с разработки диагностических тестов на сифлис (*Treponema pallidum*), инфекционного заболевания, очень распространенного в то время. Краткая история АФС представлена в таблице 1.

Годы	События
1906 г.	Wasserman A. разработал лабораторный метод диагностики сифилиса. «Реагент Вассермана» представлял собой экстракт печени новорожденных, умерших от врожденного сифилиса. Позже было обнаружено, что вместо них можно использовать экстракты тканей животных, никогда не подвергавшихся воздействию трепонем. Например, этанольный экстракт говяжьего сердца (5).
1938 г.	При скрининговых исследованиях для выявления сифилиса у многих людей обнаруживалась положительная реакция при отсутствии клинических признаков сифилитической инфекции. Феномен получил название «биологическая ложноположительная реакция Вассермана» (Б-ЛПРВ).
1941 г.	Rangborn P.C. установил, что активным компонентом в тест-системе для обнаружения сифилиса является такой фосфолипид как кардиолипин (6).
1952 г.	Conley C.L. и Harman R.C. описали 2-х больных с системной красной волчанкой (СКВ) с хронической Б-ЛПРВ в плазме у которых присутствовал фактор, ингибирующий <i>in vitro</i> реакцию свертывания крови (7).
1972 г.	Feinstein D.I. и Rapaport S.I. предложили термин «волчаночный антикоагулянт» (ВА) (8).
1983 г.	Harris E.N. и соавт. разработали твердофазный радиоиммунный метод, определяющий антитела, реагирующие с кардиолипином (9).
1986 г.	Huges G.R. описал новый клинико-лабораторный симптомокомплекс, получивший название «антикардиолипиновый синдром» (10).
1989 г.	Asherson R.A. сформулировал концепцию АФС (11).

Табл.1. Краткая история изучения антифосфолипидного синдрома.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в понимании патогенеза и клинических проявлений АФС с использованием доказательной базы для применения оптимальной терапии.

Лабораторная диагностика АФС заключается в выявлении антифосфолипидных антител. В качестве достаточного лабораторного критерия может быть любой из 3-х компонентов, определяемый на протяжении не менее 12 недель после клинических проявлений:

1. Волчаночный антикоагулянт в плазме в 2-х или более случаях с интервалом не менее 12 недель;
2. Антикардиолипиновые антитела (аКЛ) класса IgG и/или IgM в сыворотке или плазме в среднем или высоком титре (>40 GPL или MPL, выше 99 перцентиля) с интервалом не менее 12 недель;
3. Анти- $\beta$ 2-гликопротеин I (анти- $\beta$ 2-ГП I) класса IgG и/или IgM в сыворотке или плазме в среднем или высоком титре (>40 GPL или MPL, выше 99 перцентиля) с интервалом не менее 12 недель;

Из этих лабораторных критериев особого внимания заслуживает важность определения ВА, что обусловлено следующим:

1. Именно наличие ВА ассоциируется с развитием тромбозов;
2. Результаты выявления ВА и антикардиолипиновых антител не всегда совпадают. По некоторым данным ВА выявляется чаще, чем аКЛ.

Спектр клинических дисциплин, при которых возникает необходимость исследовать ВА в связи с подозрением на АФС очень широк и включает ревматологию, кардиологию, акушерство, неврологию, хирургию, гематологию, нефрологию и др. медицинские дисциплины. Эти факторы свидетельствуют о необходимости более широкого внедрения в клинику методов определения аФЛ, в том числе и ВА. Диагностика ВА является, с одной стороны, крайне важной в различных областях медицины, а с другой стороны, очень сложной методической задачей.

### Патофизиология волчаночного антикоагулянта.

Волчаночный антикоагулянт представляет собой группу гетерогенных аутоантител (IgG и/или IgM), которые присутствуют в кровообращении и способные связываться с отрицательно заряженными фосфолипидсвязывающими белками, такими как  $\beta$ 2-гликопротеин I и протромбин (12) (рис. 1).

