

АНАЛИЗ СПЕКТРА АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТОВ С ТРОМБОЗАМИ И ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Ткаченко О.Ю.¹, Лапин С.В.¹, Шмонин А.А.^{1,2,3}, Соловьева Л.Н.²,
Бондарева Е.А.¹, Сельков С.А.⁴, Чепанов С.В.⁴, Тотолян Арег А.^{1,5},
Роггенбук Дирк^{6,7}

¹ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

⁶ Бранденбургский технический университет, Коттбус-Зенфтенберг, Зенфтенберг, Германия

⁷ GA Generic Assays GmbH, Далевец, Германия

Резюме. Лабораторная диагностика антифосфолипидного синдрома (АФС) состоит в выявлении антифосфолипидных антител (АФА) методом иммуноферментного анализа (ИФА), а именно в детекции антикардиолипиновых (аКл) антител и антител к бета-2-гликопротеину (аβ2GPI). Использование классических ИФА тест-систем затруднено их недостаточной стандартизацией. Новым подходом к детекции антифосфолипидных антител является использование мультиплексного лайн-блоттинга (ЛБ), преимуществом которого является сорбция антигенов на гидрофобной PVDF-мембране и детекция спектра АФА.

Целью данного исследования является анализ диагностической ценности нового ЛБ в постановке серологического диагноза АФС.

Нами была собрана коллекция образцов сывороток 45 пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей и 44 пациента с привычным невынашиванием беременности, а также 50 клинически здоровых доноров. В данных сыворотках были измерены аКл IgG, аКл IgM, аβ2GPI методом ИФА с помощью тест-систем фирм Euroimmun (ПР1) и Orgentec Diagnostica (ПР2) и аКл IgG, аКл IgM, аβ2GPI, а также некритериальные АФА – методом иммуноблоттинга на тест-системе фирмы Medipan (ПР3).

При использовании ИФА тест-систем ПР1 аКл и аβ2GPI детектировались у 30,5 % пациентов. ИФА

Адрес для переписки:

Ткаченко Ольга Юрьевна
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова»
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого,
6-8, корп. 28.
Тел.: 8 (921) 095-94-98.
E-mail: tkachenie@mail.ru

Address for correspondence:

Tkachenko Olga Yu.
First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L. Tolstoy str., 6-8,
bldg 28.
Phone: 7 (921) 095-94-98.
E-mail: tkachenie@mail.ru

Образец цитирования:

О.Ю. Ткаченко, С.В. Лапин, А.А. Шмонин,
Л.Н. Соловьева, Е.А. Бондарева, С.А. Сельков,
С.В. Чепанов, Арег А. Тотолян, Дирк Роггенбук «Анализ
спектра антифосфолипидных антител у пациентов
с тромбозами и привычным невынашиванием
беременности» // Медицинская иммунология, 2018, Т. 20,
№ 5. С. 753-762. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-753-762

© Ткаченко О.Ю. и соавт., 2018

For citation:

O. Yu. Tkachenko, S.V. Lapin, A.A. Shmonin, L.N. Solovyova,
E.A. Bondareva, S.A. Selkov, S.V. Chepanov, Areg A. Totolian,
Dirk Roggenbuck "Ranging of antiphospholipid antibodies in the
patients with thrombophilia and recurrent miscarriage", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20,
no. 5, pp. 753-762. doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-753-762

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-753-762

методом на тест-системах ПР2 АФА были обнаружены у 38% пациентов. Методом ЛБ аКл и аβ2GP1 были выявлены у 30% пациентов. Встречаемость средних и высоких титров АФА, измеренных методом ИФА на тест-системах ПР1 и ПР2, составила 12 и 11% соответственно, а методом ЛБ – 16,6%. При анализе спектра АФА методом ЛБ чаще всего обнаруживались аβ2GP1, аФс, аКл, аАн V, аФк.

