

Характеристика лабораторних методів діагностики вовчакового антикоагулянту

Останнім часом широкого поширення набувають дослідження та діагностика тромбофілій. До найзначущіших набутих тромбофілій належить антифосфоліпідний синдром (АФС), який являє собою гетерогенне автоімунне захворювання, що характеризується артеріальними й венозними тромбоемболічними ускладненнями з наявністю антифосфоліпідних антитіл (АФЛ) [1-3]. Оскільки клінічні прояви АФС не мають специфічності, діагноз істотно залежить від виявлення циркулювальних АФЛ. Ці АФЛ є автоантитілами, спрямованими проти комплексу фосфоліпідів і фосфоліпідозв'язувальних білків [1-4].

Розгляд хронології досягнень у галузі медичних знань може надати корисну інформацію про патогенез, діагностику та лікування захворювань. Історія вивчення АФЛ бере свій початок на зорі ХХ століття з розробки діагностичних тестів на сифіліс (*Treponema pallidum*) – дуже поширеного на той час інфекційного захворювання. Стислу історію АФС представлено в таблиці 1.

Таблиця 1. Стисла історія вивчення АФС	
Роки	Події
1906	A. Wasserman розробив лабораторний метод діагностики сифілісу. «Реагент Вассермана» являв собою екстракт печінки новонароджених, померлих від уродженого сифілісу. Пізніше було виявлено, що замість цього можна використовувати екстракти тканин тварин, які ніколи не піддавалися впливу трепонем. Наприклад, етанольний екстракт яловичого серця [5]
1938	При скринінгових дослідженнях виявлення сифілісу в багатьох людей спостерігалася позитивна реакція за відсутності клінічних ознак сифілітичної інфекції. Феномен дістав назву біологічної хибнопозитивної реакції Вассермана (БХПРВ)
1941	R.C. Pangborn установив, що активним компонентом у тест-системі для виявлення сифілісу є такий фосфоліпід, як кардіоліпін [6]
1952	C.L. Conley та R.C. Harman описали 2 хворих, які мали системний червоний вовчак (СЧВ) із хронічною БХПРВ, у плазмі котрих був фактор, що інгібує <i>in vitro</i> реакцію зсідання крові [7]
1972	D.I. Feinstein і S.I. Rapaport запропонували термін «вовчаковий антикоагулянт» (ВА) [8]
1983	E.N. Harris і співавт. розробили твердофазний радіоімунний метод, який визначає антитіла, що реагують із кардіоліпіном [9]
1986	G.R. Hughes описав новий клініко-лабораторний симптомокомплекс, який дістав назву антикардіоліпінового синдрому [10]
1989	R.A. Asherson сформулював концепцію АФС [11]

На сьогодні досягнуто значних успіхів у розумінні патогенезу та клінічних проявів АФС із використанням доказової бази для застосування оптимальної терапії.

Лабораторна діагностика АФС полягає у виявленні АФЛ. Достатнім лабораторним критерієм може бути будь-який із трьох компонентів, що визначається протягом не менш як 12 тиж після клінічних проявів:

- 1) ВА в плазмі у ≥ 2 випадках з інтервалом не менш як 12 тиж;
- 2) антикардіоліпінові антитіла (АКЛ) класу IgG та/або IgM у сироватці чи плазмі в середньому чи високому титрі (>40 GPL або MPL, >99 перцентилу) з інтервалом не менш як 12 тиж;
- 3) анти- β_2 -глікопротеїн I (анти- β_2 -ГП I) класу IgG та/або IgM у сироватці чи плазмі в середньому

чи високому титрі (>40 GPL або MPL, >99 перцентилу) з інтервалом не менш як 12 тиж.

Із цих лабораторних критеріїв на особливу увагу заслуговує важливість визначення ВА, що зумовлено таким:

- ✓ саме наявність ВА асоціюється з розвитком тромбозів;
- ✓ результати виявлення ВА й АКЛ не завжди збігаються. За деякими даними, ВА виявляється частіше, ніж АКЛ.

Спектр клінічних дисциплін, за яких виникає необхідність досліджувати ВА у зв'язку з підозрою на АФС, дуже широкий і містить ревматологію, кардіологію, акушерство, неврологію, хірургію, гематологію, нефрологію й інші медичні дисципліни. Ці чинники свідчать про необхідність ширшого впровадження в клініку методів визначення АФЛ, зокрема й ВА. Діагностика ВА є, з одного боку, вкрай важливою в різних галузях медицини, а з другого – це дуже складне методичне завдання.