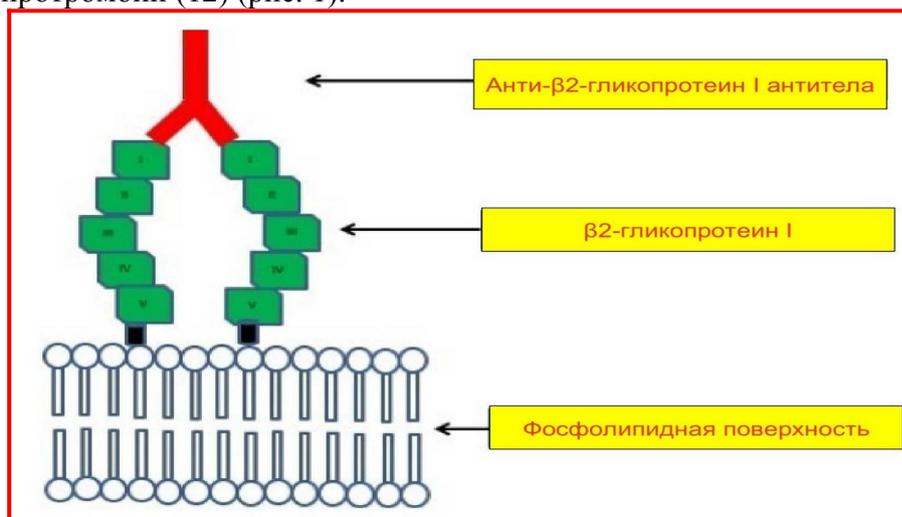


Рис. 1.  $\beta$ 2-гликопротеин I состоит из 5 гомологичных доменов. Домен V связывается с анионной фосфолипидной поверхностью, в то время как антитела к  $\beta$ 2-гликопротеин I связываются с доменом I.

ВА впервые был описан в 1952 году Conley C.L. и Harman R.C. у двух пациентов с СКВ, у которых был геморрагический диатез. Они назвали его «волчанкой», поскольку он был описан у обоих пациентов с диагнозом СКВ, а антикоагулянт приобрел свое название из-за того, что у этих больных отмечалось кровотечение. Термин «волчаночный антикоагулянт» является своего рода парадоксом, потому что большинство пациентов с ВА имеют тромбоз, а не кровотечение. Несмотря на то, что *in vivo* ВА индуцировал тромбозы, *in vitro* приводил к удлинению АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время). Пациенты с увеличенным АЧТВ (при остальных нормальных показателях коагулограммы) не имели выраженных проявлений кровоточивости и в то же время у них могли развиваться тромбозы, т.е. имелась парадоксальная реакция - удлинение АЧТВ и развитие тромбоза. Не у всех пациентов с СКВ есть ВА, и хотя ВА увеличивает время свертывания, он не вызывает кровотечение *in vivo*. Таким образом, термин «волчаночный антикоагулянт» является двойным неправильным обозначением. Механизм возникновения тромбоза у больных с волчаночным антикоагулянтом точно не установлен. Существует ряд механизмов, которые были предложены для объяснения того, как волчаночные антикоагулянты вызывают тромбоз *in vivo*. Некоторые из них заключаются в ингибировании активированного протеина С, нарушении регуляции тромбина, изменению фибринолиза и активации эндотелиальных клеток.

#### **Лабораторные тесты для определения волчаночного антикоагулянта.**

Для возникновения коагуляции необходимы фосфолипидные поверхности на которых образуются коагуляционные комплексы (внешний, внутренний теназный и протромбиназный) с формированием тромбина и конечного продукта фибрина. В случае присутствия ВА в плазме, возникает препятствие прикрепления этих коагуляционных комплексов к поверхности фосфолипидов в анализах коагуляции *in vitro*, если в реагенте присутствует ограниченное количество фосфолипидов. В результате ограниченной концентрации фосфолипидов в реагенте, фосфолипидзависимые анализы на основе сгустка, такие как АЧТВ, удлиняются. Реагенты АЧТВ отличаются по концентрации фосфолипидов, что способствует чувствительности реагента к ВА. Следовательно, в зависимости от концентрации фосфолипидов некоторые реагенты АЧТВ будут более чувствительными к присутствию ВА, что приводит к удлинению АЧТВ (низкая концентрация фосфолипидов), тогда как другие могут быть не такими чувствительными, т.е. показывать нормальные результаты АЧТВ (повышенная концентрация фосфолипида). Это пролонгирование не происходит *in vivo*, поскольку существует неограниченный источник фосфолипидов на тромбоцитах и эритроцитах в кровотоке, а также на эндотелии (13). Клиническая лаборатория играет важную роль в диагностике ВА. Существует ряд различий в лабораторных методах с точки зрения выбора тестов, процесса тестирования и интерпретации при определении ВА (14). Для повышения диагностической точности тестирования ВА экспертные комиссии предложили руководства для лабораторий, которые включают преаналитический, аналитический и постаналитический этапы (табл.2).

<b>Преаналитический этап</b>	<b>Аналитический этап</b>	<b>Постаналитический этап</b>
1. Концентрация цитрата натрия: 0,109 М (3,2 %); в соотношении 9:1 2. Центрифугирование: - первичное – 2000 g, 15 минут; - повторное – 2500 g, 10 минут.	1. Используемые тесты: - АЧТВ, чувствительный к ВА, с активатором оксидом кремния; - время свертывания с ядом гадюки Рассела (dRVVT) 2. Количество скринин-	1. Расчет нормализованного отношения (НО): НО = скрининговое отношение / подтверждающее отношение 2. Границы положительных и отрицательных значений:

<p>3. Замораживание плазмы (-70°C), если ее исследование проводится не сразу</p> <p>4. Получение пула нормальной плазмы с количеством тромбоцитов <math>&lt;10 \times 10^6/\text{мл}</math> и с активностью всех факторов свертывания практически равной 100% (двойное центрифугирование плазмы здоровых доноров)</p>	<p>говых тестов = 2</p> <p>3. Количество подтверждающих тестов = 2</p> <p>4. Использование фосфолипидов в двуслойной или гексагональной (II) фазах</p> <p>5. Использование активатора свертывания диоксида кремния в тесте АЧТВ</p> <p>6. Проведение микст теста без предварительной инкубации при 37 °С</p> <p>7. Наличие адаптации для автоматических коагулометров</p>	<p>НО &gt; 2,0 - ВА резко положительный;</p> <p>НО 1,5-2,0 - ВА положительный;</p> <p>НО 1,2-1,5 - ВА слабо положительный;</p> <p>НО &lt;1,2 - ВА отсутствует</p> <p>3. Расчет ИЦА (Индекс Циркулирующего Антикоагулянта)</p>
---	---	---

Табл.2. Преаналитический, аналитический и постаналитический этапы для определения волчаночного антикоагулянта.

В 2009 году было опубликовано обновленное руководство Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) (15) за которым последовало в 2012 году обновленное руководство Британского комитета по стандартизации в гематологии (BCSH) (16). В 2014 году Институт стандартов клинической лаборатории (CLSI) также опубликовало руководство по обнаружению ВА (17) (Табл.3).

Переменные	ISTH (2009)	BCSH (2012)	CLSI (2014)
<b>Сбор крови</b>	Двойное центрифугирование	Двойное центрифугирование	Двойное центрифугирование
<b>Выбор теста</b>	dRVVT и АЧТВ	dRVVT и АЧТВ и/или другие	dRVVT и АЧТВ и/или другие
<b>Порядок тестирования</b>	Скрин-микст-подтверждение	Скрин-микст-подтверждение	Скрин-подтверждение микст
<b>Значение cut-off</b>	99 перцентилья	97,5 перцентилья	97,5 перцентилья
<b>Микст тест</b>	Смешивание 1:1 с нормальной плазмой пациентов. Интерпретация с специфическим cut-off или ИЦА	Смешивание 1:1 с нормальной плазмой пациентов	Смешивание 1:1 с нормальной плазмой пациентов. Интерпретация с специфическим cut-off или ИЦА
<b>Подтверждающий тест</b>	Расчет фосфолипид-зависимой коррекции в % скринингового и подтверждающего теста или расчет коэффициента ВА скрининг /подтверждение	Расчет фосфолипид-зависимой коррекции в % скринингового и подтверждающего теста или расчет коэффициента ВА скрининг /подтверждение	Расчет фосфолипид-зависимой коррекции в % скринингового и подтверждающего теста или расчет коэффициента ВА скрининг /подтверждение
<b>Тестирование пациентов, принимающих антагонисты витамина К (АВК)</b>	Если МНО < 1,5 плазма не разводится. Если МНО от 1,5 до 3.0 плазма	При скрининговом и подтверждающем тесте разводится 1:1 нормальной плаз-	При скрининговом и подтверждающем тесте разводится 1:1 нормальной плаз-

	разводится 1:1 нормальной плазмой пациента	мой пациента	мой пациента
<b>Тестирование пациентов на нефракционированном гепарине</b>	Интерпретировать с осторожностью	Не рекомендуется	Может определять ВА в некоторых случаях при нейтрализующем эффекте гепарина
<b>Представление результатов</b>	Интерпретация с комментарием	Интерпретация с комментарием	Интерпретация с комментарием

Табл.3. Краткое изложение Руководств ISTH, BCSH и CLSI для лабораторной диагностики волчаночного антикоагулянта.

Для идентификации ВА существует несколько различных методик, выполняемых в клинических лабораториях. К ним относятся тест с разведением яда гадюки Рассела (dRVVT), время свертывания с диоксидом кремния (SCT), гексагональная фаза нейтрализации фосфолипидов (STACLOT-LA), каолиновое время свертывания (KCT), разведение протромбинового времени (dPT), процедура нейтрализации тромбоцитов, ингибирование тканевого тромбопластина и два не так часто используемых теста – время яда тайпана и коэффициент текстарин/экарин (18) (рис.2).

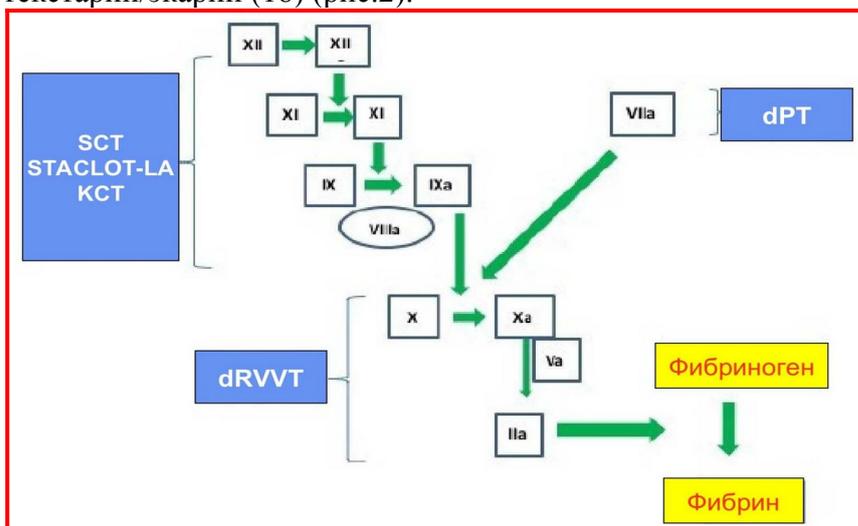


Рис.2. Некоторые из наиболее часто выполняемых тестов для определения волчаночного антикоагулянта и их взаимодействие в каскаде коагуляции.