Метод мультиплексного лайн-блоттинга ЛБ показывает более высокую чувствительность при детекции средних и высоких титров АФА, а также позволяет выявить пациентов с множественной АФА позитивностью.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, антифосфолипидные антитела, иммуноферментный анализ, лайн-блоттинг, новые методы

RANGING OF ANTIPHOSPOLIPID ANTIBODIES IN THE PATIENTS WITH THROMBOPHILIA AND RECURRENT MISCARRIAGE

Tkachenko O.Yu.^a, Lapin S.V.^a, Shmonin A.A.^{a,b}, Solovyova L.N.^b, Bondareva E.A.^a, Selkov S.A.^d, Chepanov S.V.^d, Totolian Areg A.^{a,e}, Roggenbuck Dirk^{f,g}

^a First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b City Hospital No. 26 of St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

^c V. Almazov North-West Federal Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

^d D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

^e St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

^f Brandenburg University of Technology, Cottbus-Senftenberg, Senftenberg, Germany

^g GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Germany

Abstract. Laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) is based on detection of antiphospholipid antibodies (aPLs). E.g., aPLs are directed against conformational epitopes of the so-called “co-factor” proteins: β2-glycoprotein 1 (β2-GP1), annexin V (An V) and prothrombin (Pt) that are formed during interaction with phospholipids – cardiolipin (CL), phosphatic acid (Pha), phosphatidylcholine (Pch), phosphatidylethanolamine (Pe), phosphatidylglycerol (Pg), phosphatidylinositol (Pi), phosphatidylserine (Ps). A routine methodology of detection based on ELISA testing is challenged by new tests when the antigen is absorbed on another kind of support like microbeads or membranes that can influence density of conformational epitopes for aPL's binding. The aim of our study was to compare the results of aPLs detection by ELISA and multi-line immunodot assay (MLD).

We collected blood serum samples from 45 patients with noncardioembolic ischemic strokes, 19 patients with recurrent deep vein thrombosis of lower limbs, 44 females with recurrent miscarriages, and 50 clinically healthy donors. To compare the results of aPL detection by ELISA and MLD kits, the test systems from different manufacturers were evaluated. We used an ELISA kits for detection of antibodies to CL IgG, aCL IgM, β2-GP1 produced by Euroimmun AG (Mr1) and Orgentec Diagnostica GmbH (Mr2) and MLD – for detection of antibodies to CL, β2-GP1, Pch, Pe, Pg, Pi, Ps, AnV and Pt (Medipan GmbH, Mr3).

When a cut-off titer was used as the main index, 30.5% of patients were aPLs-positive with ELISA method by Mr1 and 38%, with Mr2. By MLD aPLs were detected in 30% of patients. In the same cohort, medium and high aPLs titers (> 40 U/mL) were determined in 12% of patients using ELISA kits. Positive and highly positive aPLs titers were determined in 16% when using a new method by Mr3. Medium and high titer were detected only for antibodies to β2-GP1, CL, An V, Pha and Pch.

The use of ELISA approach for detection of aPLs in patients with thrombosis and obstetric pathology is associated with relatively high number of low-positive ELISA results. Due to higher sensitivity for medium and high aPLs titers, MLD testing may be used as a confirming method for APS diagnosis.

Keywords: antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, enzyme-linked immunosorbent assays, multi-line dot assay, new methods

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда. Соглашение РНФ № 16-15-00118.

Введение

Антифосфолипидные антитела (АФА) – семейство аутоантител, направленных против конформационных эпитопов плазменных белков, которые образуются в результате их взаимодействия с анионными фосфолипидами [2, 3, 12]. Это семейство включает антитела, направленные против фосфолипид-связывающих, или «кофакторных», белков, а именно β 2-гликопротеина 1 ($\alpha\beta$ 2GP1), аннексина V (aAn V) и протромбина (аПт). Также выделяют антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам – к кардиолипину (аКл), фосфатидилглицеролу (аФг), фосфатидилинозитолу (аФи), фосфатидилсерину (аФс), фосфатидиловой кислоте (аФк), и нейтрально заряженным фосфолипидам – фосфатидилэтаноламину (аФэ), фосфатидилхолину (аФх) [16, 25].