Патофізіологія ВА

ВА являє собою групу гетерогенних автоантитіл (IgG та/або IgM), задіяних у кровообігу, здатних зв'язуватися з негативно зарядженими фосфоліпідозв'язувальними білками, як-от β_2 -глікопротеїн I і протромбін [12] (рис. 1).

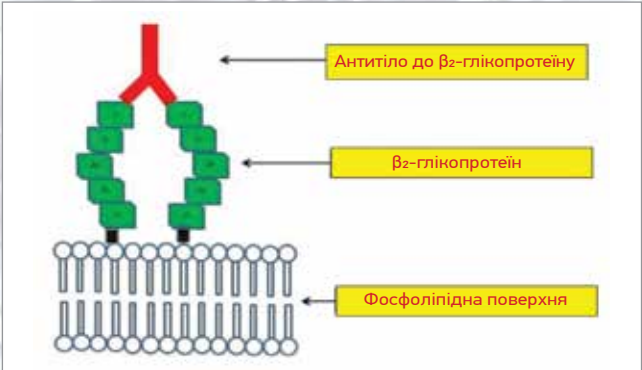


Рис. 1. β_2 -глікопротеїн I складається з п'яти гомологічних доменів (домен V зв'язується з аніонною фосфоліпідною поверхнею, тоді як антитіла до β_2 -глікопротеїну I – з доменом I)

ВА вперше був описаний у 1952 р. C.L. Conley та R.C. Harman у 2 пацієнтів із СЧВ, які мали геморагічний діатез; вони назвали його вовчаком, оскільки він був описаний в обох пацієнтів із СЧВ, а антикоагулянт має таку назву через те, що в цих хворих спостерігалася кровотеча. Термін ВА є своєрідним парадоксом, адже більшість пацієнтів із ВА мають тромбоз, а не кровотечу. Незважаючи на те що *in vivo* ВА індукував тромбози, *in vitro* він спричиняв подовження активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ). Пацієнти зі збільшеним АЧТЧ (за інших нормальних показників коагулограми) не мали проявів кровотечі та водночас у них могли розвиватися тромбози, тобто з'явилася парадоксальна реакція – подовження АЧТЧ і розвиток тромбозу. Не в усіх пацієнтів із СЧВ є ВА; і, хоча ВА збільшує час зсідання, він не спричиняє кровотечі *in vivo*. Отже, термін ВА є подвійним неправильним позначенням. Механізм виникнення тромбозу у хворих із ВА точно не встановлено. Існує низка механізмів, які були запропоновані для пояснення того, як ВА зумовлюють тромбоз

in vivo. Деякі з них полягають в інгібуванні активованого протейну С, порушенні регуляції тромбіну, зміні фібринолізу й активації ендотеліальних клітин.

Лабораторні тести для визначення ВА

Для виникнення коагуляції потрібні фосфоліпідні поверхні, на яких утворюються коагуляційні комплекси (зовнішній, внутрішній теназний, протромбіназний) із формуванням тромбіну та кінцевого продукту фібрину. За наявності ВА в плазмі з'являється перешкода для прикріплення цих коагуляційних комплексів до поверхні фосфоліпідів в аналізах коагуляції *in vitro*, якщо в реагенті є обмежена кількість фосфоліпідів. У результаті обмеженої концентрації фосфоліпідів у реагенті фосфоліпідозалежні аналізи на основі згустка, як-от АЧТЧ, подовжуються. Реагенти АЧТЧ відрізняються концентрацією фосфоліпідів, що сприяє чутливості реагенту до ВА. Отже, залежно від концентрації фосфоліпідів деякі реагенти АЧТЧ виявлятимуться чутливішими до ВА, що зумовлює подовження АЧТЧ (низька концентрація фосфоліпідів), тоді як інші можуть бути не такими чутливими та демонструвати нормальні результати АЧТЧ (підвищена концентрація фосфоліпідів). Це пролонгування не відбувається *in vivo*, оскільки існує необмежене джерело фосфоліпідів на тромбоцитах та еритроцитах у кровотоці, а також на ендотелії [13].