Поскольку из-за гетерогенности антител к ВА, проведение только единичного теста не позволяет обнаружить ВА, все три экспертные группы рекомендуют лабораториям выполнять по крайней мере два различных анализа, основанные на различных принципах тестирования. К таким анализам относятся тест с разведением гадюки Рассела, время свертывания с диоксидом кремния и нейтрализация гексагональной фазы фосфолипидов.

### 1. Тест с разведением яда гадюки Рассела.

Тест DRVVT признается всеми тремя группами экспертов как один из начальных анализов, которые должны быть включены при скрининге ВА. Ряд исследователей показали, что DRVVT чувствительный к  $\beta 2GP$  I-зависимым антителам и очень сильно коррелируют с тромбозом. Этот анализ основан на активации фактора X (FX), полученным из яда гадюки Рассела (лат. *Daboia russelii*). В присутствии FVa, FXa, фосфолипидов, ионов кальция протромбин превращается в тромбин, который затем превращает фибриноген в фибрин (рис. 3).

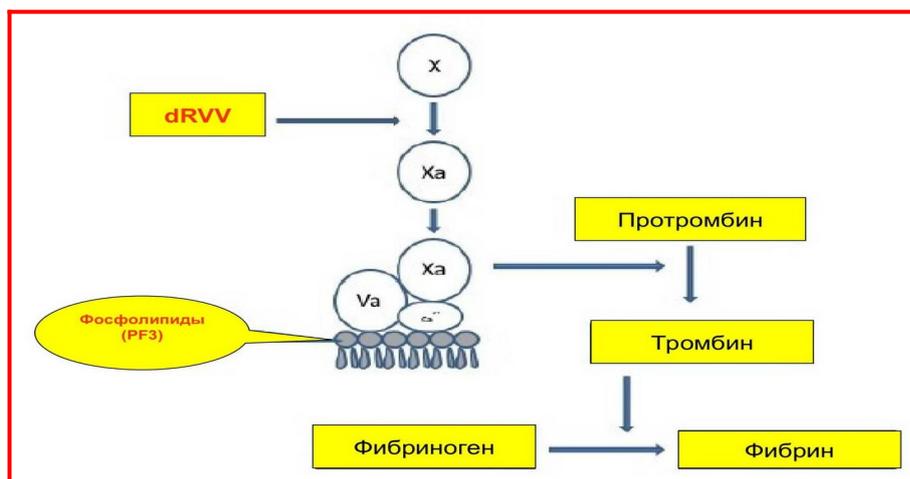


Рис.3. Механизм действия разведенного яда гадюки Рассела на коагуляционный каскад. (Фермент, присутствующий в яде гадюки Рассела, превращает FX в FXa).

Набор DRVVT состоит из двух компонентов. Первый компонент - это реагент, который содержит низкое количество фосфолипидов, что делает его очень чувствительным к присутствию ВА. Когда к реагенту для скрининга добавляют плазму пациента, содержащую ВА, время свертывания увеличивается, поскольку присутствующие в плазме антитела влияют на способность протромбиназного комплекса связываться с поверхностью фосфолипида. Вторым компонентом является подтверждающий реагент, который содержит повышенное количество фосфолипида. Дополнительные фосфолипиды нейтрализуют антитела, обеспечивая увеличенную площадь поверхности для связывания комплекса протромбиназы. Это приводит к сокращению времени свертывания по сравнению с скрининговым анализом (рис. 4).