Выявление аКл и $\alpha\beta$ 2GP1 в качестве диагностического показателя включено в лабораторные критерии антифосфолипидного синдрома (АФС) [19], а детекция аКл – в лабораторные критерии системной красной волчанки (СКВ) SLICC 2012 [24]. Однако АФА обнаруживаются у пациентов с другими аутоиммунными, инфекционными или лимфопролиферативными заболеваниями, а также у здоровых доноров, не проявляя себя тромбозами или акушерской патологией [8, 9, 14, 27, 28]. По мнению ряда авторов [17], разные представители семейства АФА различаются по уровню патогенности, который также зависит от используемого лабораторного метода их определения.

Исторически АФА определяли с помощью метода радиоиммунного анализа [13], однако в настоящее время широко используется иммуноферментный анализ (ИФА). Отсутствие стандартизации ИФА тест-систем ведет к низкой сопоставимости результатов при использовании тест-систем разных производителей [7]. Использование ИФА приводит к большому количеству ложноположительных результатов и необходимости повторного обследования. В связи с этим актуальна оценка клинико-диагностических параметров новых твердофазных методов для детекции АФА.

Особого внимания заслуживает метод лайн-блоттинга (ЛБ) [11]. Преимуществом ЛБ при сравнении с ИФА является «мультиплексный» подход, позволяющий одновременно детекти-

ровать до 10 разновидностей АФА. Кроме того, уникальные особенности гидрофобной PVDF-мембраны позволяют достичь более высокой плотности антигена. **Целью данного исследования** является анализ диагностической ценности нового метода ЛБ в постановке серологического диагноза АФС.

Материалы и методы

Нами были собраны 44 образца сыворотки крови пациентов с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, 45 пациентов с акушерской патологией, а также 50 здоровых доноров. Все пациенты, включенные в исследование, были моложе 50 лет и не имели других аутоиммунных, лимфопролиферативных и хронических инфекционных заболеваний в анамнезе.

Согласно рекомендациям по детекции АФА для твердофазных тест-систем [6], исследования на АФА были проведены в течение 2–3 дней после взятия крови, пробы поставлены в дублях, проведен расчет внутрилабораторного референтного интервала (РИ) непараметрическим методом 99 перцентиль для каждой из ИФА тест-систем.

Для исследования клинической значимости результатов тестов методом ЛБ и сравнения с результатами ИФА были оценены тест-системы различных производителей. Мы использовали ИФА тест-системы фирмы Euroimmun (Германия), в дальнейшем именуемой Производитель 1 (ПР1), ИФА тест-системы фирмы Orgentec Diagnostica (Германия), Производитель 2 (ПР2), и тест-системы фирмы Medipan (Германия), основанные на методе ЛБ, Производитель 3 (ПР3), в соответствии с инструкцией. Получены результаты измерений ИФА тест-систем в оптических единицах и результаты ЛБ метода в денситометрических единицах, оцененных программой DotBlot-Analyzer как слабopоложительный (+), положительный (++) и восokopоложительный (+++) результаты. В собранных образцах сыворотки крови измерены $\alpha\beta$ 2GP1, аКл классов IgG и IgM, антитела методом ИФА, кроме того широкий спектр аутоантител, в том числе аКл, $\alpha\beta$ 2GP1, аФх, аФэм, аФг, аФэл, аФс, аФк, aAn V и аПр классов IgG и IgM исследовали методом ЛБ.

Для сравнительного анализа полученных результатов были использованы методы описательной статистики (вычисление средних значений, средних квадратических отклонений, медианы) и непараметрические (критерий Хи-квадрат Пирсона) методы статистической обработки.