Клінічна лабораторія відіграє важливу роль у діагностиці ВА. Існує низка відмінностей у лабораторних методах щодо обрання тестів, процесу тестування й інтерпретації стосовно ВА [14]. Для підвищення діагностичної точності тестування ВА експертні комісії запропонували настанови для лабораторій, які містять преаналітичний, аналітичний і постаналітичний етапи (табл. 2).

Таблиця 2. Преаналітичний, аналітичний і постаналітичний етапи для визначення ВА		
Преаналітичний етап	Аналітичний етап	Постаналітичний етап
1. Концентрація цитрату натрію: 0,109 М (3,2%) у співвідношенні 9:1. 2. Центрифугування: • первинне – 2000 г, 15 хв; • повторне – 2500 г, 10 хв. 3. Заморожування плазми (-70 °C), якщо її дослідження проводиться не відразу. 4. Отримання пулу нормальної плазми з кількістю тромбоцитів $<10 \times 10^6$ /мл і з активністю всіх факторів зсідання, практично рівної 100% (подвійне центрифугування плазми здорових донорів)	1. Застосовані тести: – АЧТЧ, чутливий до ВА, з активатором – оксидом кремнію; – час зсідання з отрутою гадюки Рассела (dRVVT). 2. Кількість скринінгових тестів – 2. 3. Кількість підтверджувальних тестів – 2. 4. Використання фосфоліпідів у двохшаровій або гексагональній (II) фазах. 5. Застосування факторів зсідання, активатора зсідання – діоксиду кремнію (в тесті АЧТЧ). 6. Проведення міст-тесту без попередньої інкубації при 37 °C. 7. Наявність адаптації для автоматичних коагулометрів	1. Розрахунок нормалізованого відношення (НВ): НВ = скринінгове відношення / підтверджувальне відношення. 2. Межі позитивних і негативних значень: НВ $>2,0$ – ВА різко позитивний; НВ 1,5-2,0 – ВА позитивний; НВ 1,2-1,5 – ВА слабо-позитивний; НВ $<1,2$ – ВА відсутній. 3. Розрахунок індексу циркулювального антикоагулянту (ІЦА)

У 2009 р. опубліковано оновлену настанову Міжнародного товариства з тромбозу та гемостазу (ISTH) [15] щодо виявлення ВА, після чого у 2012 р. було видано оновлену настанову Британського комітету зі стандартизації в гематології (BCSH) [16]. У 2014 р. Інститут клінічних і лабораторних стандартів (CLSI) також опублікував настанову з виявлення ВА [17] (табл. 3).

Таблиця 3. Стислий варіант настанов ISTH, BCSH та CLSI для лабораторної діагностики ВА			
Змінні	ISTH (2009)	BCSH (2012)	CLSI (2014)
Збір крові	Подвійне центрифугування	Подвійне центрифугування	Подвійне центрифугування
Обрання тесту	dRVVT й АЧТЧ	dRVVT, АЧТЧ та/або ін.	dRVVT, АЧТЧ та/або ін.
Порядок тестування	Скрин-мікст-підтвердження	Скрин-мікст-підтвердження	Скрин-мікст-підтвердження
Значення cut-off	99 процентилів	97,5 процентилів	97,5 процентилів
Мікст-тест	Змішування у співвідношенні 1:1 з нормальною плазмою пацієнтів. Інтерпретація зі специфічним cut-off або ІЦА	Змішування у співвідношенні 1:1 з нормальною плазмою пацієнтів	Змішування у співвідношенні 1:1 з нормальною плазмою пацієнтів. Інтерпретація зі специфічним cut-off або ІЦА
Підтверджувальний тест	Розрахунок фосфоліпідозалежної корекції у % скринінгового та підтверджувального тестів або коефіцієнта ВА (скринінг / підтвердження)	Розрахунок фосфоліпідозалежної корекції у % скринінгового та підтверджувального тестів або коефіцієнта ВА (скринінг / підтвердження)	Розрахунок фосфоліпідозалежної корекції у % скринінгового та підтверджувального тестів або коефіцієнта ВА (скринінг / підтвердження)
Тестування пацієнтів, які приймають антагоністи вітаміну К (АВК)	Якщо МНВ <1,5, плазма не розводиться. Якщо МНВ від 1,5 до 3,0, плазма розводиться у співвідношенні 1:1 з нормальною плазмою пацієнта	При скринінговому та підтверджувальному тестах розводиться у співвідношенні 1:1 з нормальною плазмою пацієнта	При скринінговому та підтверджувальному тестах розводиться у співвідношенні 1:1 з нормальною плазмою пацієнта
Тестування пацієнтів на нефракційному гепарині	Інтерпретувати з обережністю	Не рекомендується	Може визначати ВА в деяких випадках за нейтралізуючого ефекту гепарину
Подання результатів	Інтерпретація з коментарем	Інтерпретація з коментарем	Інтерпретація з коментарем

