



Association of Laboratory
specialists and organizations
«Federation of Laboratory Medicine»

Ассоциация специалистов
и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»

Современные аспекты диагностики антифосфолипидного синдрома

Левшин Н.Ю.

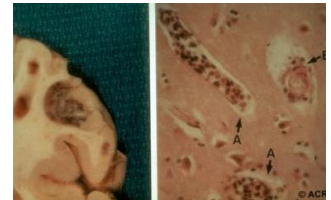
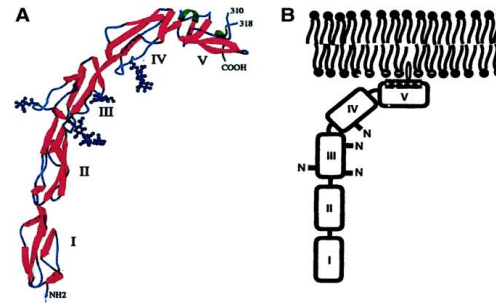
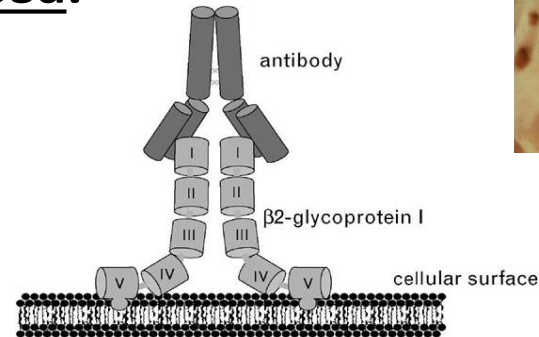
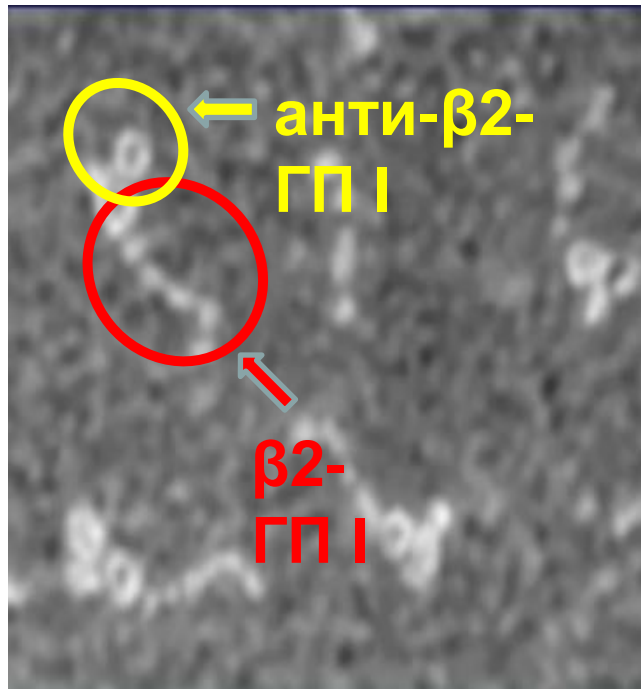
**«Ярославский форум лабораторной медицины:
современные подходы к повышению качества и
информативности клинических лабораторных исследований»**

Ярославль, 29.01.2018г.

Антифосфолипидный синдром

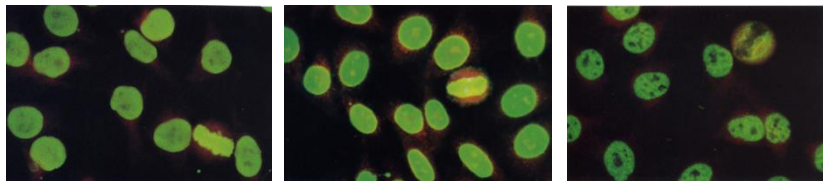
- системный аутоиммунный синдром, в основе которого лежит образование аутоантител к широко распространенным в организме фосфолипидным детерминантам мембран клеток или фосфолипидсвязывающим белкам крови, клинически проявляющийся развитием тромбозов и/или акушерской патологии.

АФС – модель аутоиммунного тромбоза.



Антифосфолипидный синдром (АФС)

- У 5-15% пациентов с первичным АФС в течение 10 лет заболевания развивается СКВ
- У 3-50 % пациентов с СКВ развивается АФС в течение 10 лет заболевания



Shah NM, Kamashta MA. Lupus.1998;7(1):3-6
Giles I, Rahman A. Best Pract Res Clin Rheumatol.2009;23(4):525-37
Gomez-Puerta JA, et al. Medicine (Baltimore). 2005; 84(4):225-30
Середавкина Н.В., Решетняк Т.М., 2015

ТРОМБОФИЛИИ

Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоэмболических осложнений

(Ассоциация флебологов России, Ассоциация сердечно-сосудистых хирургов России, Всероссийское общество хирургов, Российское научное медицинское общество терапевтов, Общество специалистов по неотложной кардиологии, 20.05.2015г.):

Таблица 2. Распространенность гематогенных тромбофилий и связанный с ними риск ВТЭО

Тромбофилия	Распространенность, %		Относительный риск
	в популяции	у больных с ВТЭО	
Дефицит антитромбина	0,07—0,16	1—3	20
Дефицит протеина С	0,2—0,4	3—5	10
Дефицит протеина S	0,03—0,13	1,5	10
Лейденская мутация V фактора свертывания крови	3—15	20	5
Повышение уровня фактора свертывания крови VIII	11	25	5
Мутация протромбина G20210A	1—2	4—7	2—3
Гипергомоцистеинемия	5	10	2,5
Антифосфолипидный синдром	0,2	3,1	2—6



- Factor V Leiden(R506Q) mutation
(average population prevalence, 5%; RR of a first venous thrombosis, compared with the general population, 5-7)
- Prothrombin gene (G20210A) mutation (2%; RR, 2-3)
- Antithrombin deficiency (0.04%; RR 15-20)
- Protein C deficiency (0.3%; RR, 15-20)
- Protein S deficiency (0.3%; RR, 15-20).
- **Acquired thrombophilic conditions include antiphospholipid antibodies (APLA)** (1%-5.6%; RR, 3-10), which may be associated with both venous and arterial thrombosis.

Группы риска ВТЭО в хирургии

Высокий риск

Сепсис

Наличие верифицированной тромбофилии

Большие операции у пациентов старше 60 лет

Большие операции у пациентов 40-60 лет, имеющих дополнительные факторы риска ВТЭО (ВТЭО в анамнезе, рак, **тромбофилии** и пр.)

Эндопротезирование тазобедренного и коленного суставов, операции при переломах бедра

Тяжелая и сочетанная травма, повреждения спинного мозга

Ожоги площадью более 20% поверхности тела

Осложнения ожоговой болезни

Термоингаляционная травма III степени

Химио-, рентгено- или радиотерапия у онкологических пациентов

Ишемический инсульт с параличом

Острое заболевание легких с ДН, требующее ИВЛ

Во всех случаях опасность ВТЭО увеличивается при наличии дополнительных факторов риска

Оценка риска ВТЭО у хирургических пациентов

«Шкала Каприни»

Table 7—*Caprini Risk Assessment Model*

1 Point	2 Points	3 Points	5 Points
Age 41-60 y	Age 61-74 y	Age ≥ 75 y	Stroke (< 1 mo)
Minor surgery	Arthroscopic surgery	History of VTE	Elective arthroplasty
BMI > 25 kg/m ²	Major open surgery (> 45 min)	Family history of VTE	Hip, pelvis, or leg fracture
Swollen legs	Laparoscopic surgery (> 45 min)	Factor V Leiden	Acute spinal cord injury (< 1 mo)
Varicose veins	Malignancy	Prothrombin 20210A	
Pregnancy or postpartum	Confined to bed (> 72 h)	Lupus anticoagulant	
History of unexplained or recurrent spontaneous abortion	Immobilizing plaster cast	Anticardiolipin antibodies	
Oral contraceptives or hormone replacement	Central venous access	Elevated serum homocysteine	
Sepsis (< 1 mo)		Heparin-induced thrombocytopenia	
Serious lung disease, including pneumonia (< 1 mo)		Other congenital or acquired thrombophilia	
Abnormal pulmonary function			
Acute myocardial infarction			
Congestive heart failure (< 1 mo)			
History of inflammatory bowel disease			
Medical patient at bed rest			



Prevention of VTE in Nonorthopedic Surgical Patients

Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians

Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. CHEST 2012; 141(2)(Suppl): e227S–e277S

Оценка риска венозных тромбоэмболических осложнений у нехирургических больных



Оценка риска ВТЭО у госпитализированных нехирургических пациентов (АССР 2012г.)