Результаты

Референтные интервалы (РИ) ИФА тестов всех производителей наборов реактивов были получены путем обследования 50 сывороток здоровых доноров.

Для сравнения методов ИФА и ЛБ была оценена частота выявления АФА в каждой группе пациентов, с учетом верхней границы РИ (табл.1).

В общей когорте пациентов при использовании ИФА тест-систем ПР1 аКл и аβ2GP1 детектировались в 30,5 % образцах, ИФА методом на тест-системах ПР2 АФА были обнаружены у 38% пациентов. Методом ЛБ аКл и аβ2GP1 были выявлены у 30% пациентов.

Так как авторы международных критериев АФС указывают на клиническое значение только средних и высоких титров АФА, мы проанализи-

ТАБЛИЦА 1. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ АФА В ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ С НЕКАРДИОЭМБОЛИЧЕСКИМИ ИШЕМИЧЕСКИМИ ИНСУЛЬТАМИ, С РЕЦИДИВИРУЮЩИМИ ТРОМБОЗАМИ ГЛУБОКИХ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ И ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ, ИЗМЕРЕННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАМИ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

TABLE 1. THE FREQUENCY OF APA IN GROUPS OF PATIENTS WITH NONCARDIOEMBOLIC ISCHEMIC STROKES, RECURRENT DEEP VEIN THROMBOSIS OF THE LOWER EXTREMITIES AND RECCURENCE MISCARRIAGE, MEASURED BY KITS FROM DIFFERENT MANUFACTURERS

ПР MR	АФА aPLs	ВГРИ* ULRR*	Пациенты с острым инсультом Patients with noncardioembolic ischemic strokes (n = 44)	Пациентки с невынашиванием беременности Patients with reccurence miscarriage (n = 45)	Пациенты с тромбозом глубоких вен Patients with recurrent deep vein thrombosis of the lower extremities (n = 19)	Всего All (n = 108)
ПР1 MR1	аКл (IgG + IgM) aCl (IgG + IgM)	> 12 U/ml	1 (2,2%)	19 (42%)	3 (15,7%)	23 (21,2%)
		> 40 U/ml	1 (2,2%)	2 (4,5%)	1 (5,2%)	4 (3,7%)
	аβ2GP1 (IgGAM)	> 20 U/ml	3 (6,8%)	8 (18%)	1 (5,2%)	12 (11,1%)
		> 40 U/ml	1 (2,2%)	7 (15,5%)	1 (5,2%)	9 (8,2%)
ПР2 MR2	аКл (IgG + IgM) aCl (IgG + IgM)	> 10 U/ml	14 (31,8%)	11 (24%)	2 (10,5%)	27 (25%)
		> 40 U/ml	1 (2,2%)	2 (4,5%)	1 (5,2%)	4 (3,7%)
	аβ2GP1 (IgGAM)	> 10 U/ml	10 (22,7%)	16 (35%)	2 (10,5%)	28 (25,9%)
		> 40 U/ml	1 (2,2%)	11 (24%)	1 (5,2%)	8 (12%)
ПР3 MR3	аКл (IgG + IgM) aCl (IgG + IgM)	≥ +	2 (4,5%)	11 (24%)	6 (31,5%)	19 (17,5)
		≥ ++	2 (4,5%)	1 (2,2%)	3 (15,7%)	6 (5,5%)
	аβ2GP1 (IgGAM)	≥ +	10 (22,7%)	11 (24%)	5 (26,3%)	26 (24%)
		≥ ++	4 (9%)	7 (15,5%)	1 (5,2%)	12 (11,1%)

Примечание. ПР1 – Euroimmun (Германия), ПР2 – Orgentec Diagnostica (Германия), ПР3 – Medipan (Германия); ВГРИ – верхняя граница референтного интервала: рассчитана непараметрическим методом 99 перцентиль при детекции АФА в группе 50 здоровых доноров.