Для ідентифікації ВА існує декілька різних методик, що застосовуються в клінічних лабораторіях. До них належать тест із розведенням отрути гадюки Рассела (dRVVT), час зсідання з діоксидом кремнію (SCT), гексагональна фаза нейтралізації фосфоліпідів (STACLOT-LA), каоліновий час зсідання (KCT), розведення протромбінового часу (dPT), процедура інгібування тканинного тромбoplastину та два не так часто використовувані тести – час отрути тайпану та коефіцієнт текстарин/екарин [18] (рис. 2).

Оскільки через гетерогенність антитіл до ВА проведення лише одиничного тесту не дає змоги виявити ВА, всі три експертні групи рекомендують лабораторіям виконувати щонайменше два різні аналізи, засновані на відмінних принципах тестування. До таких аналізів належать тест dRVVT, SCT і STACLOT-LA.

Тест dRVVT

Тест dRVVT визнається всіма трьома групами експертів як один із початкових аналізів, які мають бути здійснені під час скринінгу ВА.

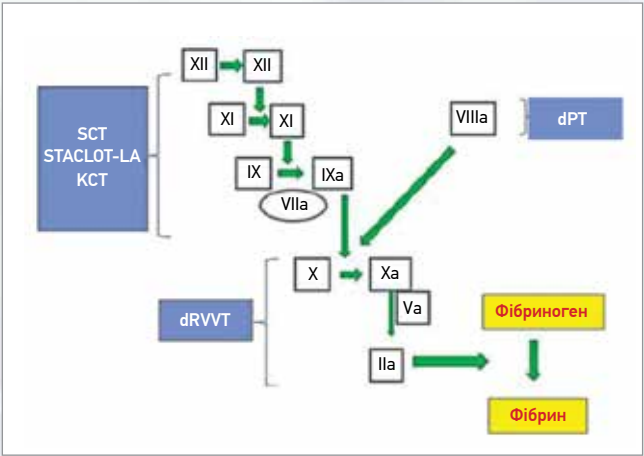


Рис. 2. Деякі з найчастіше виконуваних тестів для визначення ВА та їхня взаємодія в каскаді когуляції

Низка дослідників довела, що dRVVT чутливий до β_2 GPI-залежних антитіл і дуже корелює з тромбозом. Цей аналіз заснований на активації фактора X (FX), отриманого з отрути гадюки Рассела (*Daboia russelii*). За наявності FVa, FXa, фосфоліпідів, іонів кальцію протромбін перетворюється на тромбін, який згодом перетворює фібриноген на фібрин (рис. 3).

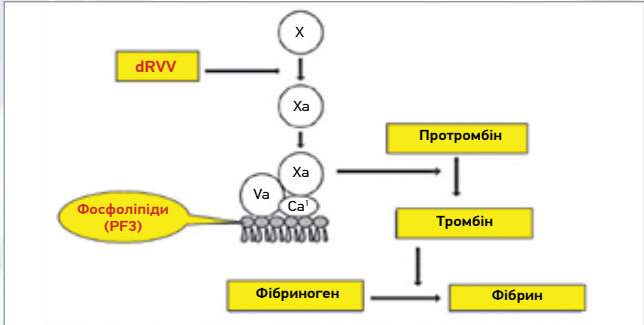


Рис. 3. Механізм дії розведеної отрути гадюки Рассела на коагуляційний каскад (фермент, наявний в отруті гадюки Рассела, перетворює FX на FXa)

Набір dRVVT складається з двох компонентів; перший – реагент, який містить низьку кількість фосфоліпідів, що робить його дуже чутливим до ВА. Коли до реагенту для скринінгу додають плазму пацієнта, що містить ВА, час зсідання збільшується, оскільки антитіла, наявні в плазмі, впливають на здатність протромбіназного комплексу зв'язуватися з поверхнею фосфоліпідів. Другим компонентом є підтверджувальний реагент, який містить підвищену кількість фосфоліпідів. Додаткові фосфоліпіди нейтралізують антитіла, забезпечуючи збільшену площу поверхні зв'язування комплексу протромбінази, що спричиняє скорочення часу зсідання порівняно зі скринінговим аналізом (рис. 4).