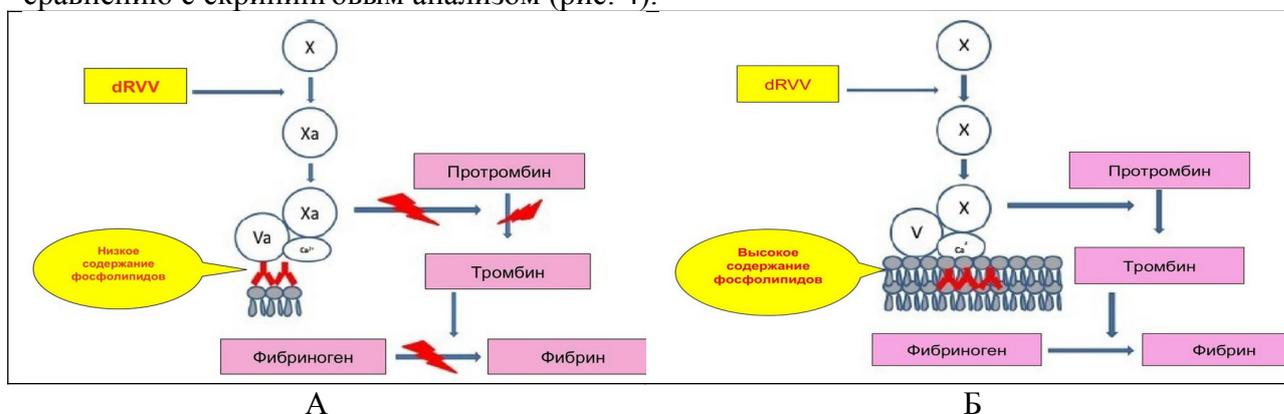


Рис.4. Тест dRVVT (А - скрининговый, Б - подтверждающий).

«Интегрированным» анализом считается одновременное использование скринингового и подтверждающего тестов (19). В нескольких исследованиях было показано, что тест dRVVT специфичен для выявления ВА у пациентов с высоким риском развития тромбоза и является более чувствительными по сравнению с КСТ (20,21). Тем не менее dRVVT может давать ложноположительные результаты у пациентов, получающих антагонисты витамина К. Имеются данные, что антитела к дефициту FV и/или FV мешают проведению анализа (22). Лабораториям рекомендуется производить расчет соотношения скрининга dRVVT (результат скрининга dRVVT пациента/среднее значение скрининга dRVVT нормальной плазмы) и подтверждение dRVVT, т.е. соотношение пациент dRVVT подтверждение/среднее значение подтверждения dRVVT нормальной плазмы) с последующим расчетом интегрированного результата.

## 2. Время свертывания с диоксидом кремния.

Набор SCT или время свертывания с диоксидом кремния (компания WERFEN, Барселона, Испания) является еще одной интегрированной тестовой системой, состоящей из двух компонентов, аналогичных dRVVT. Суспензия коллоидного диоксида кремния используется в реагенте для активации FXII по внутреннему пути (рис. 5).

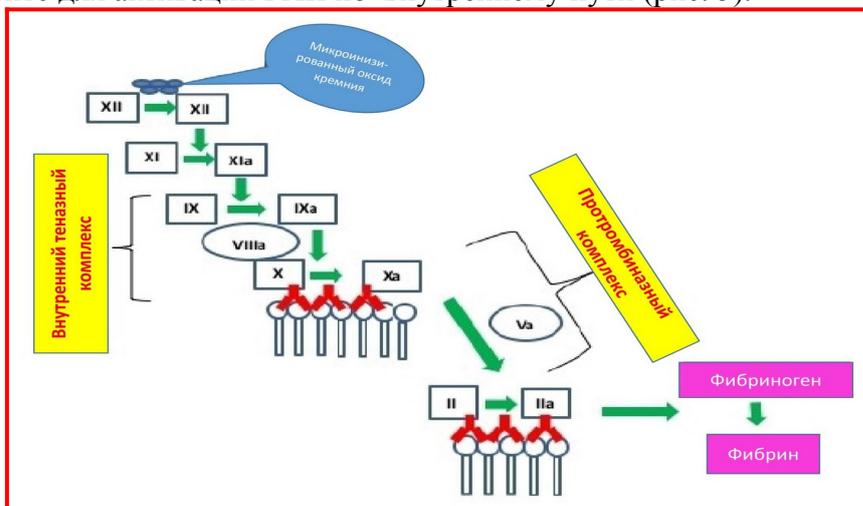


Рис.5. Анализ времени свертывания с диоксидом кремния (SCT).

Микронизированный диоксид кремния используется для активации внутреннего пути. Антитела ВА (красного цвета) препятствуют связыванию внутренних комплексов теназы и протромбиназы на поверхности тромбоцитов.

Плазма пациента, предназначенная для исследования на ВА, добавляется к реагенту, который содержит низкую концентрацию фосфолипида. Низкая концентрация фосфолипидов повышает чувствительность реагента в присутствии ВА, что приводит к увеличению времени свертывания. В подтверждающем тесте плазму пациента добавляют ко второму реагенту, содержащему повышенное количество фосфолипида. Дополнительный фосфолипид нейтрализует антитела путем увеличения площади поверхности для внутренних комплексов теназы и протромбиназы, что сокращает время свертывания. В некоторых исследованиях было показано, что этот анализ является наиболее чувствительным анализом для выявления ВА у пациентов, которые соответствуют клиническим критериям антифосфолипидного синдрома. Этот тест может быть не чувствительным к антагонистам витамина К, а специфические антитела к FVIII могут мешать интерпретации результатов. Рекомендуется, чтобы лаборатории рассчитывали соотношение SCT (результат скрининга пациента/среднее значение нормальной плазмы скрининга), а также отношение подтверждающего теста SCT (результат подтверждения пациентом/среднее значение подтверждения нормальной плазмы) и представляли интегрированный результат как нормализованное отношение (скрининг/подтверждение). Соотношение  $> 1,16$  свидетельствует о присутствии ВА (23).

