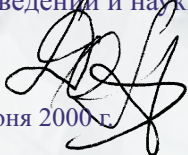


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

**СОГЛАСОВАНО**

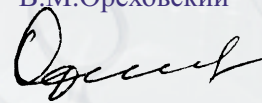
Заместитель начальника  
Главного управления кадровой политики,  
учебных заведений и науки Н.И. Доста



19 июня 2000 г.

**УТВЕРЖДАЮ**

Первый заместитель  
министра здравоохранения  
В.М.Ореховский



20 июня 2000 г.

Регистрационный № 77-0005

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ  
АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА  
НА ОСНОВЕ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ  
АНТИТЕЛ К  $\beta_2$ -ГЛИКОПРОТЕИНУ 1  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

**Минск 2000**

**[Перейти к оглавлению](#)**

**Основное учреждение-разработчик:** НИИ гематологии и переливания крови

**Учреждения-соисполнители:** БелГИУВ, 9-я клиническая больница г. Минска

**Авторы:** Г.Е. Иванов, Т.С. Гарбузенко, Т.С. Колесникова, Н.И. Кривицкая, А.В. Чистякова, Е.П. Иванов, Н.В. Петёвка, Н.Ф. Сорока, В.Н. Гапанович, А.Б. Максимович, И.Н. Аликевич, О.В. Ласкина, К.В. Сальников, Т.М. Башманова

**Рецензенты:** Л.С. Смирнова, канд. мед. наук Г.М. Костин

Разработан иммуноферментный метод диагностики антифосфо-липидного синдрома на основе качественного выявления антифосфолипидных антител к  $\beta_2$ -гликопротеину 1 ( $\beta_2$ -ГП 1) в сыворотке крови больных. Дано обоснование его клинической значимости для диагностики антифосфолипидного синдрома. Методические рекомендации предназначены для врачей клинико-диагностических лабораторий.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

# Оглавление

<b>ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>КОМПЛЕКС НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ .....</b>	<b>9</b>
Набор реагентов для постановки ИФА .....	9
<b>ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ .....</b>	<b>11</b>
Получение сыворотки для исследования .....	11
<b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА .....</b>	<b>12</b>
Принцип метода .....	12
Способ применения .....	12
Анализ полученных результатов .....	14
Построение калибровочной кривой .....	14
Пример применения метода для диагностики АФС .....	16
<b>КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВЫПОЛНЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>18</b>

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

Антифосфолипидный синдром (АФС) обусловлен появлением в крови антифосфолипидных антител, реагирующих с отрицательно заряженными, реже нейтральными фосфолипидами и/или фосфолипидсвязанными протеинами крови. Спектр клинических проявлений АФС чрезвычайно разнообразен, поскольку при АФС могут поражаться сосуды любого калибра и локализации. В рамках АФС описаны патология ЦНС (рецидивирующие тромбозы мозговых сосудов, судорожный синдром, психические нарушения), сердечно-сосудистой системы (поражение клапанов сердца, инфаркт миокарда, ускоренное атеросклеротическое поражение сосудов), нарушение функции почек (инфаркт почек, гломерулосклероз) и легких (альвеолярные геморрагии, легочный капиллярит и микрососудистый тромбоз вплоть до развития «шокового» легкого). Частыми признаками симптомокомплекса АФС являются поражения кожи (сетчатое ливедо, кожные язвы, псевдоваскулитные и васкулитные поражения, поверхностный тромбофлебит) и различные формы акушерской патологии (самопроизвольные аборты, внутриутробная гибель плода, поздний гестоз, преэклампсия и эклампсия, задержка развития плода, преждевременные роды). Развитие геморрагических осложнений наблюдается, как правило, в связи с сопутствующим дефектом факторов свертывания крови, патологией почек или передозировкой антикоагулянтов.