Note. MR1, Euroimmun (Germany); MR2, Orgentec Diagnostica (Germany); MR3, Medipan (Germany); ULRR is the upper limit of the reference range: calculated by the nonparametric 99 percentile method on APA detection in the group of 50 healthy donors.

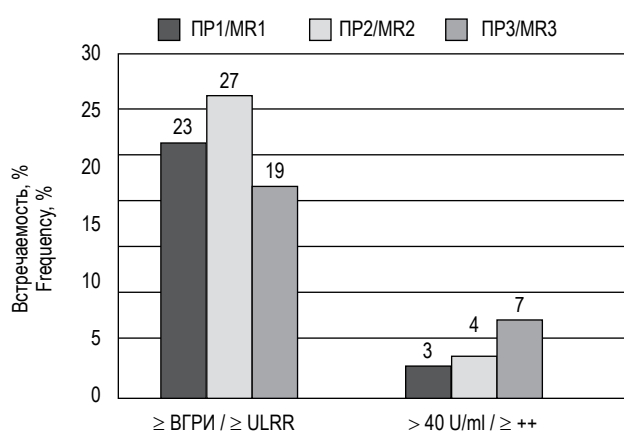


Рисунок 1. Встречаемость антикардиолипидных антител, измеренных тест-системами ПР1, ПР2, ПР3

Примечание. ВГРИ – верхняя граница референсного интервала, ПР1 – ИФА тест-системы фирмы Euroimmun (Германия), ПР2 – ИФА тест-системы фирмы Orgentec Diagnostika (Германия), ПР3 – метод ЛБ фирмы Medipan.

Figure 1. Frequency of anticardiolipin antibodies detected by kits of MR1, MR2, MR3

Note. ULRR, upper limit of reference range; MR1, ELISA kits by Euroimmun (Germany); MR2, ELISA kits by Orgentec Diagnostika; MR3, multi-line immunodot assay by Medipan.

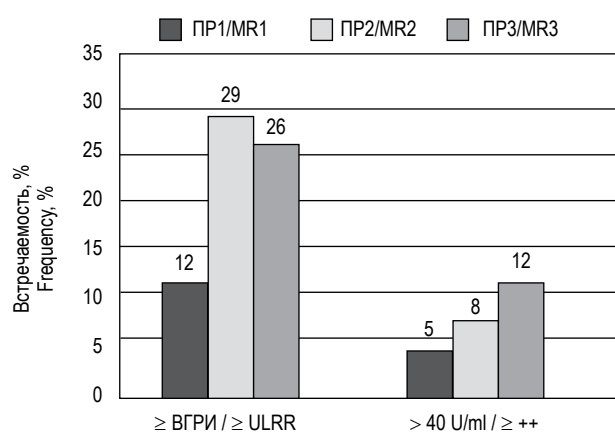


Рисунок 2. Встречаемость антител к β 2-гликопротеину 1, измеренных тест-системами ПР1, ПР2, ПР3

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Frequency of antibodies to β 2-glycoprotein 1 detected by kits of MR1, MR2, MR3

Note. As for Figure 1.