## 3. Гексагональная фаза нейтрализации фосфолипидов.

Набор STACLOT<sup>®</sup>LA (компания STAGO, Asnières sur Seine, France) или нейтрализация гексагональной фазы представляет собой интегрированный анализ, в котором плазму пациента смешивают с нормальной контрольной плазмой и инкубируют в присутствии и в отсутствие такого фосфолипида как фосфатидилэтаноламина (HPE) гексагональной фазы (II). Затем для обоих образцов выполняется определение АЧТВ с использованием чувствительного к ВА реагента (низкая концентрация фосфолипидов). Если ВА присутствует, он будет нейтрализован HPE, что приведет к более короткому времени свертывания по сравнению с образцом, инкубированным в отсутствие HPE. Предназначение нормальной плазмы, используемой в смеси пациентов, состоит в коррекции дефицита факторов. В случае, если не происходит сокращения времени

свертывания в пробирке, содержащей НРЕ, следует заподозрить специфический ингибитор фактора, а не ВА. Результаты представляют как разницу во времени свертывания между пробирками без НРЕ минус пробирки, содержащие НРЕ (рис. 6). Этот анализ не зависит от АВК (24). Лаборатории должны определить свое собственное значение cut-off. Однако разница  $\geq 8$  свидетельствует о присутствии ВА (25).

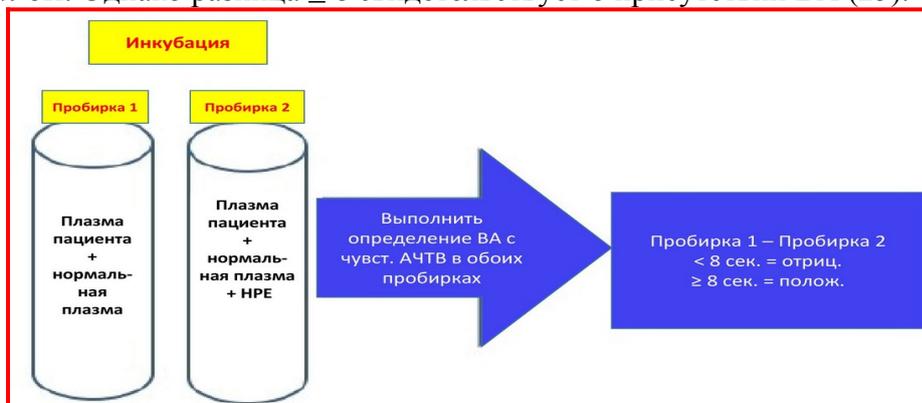


Рис.6. Выполнение теста «гексагональная фаза нейтрализации фосфолипидов».

Плазму пациента плюс нормальную плазму инкубируют в отсутствии НРЕ (пробирка 1) и в присутствии НРЕ (пробирка 2). АЧТВ выполняется с использованием реагента, чувствительного к ВА. Время свертывания пробирки 1 сравнивается с пробиркой 2. Если ВА присутствует, тогда результаты, полученные вычислением пробирка 1 минус пробирка 2 должна быть  $\geq$  установленной пороговой величины.

#### 4. Микст-тест.

Тест смешивания АЧТВ часто применяется для выявления наличия ингибитора или дефицита факторов при необъяснимом повышенном АЧТВ. Плазму пациента (ПП) смешивают с пулом нормальной плазмы (ПНП) и образец тестируют сразу или после инкубации в течение 60-120 минут при  $37^{\circ} \text{C}$  на водяной бане. Существуют различные соотношения смешивания ПП и ПНП, которые можно использовать, однако чаще всего применяют соотношение 1 : 1. Если тест смешивания не удается скорректировать как в непосредственной смеси, так и в инкубированной смеси, это предполагает присутствие циркулирующего ингибитора. В случае ВА, ингибитор идентифицируется с помощью специального анализа ВА. При интерпретации тестов на смешивание следует соблюдать осторожность, поскольку слабый ингибитор может быть замаскирован при добавлении ПНП к ПП. «Корректировка» в тестах на смешивание варьируется в зависимости от лаборатории. Некоторые лаборатории могут выбрать выражение коррекции относительно нормального эталонного интервала АЧТВ (RI) (в пределах от 2 до 3 стандартных отклонений RI) или заранее определенного количества секунд выше верхнего предела RI. Лаборатории также могут использовать формулу для расчета «процента коррекции» плазмы времени свертывания пациента на основе индекса циркулирующего антикоагулянта (ИЦА), также известного как индекс Рознера (26).

Индекс ИЦА/Рознера – это локально определенное значение с интервалом обычно 10-20% (в среднем 15%). Имеет специфичность – 98-100% и чувствительность – 55-68%.