В клинической практике выделяют две формы АФС: первичный и вторичный. Диагноз первичного АФС устанавливается в ситуациях, когда у пациента с характерной клиникой и без четких признаков фоновых заболеваний выявляются антифосфолипидные антитела (АФА). Диагноз вторичного АФС устанавливается при обнаружении АФА в крови у пациентов с диффузными болезнями соединительной ткани (ДБСТ): системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит, системные васкулиты и др.; с аутоиммунными, вирусными и онкогематологическими заболеваниями, сопровождающимися иммунной недостаточностью. По данным Итальянского Регистра АФА, в 20–30% случаев встречаются первичные формы и 70–80% — вторичные.

В связи с широкой распространенностью, разнообразием клинических проявлений и несвоевременной диагностикой пациенты с АФС долгое время безуспешно лечатся у специалистов узкого профиля: кардиологов, ревматологов, невропатологов, акушеро-гинекологов и др., нередко подвергаясь необоснованным манипуляциям. По этой причине разработаны следующие критерии отбора больных, требующих проведения диагностических тестов с целью обнаружения АФА:

- тромбозы в анамнезе;
- ассоциация артериального и венозного тромбозов;
- нетипичная локализация тромбозов (например, мезентериальных, церебральных или почечных вен);
- хронические рецидивирующие тромбозы и тромбозы поверхностных вен с образованием язв;
- повторные самопроизвольные аборт без акушерско-гинекологической патологии;
- сетчатое ливедо;
- стойкая умеренная тромбоцитопения ( $70-100 \times 10^9/\text{л}$ ).

Пациентам с вышеперечисленными критериями необходимо проводить комплекс диагностических тестов, которые могут быть разделены на две большие группы: гемостазиологические и иммунологические.

Лабораторная диагностика АФС в настоящее время основана на определении антикардиолипидных антител (АКА) с помощью иммунофлуоресцентного метода с использованием иммобилизованного на твердой фазе кардиолипина и определение волчаночного антикоагулянта (ВА) с помощью функциональных коагуляционных тестов.

Достоинством этой группы тестов является быстрота и простота выполнения, относительно низкая стоимость и способность своевременно выявить склонность к тромботическим осложнениям. Однако, классические тесты имеют ряд недостатков:

1. Кардиолипид не является физиологически адекватным фосфолипидным антигеном, а  $\beta_2$ -гликопротеин 1 (ГП 1), присутствующий в этом анализе, получен из бычьей сыворотки, а не из человеческой, поэтому метод требует дополнительной стандартизации с использованием человеческого белка.

2. Антикардиолипидный анализ выявляет не только тромбогенные, но и «инфекционные» (не тромбогенные) антитела, что снижает специфичность теста для прогнозирования тромботических осложнений.

3. В связи с неоднородностью воздействия ВА на систему свертывания крови (относительно низкая специфичность: тест может быть ложноположительным при дефиците факторов свертывания, аллергических состояниях и как реакция на лекарственные препараты, в частности, при приеме анти-коагулянтов), лабораторная диагностика его требует использования подтверждающих тестов — удлинение активированного частичного тромбобластного времени (АЧТВ) и каолиновое время свертывания.

Выявление  $\beta_2$ -ГП 1, как белка-мишени для АФА, открыло новую страницу в изучении и диагностике АФС. Несомненным достоинством данного теста (позволяющим достоверно определить тромбогенный риск) является высокая его специфичность: наличие высоких титров анти-  $\beta_2$ -ГП 1 у пациентов с клиническими проявлениями, а при отрицательных результатах анализа АКА и ВА, позволяет установить диагноз первичного АФС. Кроме того, количественное определение титров антител дает возможность контроля эффективности проводимой терапии.

На основании полученных данных предлагается классифицировать пациентов с АФС по трем группам по степени риска развития тромбоэмболических эпизодов:

1 группа — пациенты с низким риском (отсутствие тромбозов в анамнезе, отсутствие АКА, низкие титры анти- $\beta_2$ -ГП1, а также незначительное удлинение времени коагуляционных тестов);

2 группа — пациенты с промежуточным риском (ни одного или один тромбоэмболический эпизод в анамнезе, менее двух аборт, наличие АКА, средний титр анти- $\beta_2$ -ГП 1, удлинение времени в нескольких коагуляционных тестах);

3 группа — пациенты с высоким риском (два или более тромбоэмболических эпизода в анамнезе, повторные выкидыши, наличие АКА, высокий титр анти- $\beta_2$ -ГП 1 и значительное удлинение времени во всех коагуляционных тестах).

