УДК: 616.5-002.524-074:273.53]-06-005-084

ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРОФИЛАКТИКИ СОСУДИСТЫХ КАТАСТРОФ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ КОММЕРЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЛЧАНОЧНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА

Антон Васильевич ИНДУТНЫЙ, Татьяна Владимировна ВАВИЛОВА, Дмитрий Георгиевич НОВИКОВ, Александр Александрович БАРСУКОВ

ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет (ОмГМУ) Минздрава России
644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

Стандартизация способов определения волчаночного антикоагулянта представляет собой сложную проблему. Для ее решения Международным обществом по изучению тромбозов и гемостаза (ISTH) в 2009 г. принято «Обновление руководства по определению волчаночного антикоагулянта». Нами выполнен анализ характеристик наборов реактивов и описаний протоколов исследования волчаночного антикоагулянта, предлагаемых на российском рынке, на предмет соответствия Руководству ISTH. Обнаружено, что реагенты только 2 из 8 компаний-производителей соответствуют Руководству ISTH, а инструкции других производителей содержат значительные отклонения от данного документа.

Ключевые слова: волчаночный антикоагулянт, лабораторная диагностика, сравнительная характеристика тест-систем.

Антифосфолипидный синдром (АФС) является одной из наиболее частых причин артериальных и венозных тромбозов у беременных и лиц молодого возраста [1]. Согласно международным рекомендациям, диагноз АФС может быть установлен при наличии одного из клинических критериев (артериального или венозного тромбоза, невынашивания плода) в сочетании с одним из лабораторных критериев: обнаружением антител к кардиолипину, антител к β2-гликопротеину I или волчаночного антикоагулянта (ВА) [8]. Следует отметить, что ВА представлен не значениями концентрации антител, а является клоттинговым феноменом, стандартизация способов измерения которого является достаточно сложной проблемой. По данным ряда авторов, ни один из используемых на сегодняшний день тестов для обнаружения ВА не обладает достаточной аналитической чувствительностью в отношении всех разновидностей антител, присутствие которых обусловливает данный феномен [7, 10, 11, 13].

Международным обществом по изучению тромбозов и гемостаза (ISTH) для уточнения критериев определения ВА в 2009 г. было принято «Обновление руководства по определению волчаночного антикоагулянта» [11]. В целях выяснения соответствия требованиям этого документа в нашем исследовании выполнен анализ характеристик наборов реактивов и описаний протоколов исследования ВА, предлагаемых на российском рынке отечественными и зарубежными компаниями-производителями.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для получения необходимой информации нами проведен анализ результатов следующих поисковых интернет-запросов: «волчаночный антикоагулянт, тест-системы», «волчаночный антикоагулянт, реагенты», «волчаночный антикоагулянт, набор», «волчаночный антикоагулянт, производители», «волчаночный антикоагулянт,

Индутный А.В. *– д.м.н., доцент, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории, e-mail: anton@indutny.com*
Вавилова Т.В. *– д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики и генетики, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории, e-mail: cnil.osma@gmail.com*
Новиков Д.Г. *– к.м.н., зав. центральной научно-исследовательской лабораторией, e-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com*
Барсуков А.А. *– интерн кафедры клинической лабораторной диагностики, e-mail: a.barsukov.omsk@gmail.com*

инструкция». В качестве поисковой системы использовали Google™. Количество ссылок по результатам запросов варьировало от 10500 до 16300. Анализу подвергали 10 первых страниц выдачи результатов по каждому поисковому запросу. Из результатов поиска выбирали информацию о фирмах-производителях тест-систем для обнаружения ВА и тексты инструкций к данным реагентам и их комплектам.

В результате интернет-поиска получена вышеописанная фактическая информация о тест-системах 8 фирм-изготовителей:

1) «Helena Biosciences Europe», Великобритания («DRVVT Screen», «DRVVT Confirm»);

2) «Instrumentation Laboratory» США («HemosIL Silica Clotting Time», «HemosIL dRVVT Screen», «HemosIL dRVVT Confirm»);

3) «Siemens», Германия («LA 1 Screening Reagen», «LA 2 Confirmation Reagent»);

4) «Stago», Франция («STA-Staclot DRVV Screen/Confirm», «PTT-LA»);

5) «Technoclot», Австрия («LA Screen», «LA Confirm»);

6) «Trinity Biotech», Ирландия («Lupus Screen», «Lupus Confirm»);

7) «Ренам», Россия («Набор реагентов для определения волчаночного антикоагулянта»);

8) «Технология-Стандарт», Россия («Люпус-тест»).