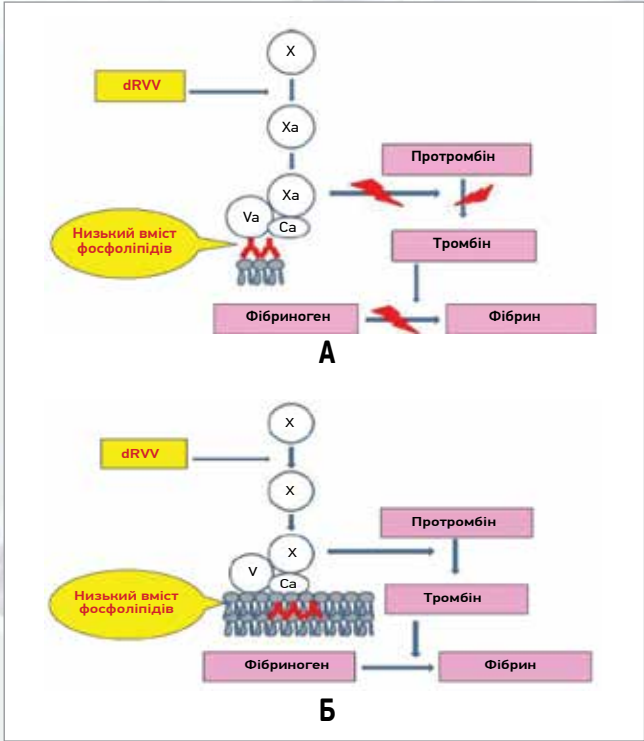


Рис. 4. Тест dRVVT (А – скринінговий, Б – підтверджувальний)

Інтегрованим аналізом вважається одночасне використання скринінгового та підтверджувального тестів [19]. У декількох дослідженнях продемонстровано, що тест dRVVT є специфічним для виявлення ВА в пацієнтів із високим ризиком розвитку тромбозу та чутливішим порівняно з КСТ [20, 21]. Проте dRVVT може надавати хибнопозитивні результати в пацієнтів, які отримують АВК. Існують дані, що антитіла до дефіциту FV заважають проведенню аналізу [22]. Лабораторіям рекомендується здійснювати розрахунок співвідношення скринінгу dRVVT (результат скринінгу dRVVT пацієнта / середнє значення скринінгу dRVVT нормальної плазми та підтвердження dRVVT, тобто співвідношення хворого dRVVT підтвердження / середнє значення підтвердження dRVVT нормальної плазми) з подальшим розрахунком інтегрованого результату.

SCT

Набір SCT (компанія WERFEN, м. Барселона, Іспанія) є ще однією інтегрованою тестовою системою, що складається з двох компонентів, аналогічних dRVVT. Суспензія колоїдного діоксиду кремнію використовується в реагенті для активації FXII внутрішнім шляхом (рис. 5).

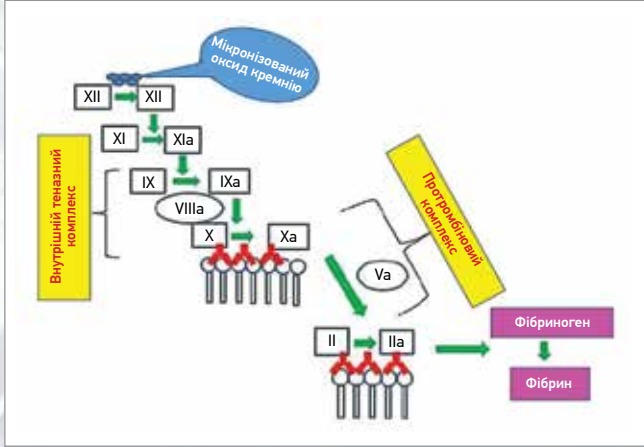


Рис. 5. Аналіз часу зсідання з діоксидом кремнію (SCT). Мікронізований діоксид кремнію використовується для активації внутрішнього шляху. Антитіла ВА (червоного кольору) перешкоджають зв'язуванню внутрішніх комплексів тенازی та протромбінази на поверхні тромбоцитів