Фактор риска	Баллы
Активный рак (локальные или отдаленные метастазы и/или Получающие химио- или радиотерапию в предшествующие 6 месяцев)	3
ВТЭ в анамнезе (кроме тромбозов подкожных вен)	3
Ограничение подвижности (не менее 3 дней)	3
Тромбофилия (дефицит антитромбина, протеинов C, S, мутация в гене ф.V Лейден, протромбина G20210A, антифосфолипидный синдром)	3
Недавняя травма и/или операция (за последний месяц)	2
Пожилой возраст (70 лет и старше)	1
Сердечная или дыхательная недостаточность	1
Острый инфаркт миокарда или ишемический инсульт	1
Острая инфекция и/или ревматическое заболевание	1
Ожирение (ИМТ ≥ 30)	1
Продолжающаяся терапия половыми гормонами	1

**< 4 баллов –
низкий риск
ВТЭО**

**≥ 4 баллов –
высокий
риск ВТЭО**

Barbar S. et al . A risk assessment model for the identification of hospitalized medical patients at risk for venous thromboembolism: the Padua Prediction Score. J Thromb Haemost .2010; 8 (11): 2450 – 2457.

Оценка риска ВТЭО во время родов и в послеродовом периоде (Клинический протокол Минздрава РФ № 15-4/10/2-3792 от 27.05.2014)

Профилактика ВТЭО при наличии тромбофилии или ВТЭО в анамнезе

Риск	Анамнез	Рекомендовано
Очень высокий	Перенесенное ранее ВТЭО на фоне длительного приема варфарина. Дефицит антитромбина III, АФС с ВТЭО в анамнезе	Во время беременности НМГ в терапевтических дозах . В послеродовом периоде – не менее 6 недель НМГ или варфарин в терапевтических дозах
Высокий	Множественные ВТЭО в анамнезе Однократное ВТЭО в анамнезе без установленного фактора риска ВТЭО в анамнезе при наличии тромбофилии ВТЭО в анамнезе + семейный анамнез ВТЭО Бессимптомная тромбофилия высокого риска	Во время беременности и в течение 6 недель послеродового периода назначить НМГ в профилактических дозах
Промежуточный	Однократное ВТЭО в анамнезе, связанное с транзиторным фактором риска, который отсутствует в настоящее время, без тромбофилии, семейного анамнеза или других факторов риска. Бессимптомная тромбофилия (за исключением тромбофилии высокого риска)	Во время беременности рутинную профилактику НМГ не назначать. В течение 7 дней послеродового периода (или 6 недель при наличии семейного анамнеза или других факторов риска) назначить НМГ в профилактических дозах

Оценка риска ВТЭО и профилактика до родов (RCOG 20015)

Единственный эпизод ВТЭО в анамнезе,
кроме единственного ВТЭО после большой операции



ВЫСОКИЙ РИСК
Требуется профилактики НМГ
в течение всей
беременности

Поступление в стационар
Единственный ВТЭО, развившийся после большой операции

Известная тромбофилия высокого риска + отсутствие ВТЭО

Сопутствующие заболевания: рак, ХСН, СКВ, болезнь Крона,
НЯК, нефротический синдром, СД I типа с нефропатией,
серповидно-клеточная анемия

Любое хирургическое вмешательство (например, аппендэктомия)

Синдром гиперстимуляции яичников (только I триместр)



УМЕРЕННЫЙ РИСК
Возможна профилактика
НМГ в течение всей
беременности

Избыточная масса тела (ИМТ > 30 кг/м²)

Возраст старше 35 лет

3 и более родов

Курение

Варикозное расширение крупных вен

Текущая преэклампсия

Иммобилизация (например, параплегия)

Тромбоз в семейном анамнезе: идиопатический или при
приеме эстрогенов у родственников первой линии

Тромбофилия низкого риска

Многоплодная беременность

ЭКО/вспомогательные репродуктивные технологии



4 и более факторов риска:
профилактика с I триместра

3 фактора риска:
профилактика с 28 недель

Менее 3
факторов
риска



Преходящие факторы риска: дегидратация/неукротимая рвота,
септическое состояние, длительные переезды/перелеты

НИЗКИЙ РИСК
Активизация и
предотвращение
дегидратации

Антифосфолипидный синдром (АФС)

Данные по частоте встречаемости противоречивы

Greaves: **3% пациентов, перенесших первый эпизод ВТЭ**

Lockshin: **20% женщин, имевших повторные эпизоды внутриутробной гибели плода**

3.1% пациентов с ВТЭ позитивны по ЛАК, в сравнении с 0,9% в популяции

de Groot PG et al. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:1993-7

17% пациенток с инсультом в возрасте моложе 50 лет позитивны по ЛАК по сравнению с 0,7% группы контроля

Urbanus RT et al. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol* 2009;8:998-1005.

IgG-аКЛ в сыворотке здоровых людей 0 – 14%, в среднем 2-4% (в высоком титре – менее 0,2%). Частота встречаемости аКЛ увеличивается с возрастом

Опасность гипердиагностики АФС!

Важно четко следовать диагностическим критериям, соблюдать технику определения лабораторных показателей, правильно трактовать результаты

Pengo V. et al. J Thromb Haemost, 2007; 5: 925-930

Антифосфолипидный синдром (АФС)

β_2 -гликопротеин I - ключевой белок при АФС (кофактор взаимодействия антител с фосфолипидом)

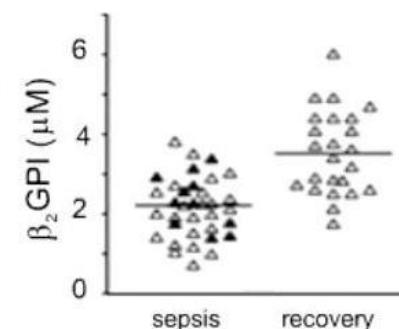
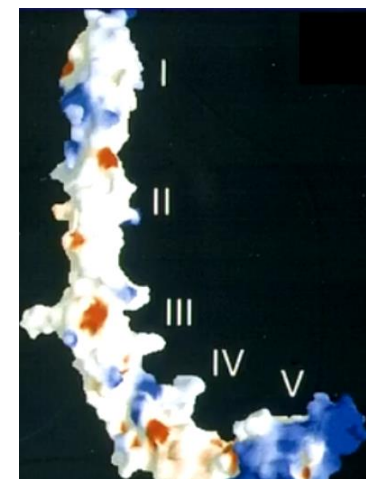
Протеин плазмы 200мкг/мл, MM 50kDa

Четко его функции не описаны ((1968, 2001г. – дефицит никак не проявлялся, здоровые особи (мыши))

Вероятная физиологическая функция:

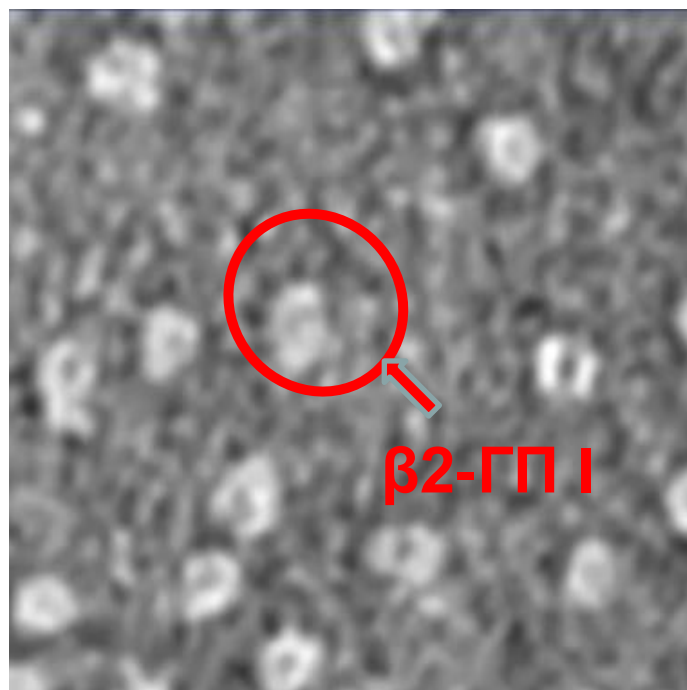
циркулирует в плазме для удаления отрицательно заряженного клеточного дебриса (обломки клеток, микрочастицы и др.), бактерий, белков, после взаимодействия с которыми изменяет свою конформацию и становится доступным для элиминации клетками иммунной системы (моноцитами) через LRP-рецептор.

β_2 -гликопротеин I - компонент врожденного иммунитета

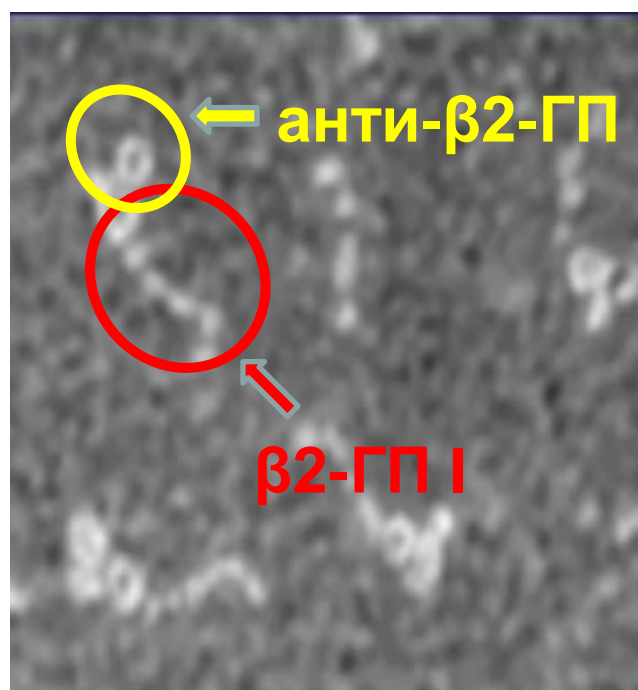


Антифосфолипидный синдром (АФС)

β 2-GP I плазмы
(домен I «закрит»
для антител)



β 2-GP I + антитела к домену I
(на ФЛ-поверхности домен I
«открыт»)



Agar et al. 2010
deGroot 2010

Антифосфолипидный синдром (АФС)

Связь антител к β_2 -GP I с тромботическими осложнениями:

- Активация различных клеток, участвующих в гемостазе

(в первую очередь - эндотелиоцитов, тромбоцитов, моноцитов)

- Влияние на систему протеина С, развитие РАПС (→ венозный тромбоз)

- Активация фактора фон Виллебранда

- Усиление генерации тромбина *in vivo*

- Активация системы комплемента (→ невынашивание беременности?)

- Образование комплексов с ЛПНП, атерогенез

- Снижение активности аннексина V

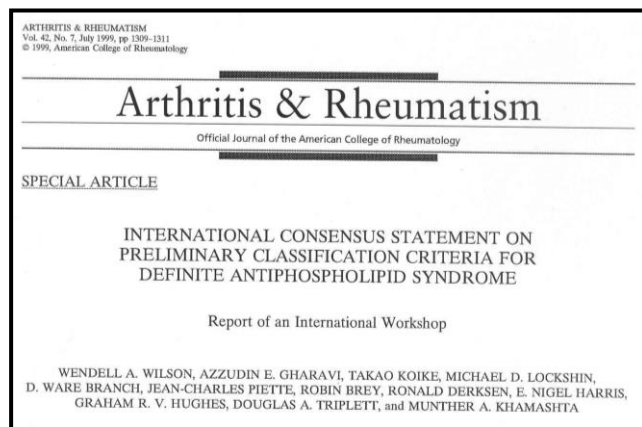
и др.

DeGroot, 2010г.

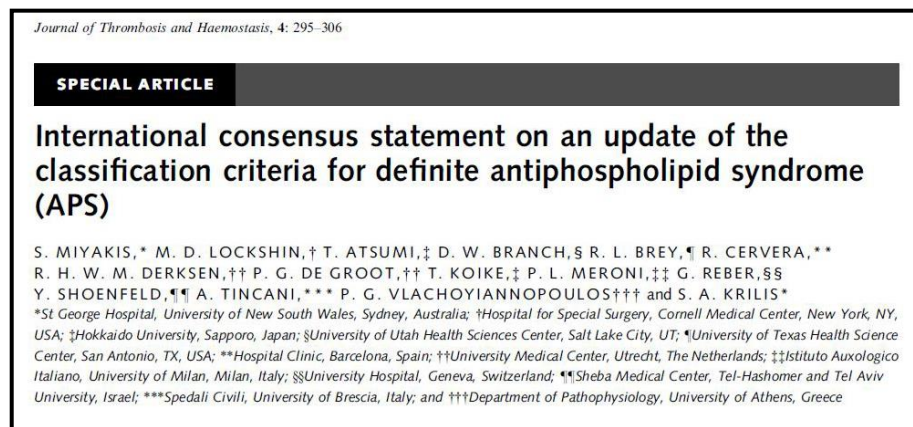
А.Н.Мамаев, А.П.Момот, Гемостазиология, 2012г., №2, с.17-19

Антифосфолипидный синдром (АФС)

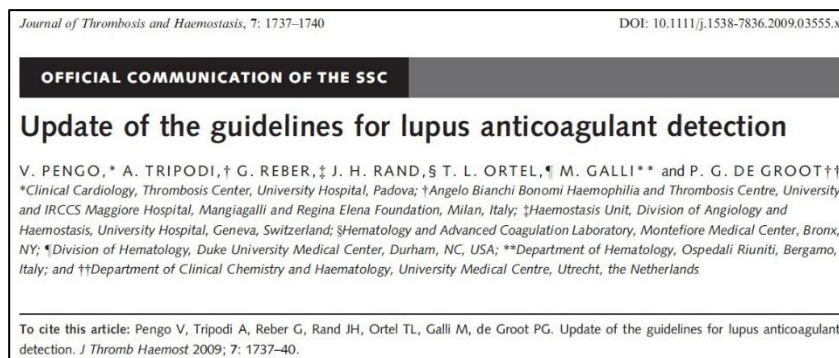
Диагностика



Sapporo, 1998г.



Sydney, 2004



2009г.

КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА (АФС)

(на основе международного соглашения по усовершенствованию классификационных критериев АФС, рекомендации рабочей группы XI Международного Конгресса по изучению антифосфолипидных антител, Сидней, Австралия, 14-18 ноября 2004г..)

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)

Диагноз АФС выставляется при наличии минимум одного клинического и одного лабораторного критериев

Диагноз не выставляется при одновременном наличии лабораторных и клинических критериев АФС менее 12 недель, а также в случае разницы между их появлением более 5 лет

КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА (АФС)

Клинические критерии:

1. Тромбозы сосудов

Один и более эпизодов артериального, венозного тромбоза или тромбоза микрососудов любой локализации. Тромбоз должен быть объективно подтвержден.