АЧТВсек (разв. плазма 1:1) – АЧТВсек (нормальная плазма)

$$\text{ИЦА} = \frac{\text{АЧТВсек (разв. плазма 1:1)} - \text{АЧТВсек (нормальная плазма)}}{\text{АЧТВсек (пациента)}} \times 100 \%$$

Интерпретация результатов:

- ИЦА  $< 15\%$  - является коррекцией (истинный дефицит факторов);
- ИЦА  $> 15\%$  - не является коррекцией (ингибитор).

Необходимо отметить, что для коррекции АЧТВ достаточно 30 – 50 % активности факторов свертывания.

CLSI (H60A) рекомендует представлять результаты в тестах смешивания как нормализованное соотношение, а не как время свертывания в секундах. Тест смешивания может быть выполнен как отдельный тест смешивания, как описано выше, или интегрирован в dRVVT или SCT. Интегрированный тест смешивания выполняется только для немедленной смеси и никогда не инкубируется. Все три экспертные группы включают тест смешивания в свои руководящие принципы.

Пример интерпретации результатов при определении ВА представлен в таблице 4.

ВА -1 Скрининговый тест		ВА-2 Подтверждающий тест		Диагностика
Плазма пациента	Смесь (Пациент + норма)	Плазма пациента	Смесь (Пациент + норма)	
Норма	Норма	Норма	Норма	ВА не определен
Удлинение	Удлинение	Норма	Норма	ВА присутствует
Удлинение	Норма	Удлинение	Норма	Дефицит факторов/Анти-коагулянтная терапия. ВА – нет.
Удлинение	Удлинение	Удлинение	Норма	Дефицит факторов и ВА
Удлинение	Удлинение	Удлинение	Удлинение	Не возможно подтвердить присутствие или отсутствие ВА. Возможно присутствует другой ингибитор.

Табл. 4. Интерпретация результатов при определении ВА.

### Как рассчитывается нормализованный коэффициент скрининг/подтверждение.

#### Шаг 1 – Скрининговый коэффициент

Время свертывания пациента (сек)/Время свертывания контрольной плазмы (сек)

< 1,2 = Норма. СТОП тест – ВА отрицательный

≥ 1,2 = Удлинение. Перейти к шагу 2.

#### Шаг 2 – Подтверждающий коэффициент

Время свертывания пациента (сек)/Время свертывания контрольной плазмы (сек)

< 1,2 = Норма. СТОП тест – Перейти к шагу 3.

≥ 1,2 = Удлинение. Перейти к шагу 4.

#### Шаг 3 - Расчет нормализованного коэффициента скрининг.подтверждение

Скрининговый коэффициент должен быть ≥ 1,2

Подтверждающий коэффициент должен быть < 1,2

Скрининговый коэффициент/ подтверждающий коэффициент ≥ 1,2 – ВА положительный

- 1,2 – 1,5 = слабо положительный

- >1,5 - < 2 = умеренно положительный

> 2 = выраженный положительный

#### **Шаг 4 – Тест смешивания (1:1 плазма пациента к контрольной плазме)**

Микст скрининговый/контроль скрининговый

-  $< 1,2$  = Норма. Стоп тест – ВА отрицательный плюс дефицит факторов

-  $\geq 1,2$  = Удлинение. Проведение подтверждающего теста.

Микст подтверждающий/контроль подтверждающий

-  $\geq 1,2$  = Удлинение. Нельзя подтвердить присутствие или отсутствие (возможно присутствие альтернативного ингибитора)

-  $< 1,2$  = Перейдите к расчету нормализованного коэффициента микст теста

Микст нормализованного коэффициента

- Микст скрининговый коэффициент/микст подтверждающий коэффициент

- Если  $\geq 1,2$  = ВА положительный плюс дефицит факторов.

#### **Ограничения методов для определения ВА.**

Результаты АЧТВ теста, проведенного для одного и того же пациента в разных лабораториях могут значительно отличаться. Очень важными факторами при проведении теста являются метод детекции, температура, рН, способ сбора крови, тип антикоагулянта, время и метод хранения проб. Методика сбора крови и ее хранения должны быть стандартизированы, а неожиданные результаты проверены другими методиками. Присутствие в пробе пациентов фрагментов тромбоцитов может вызвать высвобождение фосфолипидов, которые способны нейтрализовать ВА (в случае их наличия в пробе). Не рекомендуется использование малых объемов проб, так как рН в таких пробах менее стабилен. На тест АЧТВ влияют различные лекарственные препараты. Его удлинение наблюдается при приеме дифенина (дифенилгидантоин), гепарина, варфарина и препаратов, применяемых в рентгенографии. Уменьшение АЧТВ отмечается при приеме пероральных контрацептивов (особенно эстрогенов). Таким образом, лаборатория должна сама устанавливать референсные значения для пациентов и стандартизировать условия проведения тестирования.