На предмет соответствия требованиям к преаналитическому, аналитическому и постаналитическому этапам, содержащимся в Руководстве ISTH [11], рассматривали сведения о технологии выполнения исследования, указанные в инструкциях производителей тест-систем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные (см. таблицу) свидетельствуют о том, что в изучаемом информационном материале ни для одного из восьми производителей тест-систем не обнаружено полного соответствия Руководству ISTH по вопросам обеспечения преаналитического этапа. Пробирки с концентрацией цитрата натрия 3,2 % (0,109 М) требовали использовать три производителя тест-систем из восьми. Инструкции к остальным тест-системам допускали использование иной концентрации цитрата натрия (3,8 %, или 0,129 М; 3,2 %, или 0,106 М) либо вовсе не содержали указаний о его надлежащей концентрации. Вместе с тем использование пробирок с несоответствующей концентрацией цитрата натрия может привести к удлинению активированного частичного тромбопластинового времени (тест АЧТВ), который используется для выявления ВА [2, 11].

Режим центрифугирования, рекомендованный ISTH для получения бестромбоцитарной плазмы (двойное центрифугирование; первичное – 2000 g 15 мин, повторное – 2500 g 10 мин [11]), указан в инструкциях двух производителей тест-систем, остальные шесть рекомендовали либо двойное центрифугирование с иным ускорением и временем, либо однократное центрифугирование. Несоблюдение рекомендаций ISTH при получении бестромбоцитарной плазмы, очевидно, может привести к повышенному содержанию тромбоцитов в исследуемом материале, являющихся источником фосфолипидов, и маскировке эффекта ВА [11]. При использовании режима центрифугирования с ускорением более 2500 g растет вероятность разрушения тромбоцитов, что может обусловить появление ложноотрицательного результата теста ВА [4]. Одним из производителей тест-систем было рекомендовано получение бестромбоцитарной плазмы путем микрофильтрования, однако данный подход не вполне оправдан, так как может повлечь потерю фактора Виллебранда [5, 6]. Биоматериал после центрифугирования должен быть как можно скорее подвергнут исследованию, а в тех случаях, когда исследование плазмы пациента откладывается, ее необходимо немедленно заморозить при –70 °С, что указано в инструкциях к тест-системам двух производителей, при этом в инструкциях к остальным наборам реактивов рекомендовано замораживать плазму при –20 °С, что может привести к искажению результатов анализа из-за возможной холодовой активации или разрушения факторов свертывания.

Известно, что получение пула нормальной плазмы (ПНП), требующегося для дальнейшего исследования со смешением плазм и для проведения параллельных исследований в скрининговых и подтверждающих тестах, осуществляется так же, как и получение бестромбоцитарной плазмы методом двойного центрифугирования. Необходимым условием является содержание тромбоцитов в ПНП менее 10^7/мл и практически 100-процентная активность всех факторов свертывания [11]. Такая информация была приведена в инструкциях для трех производителей тест-систем, тогда как остальные либо не устанавливали метод получения ПНП, либо предлагаемый ими режим центрифугирования отличался от установленных нормативов.

Определение ВА рекомендуется проводить путем двух исследований, основанных на использовании различных активаторов свертывания. ISTH предлагает определять АЧТВ с использованием реагента, чувствительного к ВА (с кварцевым активатором), и время свертывания плазмы

Таблица

Характеристика доступных на российском рынке тест-систем в аспекте соответствия требованиям, содержащимся в Обновлении руководства ISTH по определению волчаночного антикоагулянта (2009)