В случае гистопатологического подтверждения тромбоза не должно быть признаков воспаления сосудистой стенки

Наличие врожденных или приобретенных факторов риска тромбоза (возраст, факторы риска сердечно-сосудистой патологии (гипертензия, диабет, гиперхолестеринемия, курение, повышенная масса тела, микроальбуминурия, снижение клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин., семейный анамнез), врожденные тромбофилии, прием оральных контрацептивов, нефротический синдром, онкологическая патология, длительная иммобилизация, хирургические вмешательства) не исключает наличия АФС. Пациенты должны быть разделены на 2 группы - по наличию или отсутствию дополнительных факторов риска тромбозов. Тромбозы подкожных вен не являются критерием диагностики

2. Патология беременности

- **Один и более** случаев мертворождения морфологически нормального плода 10 и более недель гестации

- **Один и более** случаев преждевременных родов здорового плода до 34 недель гестации вследствие преэклампсии, эклампсии, наличия признаков патологии плаценты

- **Три и более** последовательных случаев спонтанных аборт до 10 недель гестации

КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА (АФС)

Лабораторные критерии:

1. Наличие **Люпус-антикоагулянта** в плазме пациента в 2 или более пробах **с интервалом** между исследованиями **не менее 12 недель**

Помимо скрининговых тестов (АЧТВ, ПВ, каолиновое время свертывания) необходимо:

- использование подтверждающих коагуляционных тестов
- определение тромбинового времени для исключения эффекта гепарина в образце плазмы пациента.

Должно проводиться не менее 2 коагуляционных тестов.

Для каждой лаборатории желательным является определение собственных «норм» коагуляционных тестов, использование нормализованных отношений (тест/контроль).

2. Наличие **антител к кардиолипину (аКЛ) IgG и/или IgM–изотипов** в сыворотке или плазме пациента **в среднем или высоком титре** (>40 GPL или MPL или более 99 персентилей) **с интервалом** между исследованиями **не менее 12 недель** (определение ИФА)

3. Наличие **антител к β 2-GPI IgG и/или IgM–изотипов** в сыворотке или плазме пациента в титре более 99 персентилей **с интервалом** между исследованиями **не менее 12 недель** (определение ИФА)

**Состояния, ассоциированные с АФС,
не включенные в диагностические критерии**

(не все имеют тромботическое происхождение):

Клапанная патология сердца, легочная гипертензия

Сетчатое ливедо, трофические язвы

Тромбоцитопения ($<100 \cdot 10^9/\text{л}$)

Нефропатия

Неврологическая симптоматика

(транзиторные ишемические атаки, инсульты
хорея, поперечный миелит, синдром Снеддона (ливедо + ТИА, инсульты))

Антитела к кардиолипину класса IgA

Антитела к $\beta 2$ -GPI класса IgA

Антитела к протромбину, фосфатидилсерину,
фосфатидилэтаноламину,

аннексину V, комплексу фосфатидилсерин-протромбин

**Состояния, ассоциированные с АФС,
не включенные в диагностические критерии**

(не все имеют тромботическое происхождение):

Клапанная патология сердца, легочная гипертензия

Сетчатое ливедо, трофические язвы

Тромбоцитопения ($<100 \cdot 10^9/\text{л}$)

Нефропатия

Неврологическая симптоматика

(транзиторные ишемические атаки, инсульты
хорея, поперечный миелит, синдром Снеддона (ливедо + ТИА, инсульты))

Клиническая трактовка:

«ПреАФС» или «Вероятный АФС»

Решетняк Т.М. Антифосфолипидный синдром. В кн. «Клинические лекции по ревматологии» под редакцией В.В.Бадюкина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 20011; 536.

Наиболее часто тромбозы развиваются у пациентов, в крови которых присутствуют все 3 группы антифосфолипидных антител, относящихся к критериям диагностики АФС – волчаночный антикоагулянт, антитела к кардиолипину и антитела к β 2-ГП1 классов G и M.

«Тройная» позитивность (ЛАК, высокие титры aCL и ab2-GPI) коррелирует с тромбозами (OR 33.3) и патологией беременности (OR 16-34,4) в гораздо более высокой степени, чем двойная позитивность или позитивность по одному из иммунологических факторов

Чаще всего «тройная» АФЛ-позитивность обусловлена **IgG к эпитопу Gly40-Arg43 первого домена b2-GPI**, который и идентифицируется в трех различных тест-системах

- Galli M. The antiphospholipid triangle. J Thromb Haemost 2010; 8: 234–6.
- Pengo V, Biasiolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost 2005; 93: 1147–52.
- Ruffatti A, Tonello M, Del Ross T, Cavazzana A, Grava C, Noventa F, Tona F, Illiceto S, Pengo V. Antibody profile and clinical course in primary antiphospholipid syndrome with pregnancy morbidity. Thromb Haemost 2006; 96: 337–41

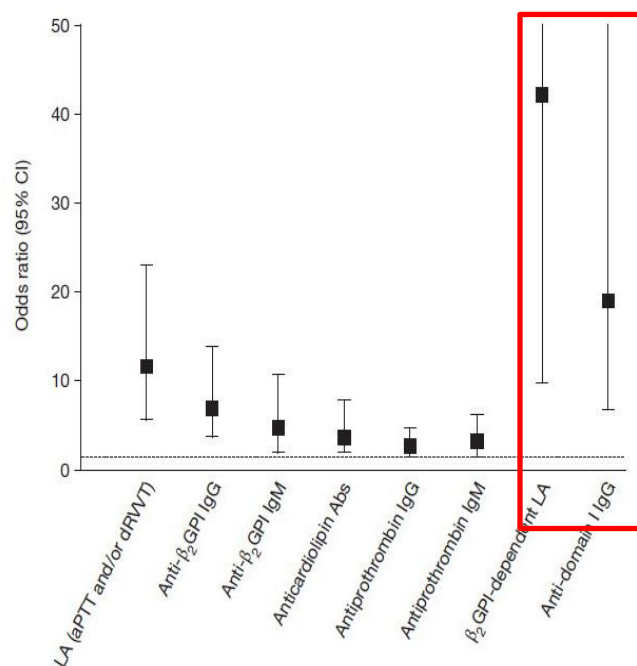
Если у пациента обнаружены **антитела к кардиолипину и $\beta 2\text{GPI}$ (одного изотипа)** при **отсутствии волчаночного антикоагулянта**, то титр патогенных аутоантител может быть несущественным для феномена ЛАК. Такие пациенты относятся к группе низкого риска (или «**Вероятного тромботического и/или акушерского АФС**») и требуют осторожного назначения терапии и тщательного лабораторного контроля...»

«**Маловероятный тромботический и/или акушерский АФС**» может быть диагностирован у пациентов с изолированной позитивностью по ВА, аКЛ или анти- $\beta 2\text{GPI}$ и с доказанным венозным/артериальным тромбозом и/или потерей плода

Table 4: Antiphospholipid antibody profiles as risk factors of thrombosis*.

Lupus anticoagulant/ Anti-cardiolipin antibodies/ Anti-β ₂ -glycoprotein I antibodies	Thrombosis (N=340) no.(%)	No thrombosis (N=278) no.(%)	Odds Ratio			
			univariate	95% CI	Multivariate ^o	95% CI
+/+	34 (10)	2 (1)	14.9	3.5–62.7	33.3	7.0–157.6
+/-	0 (0)	5 (2)	NA	–	NA	–
-/+	18 (5)	13 (5)	1.2	0.6–2.5	2.2	1.0–5.2
-+/-	7 (2)	13 (5)	0.5	0.2–1.2	0.8	0.3–2.1
-/-	4 (1)	4 (1)	0.9	0.2–3.5	1.3	0.3–5.7

* > 40 GPL or MPL; ^o Same risk factors as in Table 2; NA=Not Applicable



**Группы риска осложнений АФС,
диагностические направления:**

- Тройная позитивность
- Антитела к домену I b2-GP I

de Laat B., de Groot P. et al. Mechanisms of Disease: antiphospholipid antibodies—
from clinical association to pathologic mechanism. *Nature* 2008. vol. 4 no. 4

V. Pengo, A. Ruffatti, et al. Antiphospholipid syndrome: Antibodies to Domain 1 of b2-glycoprotein 1 correctly
classify patients at risk. *J Thromb Haemost* 2015

**Когда полезно определение антител
к протромбину, аннексину V, фосфатидилсерину и др.
(не входят в официальные критерии
диагностики АФС)**

- Вероятный/сомнительный АФС
- Акушерская патология (антитела к аннексину V)
- Научные исследования



Антифосфолипидный синдром

Присутствие в крови антифосфолипидных антител может быть временным, то есть не являться антифосфолипидным синдромом

Транзиторное присутствие АФЛ сопровождается:

- **воспаление** (в т.ч. послеоперационное, **вирусное**, бактериальное и др.)
- **травму**
- **онкопатологию**
- **и др.**



Присутствие антифосфолипидных антител

≠

Антифосфолипидный синдром



«Торопиться не надо!..»