#### **Заключение**

Относительно стратегий тестирования ВА между группами экспертов остаются некоторые разногласия. Существует ряд важных факторов, которые следует учитывать при выполнении тестирования ВА. К таким факторам относится тип реагента для скрининга АЧТВ, тип(ы) и количество специфичных для ВА анализов, которые необходимо включить в панель, определение соответствующих пороговых значений для ВА-специфических анализов, включать ли исследование смешивания в качестве отдельного анализа или интегрировать в ВА-специфический анализ. Тщательное понимание преаналитических, аналитических и постаналитических переменных, которые мешают тестированию и интерпретации ВА имеет важное значение для улучшения тестирования и диагностики. Ни один из используемых на сегодняшний день тестов для обнаружения ВА не обладает равной аналитической чувствительностью в отношении всех разновидностей антител, присутствие которых обуславливает данный феномен. Совершенно очевидно, что существует необходимость в улучшенной гармонизации руководящих принципов между группами экспертов для упрощения стратегий тестирования и повышения диагностической точности анализов. Идеальным считается разработка единого анализа, который возможно будет использовать в будущем как альтернативу нынешним методам тестирования для распознавания неоднородной природы ВА.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nichols WL, Kottke-Marchant K, Ledford-Kraemer MR, Homburger HA, Cardel LK. Lupus anticoagulants, antiphospholipid antibodies, and antiphospholipid syndrome. In: Kottke-Marchant K and Davis BH, eds. *Laboratory hematology practice*. 1st ed. Oxford: WileyBlackwel;2012:509-25.
2. Krilis SA, Giannakopoulos B. Laboratory methods to detect antiphospholipid antibodies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014:321-8.
3. Pengo V, Banzato A, Bison E, Denas G, Zoppellaro G, Bracco A, et al. Laboratory testing for antiphospholipid syndrome. *Int J Lab Hematol* 2016;38:27-31.
4. 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;4:295-306.
5. Wasserman, A., Neisser, A. & Bruck, C. (1906) Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. *Deutscher Medizinische. Wochenschrift*, 32, 745– 746.
6. Pangborn, M.C. (1941) A new serologically active phospholipid from beef heart. *Proceedings of the Society of Experimental Biology (NY)*, 48, 484– 486.
7. Conley, C. & Hartmann, R.C. (1952) A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, 31, 2.
8. Feinstein, D.I., Rapaport, S.I. 1972. Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog. Hemost. Thromb.* 1, 75-95.
9. Harris, E.N., Gharavi, A.E., Boey, M.L., Patel, B.M., Mackworth-Young, C.G., Loizou, S. & Hughes, G.R. (1983) Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *The Lancet*, 2, 1211–1214.
10. Huges G.R.V. 1983. Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. *Br.Med.J.* 287. 1088-1089.
11. Asherson, R.A., Khamashta, M.A., Ordi-Ros, J. et al. 1989. The ‘primary’ antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 68, 366-374.
12. Tripodi, A. Laboratory Testing for Lupus Anticoagulants: A Review of issues affecting results. *Clinical Chemistry*. 2007;53:1629-35.
13. Giannakopoulos, B, Passam, F, Rahgozar, S, Krilis, SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2007;109:422-30.
14. Dembitzer, FR, Ledford-Kraemer, MR, Meijer, P, Peerschke, EIB. Lupus anticoagulant testing: performance and practices by North American clinical laboratories. *Am J Clin Pathol*. 2010;134:764-73.
15. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2009; 7:1737-40.
16. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2012;157:4758.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory testing for the lupus anticoagulant: approved guideline. H60-A. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute;2014.
18. Practical-Haemostasis.com, A Practical Guide to Laboratory Haemostasis [homepage on the Internet]. Available from: <http://practical-haemostasis.com/>, last accessed 6/16/2016.
19. Teruya, J, West, AG, Suel, MN. Lupus anticoagulant assays: questions answered and to be answered. *Arch Pathol Lab med*. 2007;131:885-9.
20. Galli, M, Finazzi, G, Bevers, EM, Barbui, T. Kaolin clotting time and dilute Russell viper venom time distinguish between prothrombin-dependent and beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies. *Blood*. 1995;86:617-23.

21. Pengo, V, Biasiolo, A, Rampazzo, P, Rocco, T. dRVVT is more sensitive than KCT or TTI for detecting lupus anticoagulant activity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies. *Thromb Haemost.* 1999;81:256-8.
22. dRVVT Screen / dRVVT Confirm [package insert]. Instrumentation Laboratory, Bedford, MA; 2012.
23. Silica Clotting Time [package insert]. Instrumentation Laboratory, Bedford, MA; 2014.
24. Funk, DM. Coagulation assays and anticoagulant monitoring. *ASH Education Book.* 2012;2012:460-65.
25. STACLOT®LA [package insert]. STAGO, Asnières sur Seine, France; 2009
26. CLSI. One-Stage Prothrombin Time (PT) Time Test and Activated Partial Thromboplastin Time Test (APTT); Approved Guideline, Second Edition. CLSI document H47-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.