Плазма пацієнта, призначена для дослідження на ВА, додається до реагенту, що містить низьку концентрацію фосфоліпідів. Така концентрація підвищує чутливість реагенту за наявності ВА, що зумовлює збільшення часу зсідання. У підтверджувальному тесті плазму пацієнта додають до другого реагенту, що містить підвищену кількість фосфоліпідів. Додатковий фосфоліпід нейтралізує антитіла шляхом збільшення площі поверхні для внутрішніх комплексів тенازی та протромбінази, що скорочує час зсідання. У деяких дослідженнях було показано, що цей аналіз є найчутливішим аналізом виявлення ВА в пацієнтів, які відповідають клінічним критеріям АФС. Цей тест може бути нечутливим до АВК, а специфічні антитіла FVIII здатні заважати інтерпретації результатів. Рекомендується, щоб лабораторії розраховували співвідношення SCT (результат скринінгу пацієнта / середнє значення нормальної плазми скринінгу), а також співвідношення підтверджувального тесту SCT (результат підтвердження пацієнтом / середнє значення підтвердження нормальної плазми) та представляли інтегрований результат як нормалізоване співвідношення (скринінг/підтвердження). Співвідношення >1,16 свідчить про наявність ВА [23].

Далі буде .

Характеристика лабораторних методів діагностики вовчакового антикоагулянту

Продовження. Початок у № 12 (529), 2022 р.
STACLOT-LA

Набір STACLOT-LA (компанія STAGO, м. Аньєр-сюр-Сен, Франція) являє собою інтегрований аналіз, у якому плазму пацієнта змішують із нормальною контрольною плазмою й інкубують за наявності та за відсутності такого фосфоліпиду, як фосфатидилетаноламін (HPE) гексагональної фази (II). Згодом для обох зразків визначається АЧТЧ із використанням чутливого до ВА реагенту (низька концентрація фосфоліпідів). Якщо ВА наявний, його нейтралізує HPE, а це спричинить коротший час зсідання порівняно зі зразком, інкубованим без HPE. Призначення нормальної плазми, що використовується в суміші пацієнтів, полягає в корекції дефіциту факторів. Якщо не відбувається скорочення часу зсідання в пробірці, що містить HPE, слід запідозрити специфічний інгібітор фактора, а не ВА. Результати становлять різницю в часі зсідання між пробірками без HPE мінус пробірки, що містять HPE (рис. 6). Цей аналіз залежить від АВК [24]. Лабораторії мають визначити своє значення cut-off. Однак різниця ≥8 свідчить про наявність ВА [25].

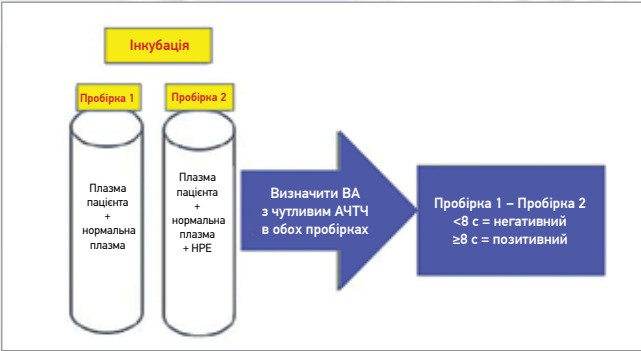


Рис. 6. Виконання тесту STACLOT-LA. Плазму пацієнта + нормальну плазму інкубують за відсутності HPE (пробірка 1) та за наявності HPE (пробірка 2). АЧТЧ виконується з використанням реагенту, чутливого до ВА. Час зсідання пробірки 1 порівнюється з таким пробірки 2. Якщо ВА наявний, то результати, отримані обчисленням пробірка 1 – пробірка 2, мають бути ≥ встановленої порогової величини