Люпус-антикоагулянт

in vitro проявляет себя **удлинением**

фосфолипид-зависимых клоттинговых тестов

(АЧТВ, тест с разведенным ядом гадюки Рассела,

протромбиновое время, каолиновое время свертывания)



Россия, 123308, Москва,
Хорошевское шоссе, д. 43Г, стр. 1
Лиц. № ЛО-34-01-002432 от 12.02.2015 г.

МЕДИЦИНСКИЕ АНАЛИЗЫ
8-800-100-363-0 www.citilab.ru

СИТИЛАБ
НАМ 10 ЛЕТ

ФИО пациента: Л/

Индивидуальный номер: 348291

Пол: ЖЕНСКИЙ

Дата рождения: 31/05/1988

Референсная группа: Female



№ заказа 100494000

Заказчик: (551)Ситилаб Ярославль ЦОП 1
Отделение: ВРАЧИ
Врач:

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование	Результат	Единицы измерения	Референсный интервал
Биоматериал: Плазма цитрат Дата взятия: 19/11/2015 7:56:00 Дата доставки: 20/11/2015 0:31:17			
Коагулограмма			
(<) Протромбин по Квику (индекс)	71.4	%	77.0 - 120.0
(■) МНО (INR)	1.14	Отн.ед.	0.80 - 1.20
(>)(■) АЧТВ	34.1	сек	23.0 - 32.0
(■) Фибриноген	2.0	г/л	1.8 - 3.5

Исполнители:



Заведующая лабораторией
Г

Россия, 123308, Москва,
Хорошевское шоссе, д. 43Г, стр. 1
Лиц. № ЛО-34-01-002432 от 12.02.2015 г.

МЕДИЦИНСКИЕ АНАЛИЗЫ
8-800-100-363-0 www.citilab.ru

СИТИЛАБ
НАМ 10 ЛЕТ

ФИО пациента: Л/

Индивидуальный номер: 348291

Пол: ЖЕНСКИЙ

Дата рождения: 31/05/1988

Референсная группа: Female



№ заказа 100494000

Заказчик: (551)Ситилаб Ярославль ЦОП 1
Отделение: ВРАЧИ
Врач:

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование	Результат	Единицы измерения	Референсный интервал
Биоматериал: Плазма цитрат Дата взятия: 19/11/2015 7:56:00 Дата доставки: 20/11/2015 0:31:17			
Коагулограмма			
■(<) Протромбин по Квику (индекс)	71.4	%	77.0 - 120.0
■ МНО (INR)	1.14	Отн.ед.	0.80 - 1.20
(>)■ АЧТВ	34.1	сек	23.0 - 32.0
■ Фибриноген	2.0	г/л	1.8 - 3.5

И что же это?

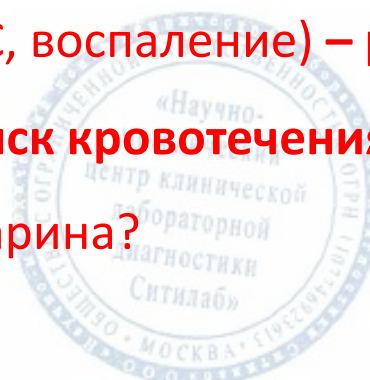
Волчаночный антикоагулянт (АФС, воспаление) – риск тромбоза?

Специфический ингибитор?] - риск кровотечения?

Болезнь Виллебранда?

Эффект низкомолекулярного гепарина?

Дефект преаналитики?...



Причины удлинения тестов ПВ и/или АЧТВ

Нарушение	Причины
Только ПВ	Частые: дефицит вит.К, заболевания печени (начальные стадии), НОАК
	Очень редкие: врожденный дефицит ф.VII
Только АЧТВ	Частые: волчаночный антикоагулянт* , НФГ в/в, НМГ **, НОАК
	Редкие: дефицит фактора VIII, IX, XI, XII, болезнь Виллебранда
АЧТВ и ПВ	Очень редкие: дефицит прекалликреина и высокомолекулярного кининогена
	Частые: дефицит вит. К, заболевание печени, сепсис ± ДВС , НОАК, гипо- и дисфибриногенемия*** , ПДФ как ингибиторы образования фибрина
	Очень редкие: врожденный дефицит факторов II, V, X
* - ЛАК может обладать антипротромбиновой активностью, в таком случае удлиняются АЧТВ и ПВ ** - Введение НМГ не всегда отражается на АЧТВ и ПВ *** - Гипо- и дисфибриногенемия могут удлинять ПВ или АЧТВ изолировано	

■ - характерно для воспаления и/или наличия ингибитора коагуляции

Диагностические критерии ЛАК

- Удлинение 1 или нескольких фосфолипид-зависимых тестов (1.dRVVT 2.АЧТВ с активатором SiO₂)



- Подтверждение ингибиторной активности в образце плазмы, исключение дефицита факторов свертывания



- Фосфолипидзависимость ингибитора,
отсутствие специфического ингибирования какого-либо фактора свертывания

Pengo V., Tripodi A., De Groot P. et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. J Thromb Haemost 2009; 7: 1737–1740.

Urbanus R. et al. Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. Blood Rev 2008; 2: 93–105.

Особенности преаналитического этапа:

Забор крови на исследование:

- до начала применения антикоагулянтов
или после существенного перерыва в их использовании
- **применение цитрата 0,109М (3,2%)**
- двойное центрифугирование
- в случае необходимости замораживания, если исследование должно быть отложено - быстрое замораживание при -70°C
- размораживание при 37°C (во избежание образования криопреципитата), тщательное перемешивание



Выбор теста:

- 1. 2 теста, основанные на различных принципах**
- 2. Тест с разведенным ядом гадюки Рассела выполняется в первую очередь**
- 3. Вторым тестом должно быть АЧТВ с чувствительным к ЛАК реактивом (низкое содержание фосфолипидов, кварцевый активатор)**
- 4. ЛАК расценивается как позитивный в случае если даже 1 тест дает положительный результат**

Каолин не рекомендуется из-за проблем его применения в автоматических коагулометрах (интерференции с фотооптическими анализаторами), плохая воспроизводимость;

элаговая кислота низко чувствительна к ЛАК;

разведенный тромбопластин вариабелен по своему эффекту;

Проведение уточняющих исследований:

Подтверждающие тесты:

1. Подтверждающий тест (-ы) проводятся реагентами с повышенным содержанием фосфолипидов по сравнению со скрининговым тестом
2. Должны использоваться гексагональные или двухслойные фосфолипиды.

Проведение исследования:

1. Провести тест в плазмах здоровых доноров с низкой (скрининговой) и высокой (подтверждающей) концентрацией фосфолипидов.
2. Определить уровень cut-off как средний уровень коррекции в % , определяемый отношением [(скрининг-подтвержд.)/подтвержд.]*100%

Интерпретация:

1. Результат соответствует присутствию ЛАК, если % коррекции выше, чем уровень cut-off лаборатории

Проведение уточняющих исследований:

Выражение результатов:

1. Результаты должны быть выражены как отношение пациента к нормальной плазме для всех этапов (скрининг, коррекционная проба, подтверждение)

Оформление результатов:

1. По результатам исследований должно быть выдано заключение с объяснением результата.