Актуальные рекомендации ISTH по определению волчаночного антикоагулянта (2009)	Распределение технологий фирм-производителей в зависимости от их соответствия рекомендациям ISTH по определению ВА:	
	соответствуют	не соответствуют
I. Преаналитический этап		
Концентрация цитрата натрия 0,109 М (3,2 %), в соотношении 9:1	3	5
Центрифугирование: первичное – 2000 g, 15 мин; повторное – 2500 g, 10 мин	2	6
Замораживание плазмы (–70 °С), если ее исследование проводится не сразу	2	6
Получение пула нормальной плазмы с количеством тромбоцитов < 10^7/мл и с активностью всех факторов свертывания практически равной 100 % (двойное центрифугирование плазмы здоровых доноров)	3	5
II. Аналитический этап		
Используемые тесты: АЧТВ, чувствительный к ВА, с кварцевым активатором; время свертывания с ядом гадюки Рассела (dRVVT)	2	6
Количество скрининговых тестов равно 2	2	6
Количество подтверждающих тестов равно 2	2	6
Использование фосфолипидов в двуслойной или гексагональной (II) фазах	2	6
Использование кварцевого активатора свертывания в тесте АЧТВ	2	6
Проведение теста со смешением без предварительной инкубации при 37 °С	3	5
Наличие адаптации для автоматического коагулометра	7	1
Постаналитический этап		
Рекомендации расчета НО: НО = СО/ПО	7	1
Границы положительных и отрицательных значений: НО > 2,0 – ВА резко положительный; НО 1,5–2,0 – ВА положительный; НО 1,2–1,5 – ВА слабо положительный; НО <1,2 – ВА отсутствует	7	1
Рекомендации расчета ИЦА: ИЦА = (ВС*смеси* – ВС*пнп*/ВС*б*) × 100%	0	8

крови с ядом гадюки Рассела (dRVVT). Использование других активаторов нежелательно, так как на сегодняшний день недостаточно данных об их чувствительности к ВА, а для некоторых из таких активаторов показана низкая чувствительность [7, 9, 10, 12, 14]. Кроме того, установлено, что проведение исследований более чем с двумя активаторами свертывания повышает число ложноположительных результатов [11]. Более 2 активаторов свертывания предлагалось использовать в наборах реагентов двух производителей, 1 активатор – в наборах реагентов четырех производителей. Среди активаторов свертывания, не указанных в Руководстве ISTH, предлагается использовать лебетокс (коагулазу яда гюрзы) – как аналог яда гадюки Рассела, тромбопластин, а также иные активаторы для проведения АЧТВ-теста: эллаговую кислоту и каолин. Использование лебетокса позиционируется отечественными производителями как возможность удешевления тест-системы, так как на территории России и стран Таможенного союза гадюка Рассела не обитает.

Как известно, исследования ВА подразделяются на скрининговые и подтверждающие. В скрининговых тестах используются АЧТВ или dRVVT-реагенты с низким уровнем фосфолипидов для выявления различий между нормальной и патологической плазмами, обусловленных присутствием ВА. В подтверждающих тестах – АЧТВ или dRVVT-реагенты с избытком фосфолипидов для компенсации их дефицита, возникающего из-за присутствия ВА. Для повышения концентрации фосфолипидов ISTH рекомендует использовать фосфолипиды в двухслойной или гексагональной (HII) фазах [10, 11]. Реагенты для АЧТВ-теста с фосфолипидами подобной структуры выпускаются двумя фирмами-производителями из восьми. ISTH не рекомендует использовать

фосфолипиды, полученные из лизата тромбоцитов при их замораживании/оттаивании, из-за весьма вероятных различий в содержании фосфолипидов между партиями реагента [11], однако в составе шести тест-систем использованы лизат тромбоцитов или тромбоцитин.

Итогом проведения скрининговых тестов для определения ВА является подсчет скринингового отношения (СО) – отношение времени скринингового теста пациента ко времени скринингового теста ПНП. Если СО ≥ 1,2 – переходят к следующему этапу, на котором рекомендовано проводить тест со смешением. Для этого в плазму пациента добавляют донорскую бестромбоцитарную плазму, не содержащую ВА, в соотношении 1:1 и повторно проводят скрининговые тесты. Смешивание проводят с целью определения причины повышения значения клоттинговых тестов – связана ли она с дефицитом факторов свертывания или с присутствием ВА. Отсутствие укорочения времени свертывания указывает на наличие в плазме ВА. В алгоритме определения ВА тесты со смешиванием рекомендуют использовать семь производителей из восьми. ISTH не рекомендует инкубировать смесь плазм, чему соответствуют инструкции трех производителей из пяти.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тест-системы семи (из восьми) рассматриваемых нами производителей имеют указание на их адаптацию для автоматических коагулометров. Очевидно, что автоматизация способствует повышению качества лабораторного тестирования вследствие лучшей стандартизации протокола анализа и процедур управления качеством тестирования. В Руководстве ISTH рекомендовано при определении ВА рассчитывать индекс циркулирующего антикоагулянта (ИЦА), причем чем он выше, тем вероятнее наличие в плазме пациента ВА. Вместе с тем ни один из рассмотренных производителей тест-систем не указывал на необходимость расчета ИЦА.