Мікст-тест

Тест змішування АЧТЧ часто застосовується для виявлення наявності інгібітора чи дефіциту факторів за незрозумілого підвищеного АЧТЧ. Плазму пацієнта змішують із пулом нормальної плазми, зразок тестують одразу чи після інкубації протягом 60-120 хв за 37 °С на водяній бані. Існують різні співвідношення змішування пулу плазми та пулу нормальної плазми, які можна використовувати, проте найчастіше застосовують співвідношення 1:1. Якщо тест змішування не вдається скорегувати (як безпосередньої суміші, так й інкубованої), це передбачає наявність циркулювального інгібітора. У разі ВА інгібітор ідентифікується за допомогою спеціального аналізу ВА. При інтерпретації тестів на змішування слід бути обережним, оскільки слабкий інгібітор може бути замаскований при додаванні пулу нормальної плазми до пулу плазми. Корегування в тестах на змішування варіюється залежно від лабораторії. Деякі лабораторії можуть обрати вираження корекції щодо нормального еталонного інтервалу АЧТЧ (RI) (в межах від 2 до 3 стандартних відхилень RI) або заздалегідь певної кількості секунд вище за верхню межу RI. Лабораторії також можуть використовувати формулу для розрахунку відсотка корекції плазми часу зсідання пацієнта на основі ІЦА, також відомого як індекс Рознера [26]. Індекс ІЦА/Рознера – це локально певне значення з інтервалом

зазвичай 10-20% (у середньому 15%). Має специфічність 98-100% і чутливість 55-68%.

ІЦА = $\frac{\text{АЧТЧс (розведена плазма 1:1)} - \text{АЧТЧс (нормальна плазма)}}{\text{АЧТЧс (пацієнта)}} \times 100\%$

Інтерпретація результатів:
– ІЦА <15% є корекцією (справжній дефіцит факторів);
– ІЦА >15% не є корекцією (інгібітор).
Слід зазначити, що для корекції АЧТЧ досить 30-50% активності факторів зсідання. CLSI (H60A) рекомендує подавати результати в тестах змішування як нормалізоване співвідношення, а не як час зсідання в секундах. Тест змішування може бути виконаний як окремий тест змішування (описано вище) або інтегрований до dRVVT чи SCT. Інтегрований тест змішування виконується лише для негайної суміші та ніколи не інкубується. Усі три експертні групи додали тест змішування до своїх настановчих принципів.
Приклад інтерпретації результатів щодо ВА наведено в таблиці 4.

Таблиця 4. Інтерпретація результатів щодо ВА				
ВА-1 Скринінговий тест		ВА-2 Підтверджувальний тест		Діагностика
Плазма пацієнта	Суміш (пацієнт + норма)	Плазма пацієнта	Суміш (пацієнт + норма)	
Норма	Норма	Норма	Норма	ВА не визначено
Подовження	Подовження	Норма	Норма	ВА наявний
Подовження	Норма	Подовження	Норма	Дефіцит факторів / антикоагулянтна терапія. ВА відсутній
Подовження	Подовження	Подовження	Норма	Дефіцит факторів і ВА
Подовження	Подовження	Подовження	Подовження	Неможливо підтвердити наявність або відсутність ВА. Можливо, є інший інгібітор

Як розраховується нормалізований коефіцієнт скринінг/підтвердження?

Крок 1 Скринінговий коефіцієнт
Час зсідання пацієнта (с) / Час зсідання контрольної плазми (с)
<1,2 = норма. СТОП-тест – ВА негативний.
≥1,2 = подовження. Перейти до кроку 2.

Висновки

Щодо стратегій тестування ВА між групами експертів залишаються певні розбіжності. Існує низка важливих чинників, які слід урахувати під час виконання тестування ВА. До таких чинників належать тип реагенту для скринінгу АЧТЧ, тип (-и) та кількість специфічних для ВА аналізів, які потрібно включити в панель, визначення відповідних порогових значень для ВА-специфічних аналізів, включення дослідження змішування як окремого аналізу або інтегрування до ВА-специфічного аналізу. Ретельне розуміння преаналітичних, аналітичних і постаналітичних змінних, які заважають тестуванню й інтерпретації ВА, має важливе значення для покращення тестування та діагностики. Жоден із тестів, що використовуються на сьогодні для виявлення ВА, не має рівної аналітичної чутливості щодо всіх різновидів антигів, наявності яких зумовлює цей феномен. Цілком очевидно, що існує необхідність у покращеній гармонізації настановчих принципів між групами експертів для спрощення стратегій тестування та підвищення діагностичної точності аналізів. Ідеальною вважається розробка єдиного аналізу, який, можливо, використовуватиметься в майбутньому як альтернатива нинішнім методам тестування для розпізнавання неоднорідної природи ВА.

Список літератури знаходиться в редакції.