Cut-Off

1. Тестирование плазм здоровых доноров (40 человек)

2. Определить уровень отсечки как значение, превышающее 99 перцентилей распределения

Интерпретация:

1. Результаты скрининговых тестов расцениваются как позитивные по ЛАК в случае превышения ими уровня cut-off лаборатории

Pengo V et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection.
J Thromb Haemost 2009; 7: 1737–40.

Реагенты с разведенным ядом гадюки Рассела

Technoclot® LA Screen (Technoclone, Австрия)

Technoclot® LA Confirm (Technoclone, Австрия)

LA 1 Screening reagent (Siemens, Германия)

LA 2 Confirm. reagent (Siemens, Германия)

и др.

3011228-008 11/2013

TECHNOCLOT® LA Screen / Confirm






GB

IT

FR

SRB

DE

ES

RU

HR

REF 5343012	TECHNOCLOT® LA Screen	5 x 2 mL
REF 5343016	TECHNOCLOT® LA Confirm	5 x 1 mL



Реагенты АЧТВ со скрининговым и подтверждающим (избыточным) содержанием фосфолипидов

Lupus anticoagulant Test, Technoclone



Silica Clotting Time, HemosIL, Instrumentation Laboratory

Тест АЧТВ с избытком фосфолипидов

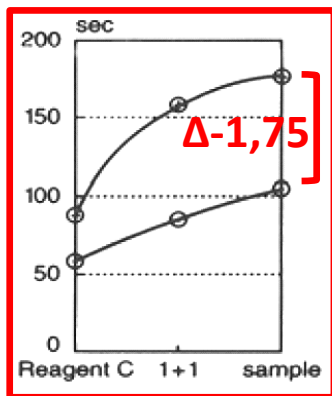
Активатор – $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$

2 концентрации фосфолипидов

Контрольная нормальная плазма

Плазма ВА(+), (положительный контроль)

CaCl_2



$$\text{LCA} = (b - c) / a * 100 \quad (\text{BA+ при LCA} > 15)$$

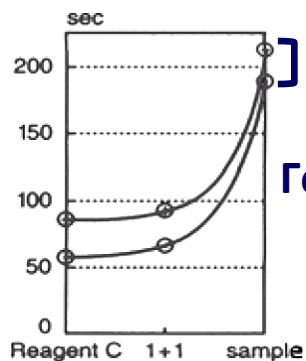
a – время свертывания плазмы пациента

b – время свертывания плазмы пациента, смешанной с нормальной плазмой

c – время свертывания нормальной плазмы

Волчаночный антикоагулянт

$$\text{LCA1} = (160 - 90) / 175 * 100 = \underline{40}$$



$\Delta - 1,15$

Гемофилия А



Вариант установления ЛАК:

Сопоставление результатов тестов АЧТВ
с ВА-чувствительным и ВА-нечувствительным
реагентом

Но!

Не в полной мере учитывается возможная
гипокоагуляция и фосфолипид-зависимость
ингибитора

Варианты методики:

Siron LS vs Siron LIS (Technoclone)

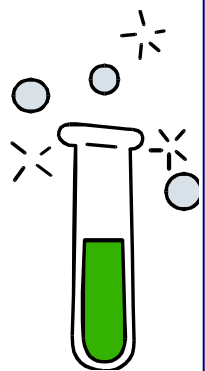
ActinFSL vs ActinFS (Siemens)

Экспресс-люпус-тест (Технология Стандарт)



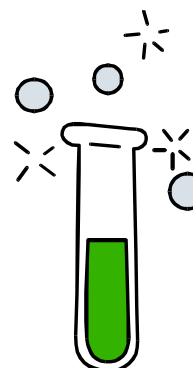
dRVVT / dRVVT подтверждающее
(dRVVT – тест с разведенным ядом гадюки Рассела)

dRVVT скрин.



Пробирка 1:

- Разведенный яд гадюки Рассела
- **Фосфолипиды (лимит.)**
- CaCl_2



Пробирка 2:

- Разведенный яд гадюки Рассела
- **Фосфолипиды (избыт)**
- CaCl_2

Результат обычно выражается как отношение
 $\text{dRVVT} / \text{dRVVT подтверждающее}$

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ ТЕСТ НА ЛЮПУС-АНТИКОАГУЛЯНТ:

- 1) Удлинение dRVVT
- 2) Отсутствие коррекции в тесте смешивания
- 3) $\text{dRVVT} / \text{dRVVT подтверждающее} > 1,2$

Результаты тестов на ВА выражаются в виде отношения,
R (Ratio)

$$R_{\text{скрин.}} = \frac{\text{dRVVT скрин пац.}}{\text{dRVVT скрин норм.}}$$

и



$$R_{\text{скрин.}} = \frac{\text{АЧТВ скрин пац.}}{\text{АЧТВ скрин норм.}}$$

и

$$R_{\text{подтв.}} = \frac{\text{dRVVT подтв. пац.}}{\text{dRVVT подтв. норм.}}$$

$$R_{\text{подтв.}} = \frac{\text{АЧТВ подтв. пац.}}{\text{АЧТВ подтв. норм.}}$$



Вычисляется тестовое (нормализованное) отношение:

$$\text{Н.О.} = \frac{R_{\text{скрин dRVVT}}}{R_{\text{подтв. dRVVT}}}$$

$$\text{Н.О.} = \frac{R_{\text{скрин АЧТВ}}}{R_{\text{подтв. АЧТВ}}}$$

**Результат на ВА положителен, если хотя бы одно из
отношений Н.О. (dRVVT или АЧТВ) > 1,2**

Больная Н., 23 года

• 04.03.2010г.:

Антитела к кардиолипину:

IgG – 120 Ед/мл (норма – не более 40) – **высокий титр**

IgM – 5,1 Ед/мл

Антитела к бета-2-гликопротеину I:

IgG – 100 Ед/мл (норма – не более 40) – **высокий титр**

IgM – 3,2 Ед/мл

Присутствие волчаночного антикоагулянта:

Время свертывания с разведенным ядом гадюки Рассела скрин.

LA1 – 96,6 сек. (нормальная плазма – 40 сек.) **НО – 2,4**

Время свертывания с разведенным ядом гадюки Рассела подтв.

LA2 – 37,8 сек. (нормальная плазма – 41 сек.) **НО – 0,92**

$LA1/LA2 = 2,4 / 0,92 = 2.6$ (норма – до 1,2) – **высокий титр ВА**

Российская тест-система «Люпус-тест»

- 3 вида активаторов свертывания
(каолин, лебетокс, тромбопластин)
- Избыточные фосфолипиды для нейтрализации
ЛАК («Тромбоцитин»)
- CaCl_2



Технология СТАНДАРТ
Тел: (8452) 229-932, 229-934, 229-936; факс: 271-500; e-mail: mail@tehnologiya-standard.ru

ЛЮПУС-ТЕСТ
Инструкция по применению набора реагентов для определения антикоагулянтов волчаночного типа

011
Каталожный номер набора

Только для in vitro диагностики

Назначение
Набор Люпус-тест предназначен для определения антикоагулянтов волчаночного типа (ВА). В плазме крови ВА связываются с фосфолипидными мембранами и тормозят активацию и взаимодействие между собой плазменные факторы свертывания крови. Наиболее четко эти нарушения выявляются в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах при использовании низких концентраций активаторов процесса свертывания. Наличие в плазме ВА сопровождается рецидивирующими тромбозами вен и артерий, нарушениями мозгового кровообращения (головные боли, обмороки, динамические расстройства мозгового кровообращения, парезы, эпилепсия, нарушения зрения и др.), фетоплацентарной недостаточностью, привычным невынашиванием беременности (выкидыши, внутриутробная гибель плода, тромбоцитопения, реже – кровотоочивость микроциркуляторного типа, полиаллергия, другие иммунные нарушения, склонность к развитию ДВС-синдрома).