При увеличении значения скринингового отношения и отсутствии сокращения времени свертывания в тестах смешивания ISTH рекомендует проводить подтверждающие тесты с избытком фосфолипидов и вычислять подтверждающее отношение (ПО) как отношение времени подтверждающего теста плазмы пациента ко времени подтверждающего теста ПНП [11]. Заключение о присутствии ВА в плазме пациента ISTH рекомендует выносить после расчета нормализованного отношения (НО), вычисляемого по формуле: НО = СО/ПО. Если НО ≥ 1,2, то ВА присутствует в плазме пациента [11]. Расчет НО рекомендован семи (из восьми) производителей тест-систем. В инструкциях к тест-системам двух производителей были указаны референтные значения для подтверждающих тестов, при этом в одной из них, не содержащей указаний на необходимость расчета НО, судить о присутствии ВА предлагается на основании нормализации значений подтверждающих тестов. Такой подход не поддерживается ISTH, так как в некоторых случаях при наличии ВА время выполнения теста укорачивается, но при этом не соответствует референтным значениям, что может привести к получению ложноотрицательного результата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе имеющейся в свободном интернет-доступе информации о тест-системах для определения ВА обнаружено, что на российском рынке лабораторных реагентов для исследования гемостаза представлены технологии, имеющие различную степень соответствия требованиям ISTH. Только в наборах реагентов двух компаний-производителей лабораторный этап соответствует по протоколу рекомендациям, указанным в «Обновлении руководства ISTH по определению волчаночного антикоагулянта» [11]. При этом нередко реагенты выпускаются не в форме единой тест-системы для тестирования ВА, а представлены отдельно приобретаемыми компонентами, из которых лабораторный пользователь-аналитик составляет определенный, требующийся для исследования ВА, комплект. Таким образом, пользователь из отдельных самостоятельных элементов фактически формирует тест-систему для определения ВА. Это, безусловно, предполагает необходимость в его достаточной информированности по вопросам актуальных клинических и лабораторно-технологических рекомендаций. Комплексное решение задачи определения ВА было представлено только в тест-системе одного производителя, в то же время эта система не соответствовала целому ряду рекомендаций ISTH.

Инструкции по выполнению исследований большинства производителей содержали значительные отклонения от принципов соответствующего документа ISTH [11]. Несоответствия проявлялись не только в отступлениях от требований к преаналитическому или постаналитическому этапам, но и в отличиях технологических и аналитических характеристик тест-систем, принципах определения ВА. Таким образом, врач клинической лабораторной диагностики, использующий данные тест-системы, даже несмотря на владение информацией «Обновления руководства ISTH по определению волчаночного антикоагулянта» не сможет следовать рекомендациям, указанным в этом руководстве при использовании таких набо-

ров реактивов. Учитывая, что те реагенты, которые соответствуют принятым ISTH требованиям, производятся для закрытых лабораторных систем, ограниченно распространенных в России, большинство клинических лабораторий оказываются существенно сдержанными в возможностях корректной диагностики ВА. Отступление от рекомендаций ISTH может стать причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов исследования и, как следствие, нецелесообразного назначения терапии или необоснованного бездействия со стороны клинициста. Последнее обстоятельство повышает риск развития сосудистых катастроф, являющихся проявлением АФС. Необходимо также подчеркнуть, что как в диагностике, так и при выборе терапии АФС необходимо опираться на рекомендации Международной специальной комиссии (по итогам 13-го Международного конгресса по АФЛ 2010 г.) об идентификации высокого или низкого риска последующих тромбозов, которые требуют маркирования уровня как минимум трех типов АФЛ с обязательной динамикой во времени и клинической интерпретацией ассоциаций [3].

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания Минздрава России по теме «Особенности реализации крупных кардиоваскулярных событий при злоупотреблении алкоголем: патохимические механизмы; клинико-лабораторные критерии риска, диагностики, мониторинга и прогноза развития патологии у жителей Западной Сибири», номер государственной регистрации 115031760044.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Берковский А.Л., Калашникова Л.А., Сергеева Е.В. и др*. Диагностика волчаночного антикоагулянта. М., 2013. 48 с.