Предложенная классификация, в определенной мере, является условной, однако может быть полезной при прогнозировании тяжести течения болезни и выборе тактики и контроля проводимых лечебно-профилактических мероприятий.

Однако следует отметить, что анти- $\beta_2$ -ГП 1 тест не должен рассматриваться как замена определения ВА или АКА. Только комплекс диагностических тестов: исследование АКА, волчаночных коагулянтов и антител к  $\beta_2$ -ГП 1, позволит верифицировать диагноз АФС, определить степень тяжести заболевания, прогнозировать возможные осложнения и контролировать эффективность проводимой терапии.



## КОМПЛЕКС НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

1. Лабораторная центрифуга.
2. Рефрижератор (от  $-20$  до  $-70^{\circ}$  С).
3. Встряхиватель для планшета.
4. Спектрофотометр для измерения оптического поглощения (планшетного типа).

### Набор реагентов для постановки ИФА:

*планшеты для иммунологических реакций*

96-луночные плоскодонные 4 шт.

Буфер для иммобилизации — 40 мл 1 флакон

$\beta_2$ -гликопротеин 1 (0,1 мг/мл) — 2 мл 1 флакон

*Блок-раствор :*

ФСБ –20 мл (10-кратный) 1 флакон

2% желатин — 4 г 1 флакон

*Стандарт для калибровки*

Референс-сыворотка — 0,1 мл 1 пробирка

Отрицательный контроль — 0,2 мл 1 пробирка

Буфер для отмывки — 60 мл (10-кратный) 1 флакон

Твин-20 (0,05%) — 0,3 мл 1 пробирка

Конъюгат — 2 мл 1 флакон

Буфер для разведения конъюгата — 40 мл 1 флакон

Субстратный буфер — 40мл 1 флакон

ОФД (в таблетках), (по 2 мг) 8 таблеток

Стоп-реагент (конц. серная кислота) — 1 мл 1 флакон

Референс-сыворотка предназначена для количественного определения ( в стандартных единицах измерения) содержания.

АФА в сыворотках крови, при отсутствии референс-сыворотки определение содержания АФА производят качественным методом (по оптической плотности).

Содержимое набора обеспечивает определение АФА в 50 образцах (в триплетах) сывороток больных.

Хранение набора должно производиться при температуре  $+4$ – $+8^{\circ}\text{C}$  в течение 2 недель.  $\beta_2$ -гликопротеин 1, референс-сыворотка и отрицательный контроль хранятся в аликвотах при температуре от  $-20$  до  $-70^{\circ}\text{C}$ . Не рекомендуется их использовать после повторного цикла размораживания.

## **ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ**

Все компоненты набора являются неинфекционными.

Меры предосторожности при работе с сыворотками (кровью) больных: соблюдение правил работы с условно-патогенным материалом, обязательное использование защитных марлевых повязок, хирургических перчаток и медицинских халатов.

### **Получение сыворотки для исследования**

Кровь из локтевой вены путем венепункции забирают в полистирольную пробирку объемом 5 мл. Процедуру у больных проводят утром до приема пищи и лекарственных препаратов.

Кровь выдерживается в течение 30 мин при температуре 37° С. Затем центрифугируется 15 мин при 3000 об./мин. Сыворотка отсасывается и расфасовывается в полипропиленовые пробирки ( типа «Эппендорф») по 0,5 мл. Исследуется сыворотка как свежевыделенная, так и однократно замороженная. Исследование после повторного цикла замораживания не рекомендуется. Хранится при –20° С в течение 2–3 мес.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

### Принцип метода

Основным свойством разработанной тест-системы является способность выявлять АФА в сыворотке крови за счет их взаимодействия с  $\beta_2$ -ГП 1, иммобилизованном на твердой фазе и пероксидазным конъюгатом против иммуноглобулинов человека (для выявления связавшихся специфичных к антигену антител). Образованный комплекс антиген-антитело выявляется посредством оценки ферментативной активности пероксидазы инкубацией с субстратом, дающим в результате реакции окраску раствора различной интенсивности. Продукт ферментативной реакции образуется в количествах, пропорциональных количеству связавшихся антител.