Характеристика набора
Принцип метода. Определение ВА основано на том, что гипоконгуляция, обусловленная избытком ингибиторов свертывания и вытеснения фосфолипид-зависимых тестами, не корректируется нормальной бездной тромбопластином плазмой (БТП), но исправляется добавлением исследуемой БТП разбавленных нормальных тромбоцитов (тромбоцитин). В связи с этим исследуемые для диагностики ВА тесты подразделяются на следующие группы: 1) **разбавляющие** фосфолипид-зависимые, дающие положительное о нарушении, связанных с эффектами ВА; 2) **нейтрализующие** в которых обнаруживается, что гипоконгуляция в тестах первой группы устраняется или значительно корректируется добавлением фосфолипидных мембран, но не нормальной контрольной БТП (этот исключает гипоконгуляцию, обусловленную дефицитом плазменных факторов свертывания).

Состав набора:
1. **Каолин** (суспензия легкого каолина) 10 мл - 4 фл.
2. **Тромбопластин** (лиофилизированный активатор фактора X) - 1 фл.
3. **Лебетокс** (лиофилизированный активатор фактора XII) - 1 фл.
4. **Тромбоцитин** (лиофилизированный разлит по ступичкам и разбавленным тромбоцитам человека) - 2 фл.
5. **Буфер для разбавления** (концентрированный 20:1 раствор), 10 мл - 1 фл.
6. **Кальций хлорид** (концентрированный 20:1 раствор, 5.54%), 10 мл - 1 фл.

Аналитические характеристики набора
Линейность определения протромбинового времени с разбавленным тромбопластином - в диапазоне от 30 до 120 с; для каолинового времени - от 50 до 100 с; для лебетоксового времени - от 30 до 120 с. Коэффициент вариации результатов определения времени свертывания по всем тестам не превышает 10%.

Допустимый разброс результатов определения времени свертывания по всем тестам в одной пробе плазмы крови разными наборами одной серии не превышает 10%.

Меры предосторожности
Потенциальный риск применения набора - класс 2 (ГОСТ Р 51629-2000).
Все реагенты, входящие в набор, используются только для применения in vitro.
Все компоненты набора в используемых концентрациях не токсичны.
При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы плазмы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Причины вариабельности результатов теста определения волчаночного антикоагулянта:

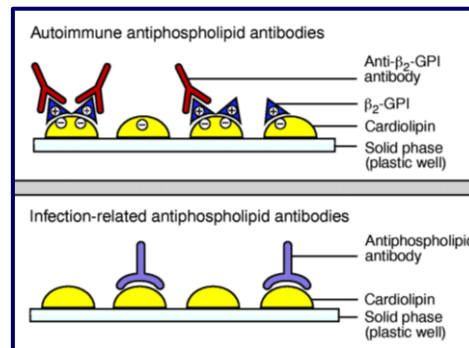
- 1. Тип и концентрация фосфолипидов в реагенте**
- 2. Тип активатора коагуляции**
- 3. Подготовка плазмы**
- 4. Вычисление результатов, уровень cut-off**
- 5. Спектр антител и специфичность их эпитопов могут быть различными; проблема выбора контрольных плазм**

Как следствие – межлабораторные различия в определении ЛАК в связи с различной специфичностью и чувствительностью тест-систем.

Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE, Greaves M. Potentially clinically important inaccuracies in testing for the lupus anticoagulant: an analysis of results from three surveys of the UK National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) for Blood Coagulation. *Thromb Haemost* 1997; 77: 934–7.
Pengo V et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737–40.

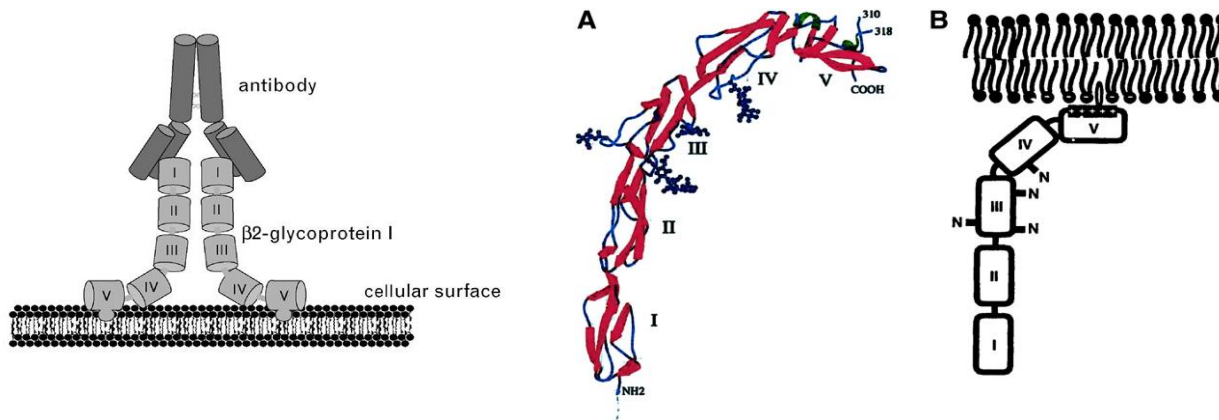
Ошибки диагностики

- Выполнение исследований на фоне воспалительной активности, в раннем послеоперационном, послеродовом периодах
- Выполнение исследований не по показаниям
- Выполнение исследования на ЛАК на фоне приема варфарина и других антикоагулянтов
- Неиспользование специальных контрольных материалов



Определение антифосфолипидных антител (иммуноферментный анализ)

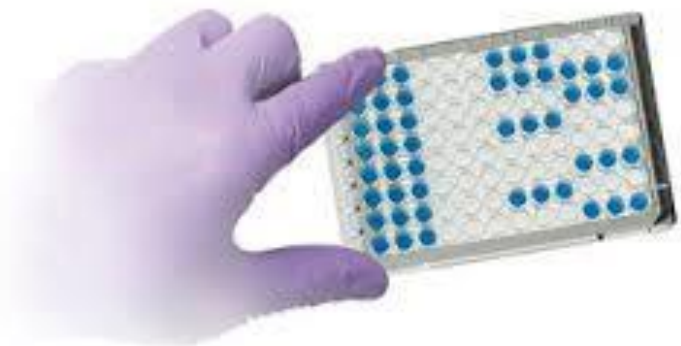
β 2-гликопротеин I – основная мишень для антител при АФС

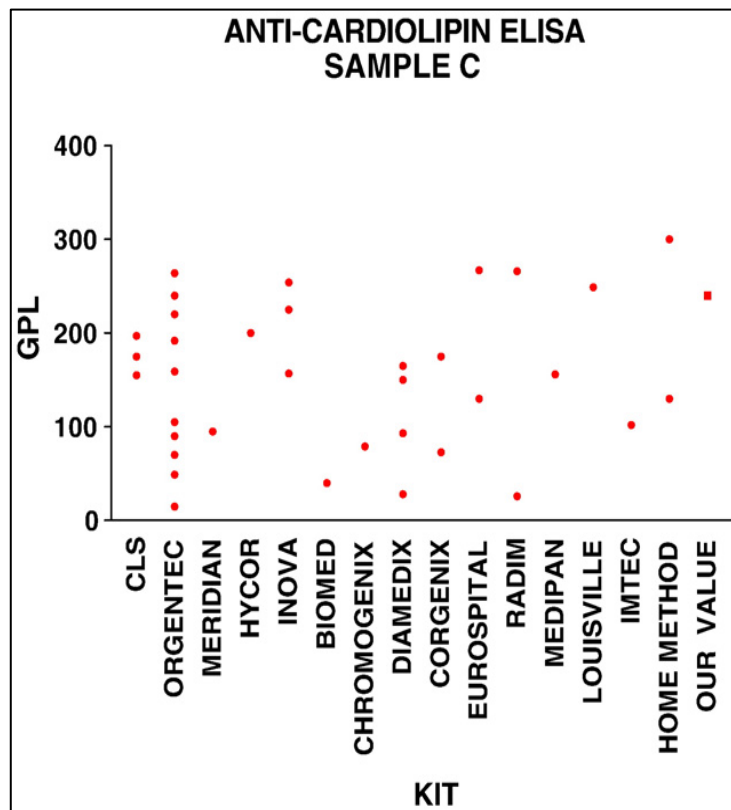


Фосфолипиды	Кардиолипин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидиловая к-та
Кофакторы	Бета-2-гликопротеин I, протромбин, протеин С, Протеин S, тромбомодулин, Аннексины: V, II