2. *Adcock D.M., Kressin D.C., Marlar R.A*. Effect of 3.2 % vs 3.8 % sodium citrate concentration on routine coagulation testing // Am. J. Clin. Pathol. 1997. (107). 105–110.

3. Antiphospholipid Syndrome: Insights and Highlights from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies / Eds. D. Erkan, S.S. Pierangeli. N. Y.: Springer Science + Business Media, 2012.

4. *Arnout J., Meijer P., Vermylen J*. Lupus anticoagulant testing in Europe: an analysis of results from the first European Concerted Actionon Thrombophilia (ECAT) survey using plasmas spiked with monoclonal antibodies against human beta2-glycoprotein I // J. Thromb. Haemost. 1999. (81). 929–934.

5. *Favaloro E.J*. Preanalytical variables in coagulation testing // Blood Coagul. Fibrinolysis. 2007. (18). 86–89.

6. *Favaloro E.J., Bonar R., Sioufi J. et al.* Multilaboratory testing of thrombophilia: current and past practice in Australasia as assessed through the Royal College of Pathologists of the Australasia Quality Assurance Programs for Hematology // Semin. Thromb. Haemost. 2005. (31). 49–58.

7. J*ennings I., Kitchen S., Woods T.A. et al.* 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 // J. Thromb. Haemost. 1997. (77). 934–937.

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

9. *Moore G.W., Smith M.P., Savidge G.F*. The Ecarin time is an improved confirmatory test for the Taipan snake venom time in warfarini zed patients with lupus anticoagulants // Blood Coagul. Fibrinolysis. 2003. (14). 307–312.

10. *Pengo V., Biasiolo A., Gresele P. et al*. A comparison of lupus anticoagulant-positive patients with clinical picture of antiphospholipid syndrome and those without // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007. (27). 309–310.

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

12. *Triplett D.A., Barna L.K., Unger G.A*. A hexagonal (II) phase phospholipids neutralization assay for lupus anticoagulant identification // J. Thromb. Haemost. 1993. (70). 787–793.

13. *Tripodi A., Biasiolo A., Chantarangkul V., Pengo V*. Lupus anticoagulant (LA) testing: performance of clinical laboratories assessed by a national survey using lyophilized affinity purified immunoglobulin with LA activity // Clin. Chem. 2003. (49). 1608–1614.

14. *Urbanus R.T., Derksen R.H., De Groot P.G*. Current insight into diagnostics and pathophysiology of the antiphospolipid syndrome // Blood Rev. 2008. (2). 93–105.

PROBLEMS OF LABORATORY BASED PREVENTION OF VASCULAR ACCIDENTS USING VARIOUS COMMERCIAL LUPUS ANTICOAGULANT DETECTION REAGENT KITS

Anton Vasilevich INDUTNY, Tatyana Vladimirovna VAVILOVA, Dmitriy Georgievich NOVIKOV, Alexandr Alexandrovich BARSUKOV

Omsk State Medical University
644099, Omsk, Lenin str., 12

Standardization of lupus anticoagulant detection methods is a difficult problem. The International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) issued the «Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection» in 2009 to solve this task. The characteristics of Russian-manufactured reagent kits and descriptions of study protocols for lupus anticoagulant detection have been analyzed for the purpose of compliance with the ISTH Guidelines. It has been revealed that reagents of only 2 (among 8) manufacturers matched with the ISTH Guidelines. The significant deviations from this document have been revealed in manuals from other reagent kits manufacturers.

Key words: lupus anticoagulant, laboratory diagnostics, reagent kits comparative characteristics.

Indutny A.V. *– doctor of medical sciences, associate professor, head of the departmentof clinical laboratory diagnostics, leading researcher of central research laboratory, e-mail: anton@indutny.com*
Vavilova T.V. *– doctor of medical sciences, professor, head of the department of clinical laboratory diagnostics and genetics, leading researcher of central research laboratory, e-mail: cnil.osma@gmail.com*
Novikov D.G. *– candidate of medical sciences, head of the central research laboratory, e-mail: novikov.dm.omsk@gmail.com*
Barsukov A.A. *– internship doctor of department of clinical laboratory for diagnostics, e-mail: a.barsukov.omsk@gmail.com*