### Способ применения

#### *Иммобилизация $\beta_2$ -гликопротеина 1 на планшеты*

Для анализа используются  $\gamma$ -облученные планшеты фирмы Flow Lab.  $\beta_2$ -ГП 1 (5 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере (0,015 моль  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,035 моль  $\text{NaHCO}_3$  ; pH 9,6), вносят по 100 мкл/лунку планшета и инкубируют при  $+4^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. После инкубации планшет отмывают 3 раза дистиллированной водой. Удаляют жидкость из планшета путем стряхивания.

#### *Внесение блок-раствора*

Блок-раствор (фосфатно-солевой буфер (ФСБ) — 0,015 моль NaCl; 0,0025 моль KCl; 0,01 моль Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,002 моль KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4 и 2% желатин, добавляемый в ФСБ непосредственно перед работой) вносят по 300 мкл/лунку. После 30-минутной инкубации (при комнатной температуре), планшет отмывают 2 раза дистиллированной водой. Удаляют жидкость из планшета путем стряхивания.

#### *Внесение образцов сыворотки*

Готовят серии разведений референс-сыворотки, отрицательного контроля (пулированная сыворотка здоровых доноров) и исследуемых сывороток в блок-растворе.

Исследуемые сыворотки и отрицательный контроль разводят в соотношении 1:25 и 1:50.

Референс-сыворотку разводят в соотношении 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200.

Разведенные образцы сывороток (каждый вариант включает 3 повтора) вносят в микроплаты по 100 мкл/лунку и инкубируют в течение часа при комнатной температуре при постоянном встряхивании. После инкубации планшет отмывают 3 раза буфером для отмывок (0,15 моль NaCl; 0,01 моль Tris-HCl; 0,05% Tween-20; pH 7,4). Удаляют жидкость из планшета путем стряхивания.

#### *Внесение конъюгата*

Пероксидазный конъюгат против иммуноглобулинов человека (анти-IgG) (Abbott) разводят 1:20 в буфере для разведения конъюгата и вносят по 100 мкл/лунку. Инкубируют планшет в течение часа при комнатной температуре при постоянном встряхивании. После инкубации планшет отмывают 3 раза буфером для отмывок. Удаляют жидкость из планшета путем стряхивания.

#### *Внесение субстратной смеси*

Субстратную смесь (цитрат 0,02 моль Na, 0,03% перекись водорода, pH 5,0; ортофенилендиаминдигидрохлорид (ОФД) (1таблетка на 5 мл буфера) готовят непосредственно перед употреблением и вносят по 100 мкл/лунку. Инкубацию проводят в темноте при комнатной температуре в течение 8–10 мин. Реакцию останавливают путем внесения в лунки планшета 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по 100 мкл/лунку. Удаляют жидкость из планшета путем стряхивания.

*Учет результатов ИФА* проводят на спектрофотометре с вертикальным ходом луча при длине волны 492 нм.

### **Анализ полученных результатов**

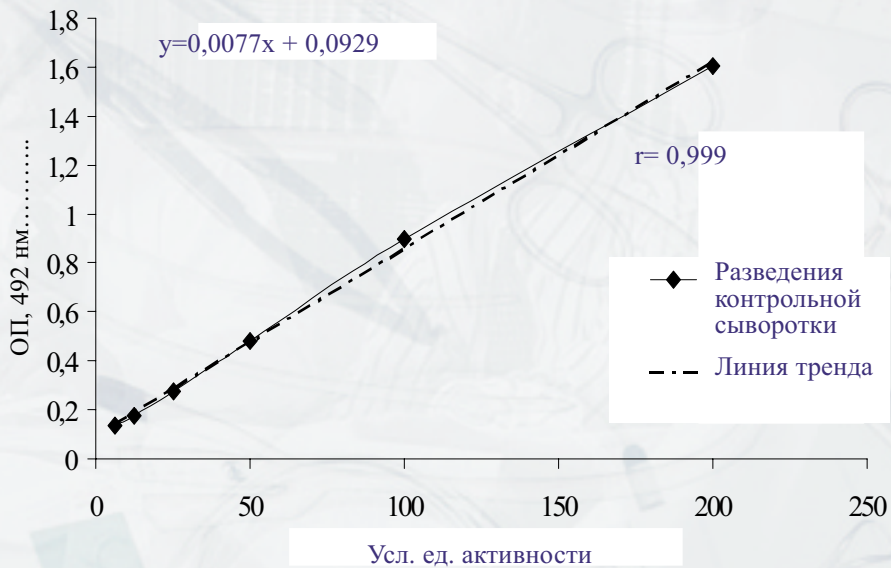
Для количественного определения АФА в исследуемых образцах строят калибровочную кривую в линейных координатах.