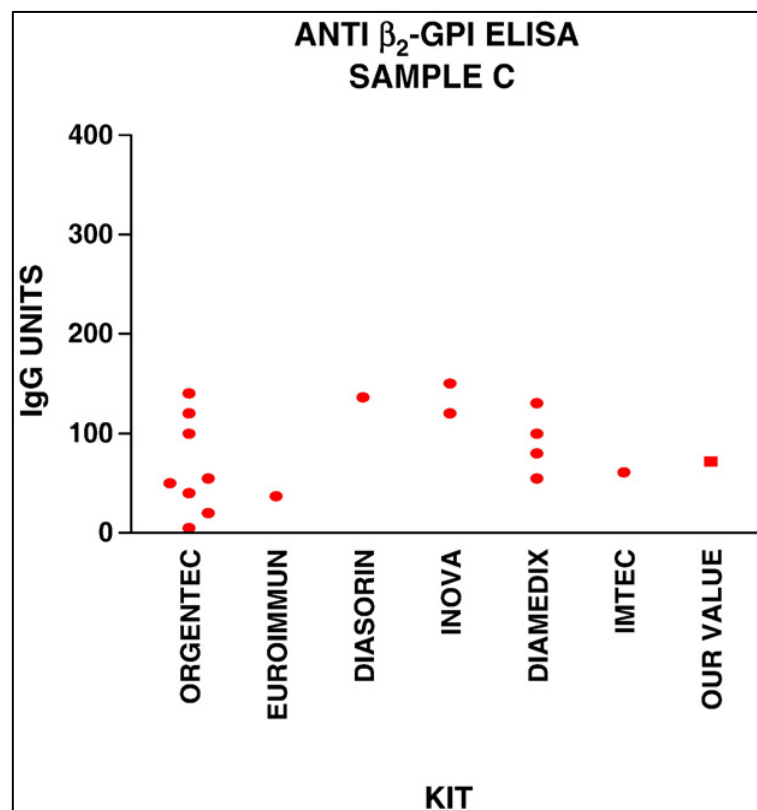
Преимущества ИФА перед коагуляционными тестами

- Измерение уровня антител в замороженных сыворотках
 - Оценка концентрации и изотипов аутоантител
- Независимость от антитромботической терапии
 - Хорошая воспроизводимость в лаборатории
 - Низкая стоимость исследований
- Простота выполнения





C = 240 GPL



C = 72 U/ml

Vittorio Pengo Alessandra Biasiolo a, Elisa Bison a, Veena Chantarangkul b, Armando Tripodi Antiphospholipid antibody ELISAs: Survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti- β_2 -Glycoprotein I activity. Thrombosis Research (2007) 120, 127–133

Однако данные исследований в рамках Европейского форума по стандартизации методов определения аФЛ свидетельствуют о невысокой межлабораторной сопоставимости результатов ИФА аКЛ и а β_2 – ГП I ...

Факторы, влияющие на результаты определения аКЛ и аβ2 – ГП

- уровень позитивности (“cut off”)
- свойства стандартных и контрольных сывороток (специфичность, авидность, стабильность)
- технология ИФА,
- аналитические характеристики используемых тест-систем
- способ построения калибровочной кривой для количественной оценки полученных данных
- единицы измерения аФЛ
- наличие интеркуррентной инфекции и др.

Рекомендуется оперировать не абсолютными значениями исследуемых показателей, а уровнями позитивности с выделением низко-, умеренно- и высокопозитивных результатов

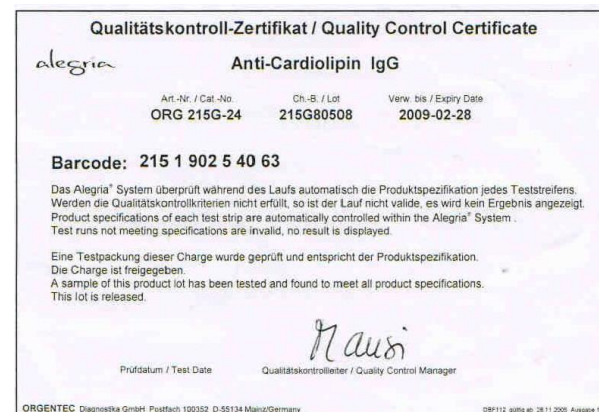
Александрова Е.Н., Новиков А.А., Новикова Д.С. Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома. Научно-практич. ревматол., 2004, 4, 47-52.

Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. М., Литтерра, 2004, 440 с

Возможность решения проблем диагностики АФС

**Наличие в регионе (областном центре) собственной
лаборатории, выполняющей необходимый спектр
исследований,
с соблюдением правил преаналитического и аналитического
этапов диагностики,
на должном технологическом уровне,
с наличием специалистов в данной области диагностики,
имеющей возможность «обратной связи» с клиницистом**

Автоматизация исследований, точность анализа



alegria



Новые подходы к определению АФЛ



Иммуноблоттинг **BlueDiver Dot**



Иммунохемилюминесцентный анализ **HemosIL ACL AcuStar**



Мультиплексный анализ
BioPlex 2200

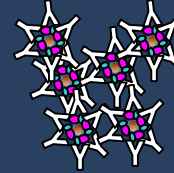
BioPlex® 2200 APLS IgG



'Criteria' aPL tests: Report of a Task Force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. SS Pierangeli, PG de Groot et al. Lupus 2011 20: 182-190

Парамагнитные частицы

- связывание в по всему объему
- максимальная скорость реакции



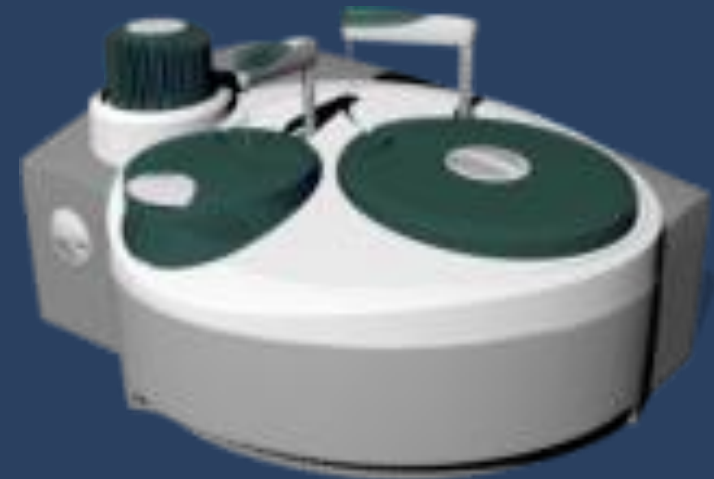
Рекомендации
SSC/ISTH 2014

Согласно руководству ISTH

- Порог представляет собой 99 процентиль от нормальных значений
- Выбирается 20 Ед/мл для всех тестов

Хемилюминесценция

- Высокая чувствительность
- Широкий диапазон
- Минимум интерференции



ACL AcuStar

Антифосфолипидный синдром (АФС)

Лечение:

- Антикоагулянты

Варфарин

НМГ

Новые АК

- Антиагреганты

- Плаквенил

- Статины

- Плазмаферез

- Ритуксимаб

- Ингибция комплемента

(Eculizumab)

- ГКС (вторичный АФС) и др.





Association of Laboratory
specialists and organizations
«Federation of Laboratory Medicine»

Ассоциация специалистов
и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!