Качественное определение содержания АФА в исследуемых образцах оценивают по уровню оптической плотности (ОП). Положительными считаются те сыворотки больных, ОП которых выше отрицательного контроля — среднего значения ОП условно здоровых доноров плюс 5 стандартных отклонений.

### **Построение калибровочной кривой**

Для построения калибровочной кривой строят график зависимости оптической плотности от разведения референс-сыворотки с активностью — 40 000 усл. ед. активности в линейных координатах.

Разведение референс-сыворотки	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
Усл. ед. активности	200	100	50	25	12,5	6,25



Линейность калибровочной кривой наблюдается в диапазоне от 6,25 до 200 усл. ед. активности (в этой области коэффициент корреляции составляет 0,999).

Разведения исследуемых сывороток необходимо подбирать таким образом, чтобы диагностически значимые значения образцов попадали в линейную область калибровки. Таким условиям соответствовали разведения исследуемых сывороток 1:25 и 1:50.

### *Пример применения метода для диагностики АФС*

У больного И., 16 лет, было обнаружено высокое содержание АФА. Этот больной с 10-летнего возраста шел под различными диагнозами и получал не патогенетическое, а синдромное и малоэффективное лечение, на фоне которого проявлялись различные другие симптомы АФС. В 10-летнем возрасте у него появился выраженный геморрагический синдром и была выявлена глубокая тромбоцитопения. На основе диагноза тромбоцитопеническая пурпура аутоиммунного генеза удалось предотвратить кровотечение и нормализовать количество тромбоцитов. Однако у ребенка остался выраженный кушингоид и стероидное ожирение.

Спустя два года у больного стали проявляться множественные тромбозы в глубоких и поверхностных венах нижних конечностей, прогрессировали тромбозы вен малого таза и развивался варикоз вен обеих нижних конечностей. Ребенок лечился у разных врачей с диагнозами: 1) варикозное расширение вен нижних конечностей, осложнившееся тромбозами; 2) посттромбофлебитический синдром, хроническая венозная недостаточность с тромбозом глубоких вен; 3) тромбоваскулит.

Ребенок получал антикоагулянтную терапию, однако эффекта не было. Прогрессировала венозная недостаточность, нарастали трофические расстройства на нижних конечностях. Появились трофические язвы. После госпитализации в отделение ревматологии 9-й ГКБ заподозрили АФС и действительно, исследование показало превышение нормы содержания АФА в 12 раз, подтвердив тем самым диагноз АФС, а с учетом анамнеза был сформулирован полный диагноз: первичный АФС с развитием хронического посттромбофлебитического синдрома (множественные тромбозы в системе нижней полой вены, портальной системе, хроническая венозная недостаточность, портальная гипертензия, трофические язвы обеих нижних конечностей). Было назначено патогенетическое лечение.



***Метод диагностики антифосфолипидного синдрома на основе выявления антифосфолипидных ...***

Таким образом, предварительное клиническое использование созданного метода подтверждает его практическое значение в постановке диагноза антифосфолипидного синдрома.

## **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВЫПОЛНЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Контроль качества данного диагностического метода осуществляется сопоставлением полученных результатов с основными клиническими и лабораторными проявлениями АФС.

В целях исправления возможных ошибок при проведении иммуноферментного анализа, необходимо проводить периодический контроль качества используемых реагентов (измерение рН растворов; соблюдение условий хранения).