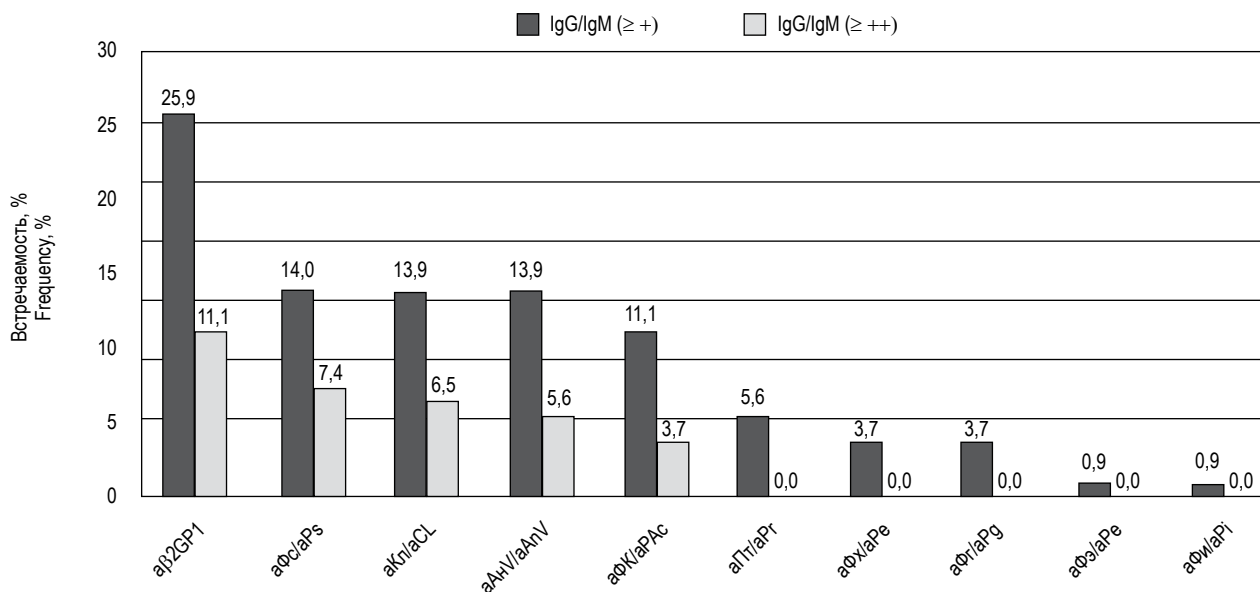


Рисунок 3. Спектр антифосфолипидных антител, измеренный методом лайн-блоттинга

Примечание. АФА – антифосфолипидные антитела, α β2GP1 – антитела к β 2-гликопротеину 1, аCL – антитела к кардиолипину, аAnV – антитела к аннексину V, аβT – антитела к протромбину, аβc – антитела к фосфатидилсерину, аβg – антитела к фосфатидилглицеролу, аβi – антитела к фосфатидилинозитолу, аβk – антитела к фосфатидиловой кислоте, аβe – антитела к фосфатидилэтаноламину, аβx – антитела к фосфатидилхолину, ПР1 – ИФА тест-системы фирмы Euroimmun (Германия), ПР2 – ИФА тест-системы фирмы Orgentec Diagnostika (Германия), ПР3 – метод ЛБ фирмы Medipan.

Figure 3. Spectrum of aPLs detected by multi-line immunodot assay

Note. aPLs, antiphospholipid antibodies; aβ2GP1, antibodies to β 2-Glycoprotein 1; aCL, antibodies to cardiolipins; aAnV, antibodies to annexin V; aβT, antibodies to prothrombin; aPs, antibodies to phosphatidylserine; aβg, antibodies to phosphatidylglycerol; aβi, antibodies to phosphatidylinositol; aβk, antibodies to phosphatidic acid; aβe, antibodies to phosphatidylethanolamine; aβh, antibodies to phosphatidylcholine; MR1, ELISA kits by Euroimmun (Germany); MR2, ELISA kits by Orgentec Diagnostika; MR3, multi-line immunodot assay by Medipan.

зировали встречаемость АФА, учитывая только средние и высокие титры для ИФА тест-систем, а также только положительные и высокоположительные результаты для ЛБ (рис. 2). Частота выявления средних и высоких титров АФА, измеренных методом ИФА на тест-системах ПР1 и ПР2, составила 12 и 11% соответственно, а методом ЛБ – 16,6%. Ввиду небольшого объема выборки положительных пациентов статистически достоверными являются данные, полученные в результате детекции аКл IgG методом ЛБ по сравнению с ИФА тест-системами ПР2 ($p = 0,03$). Таким образом, новый метод ЛБ позволяет добиться более высокой эффективности детекции при средних и высоких титрах АФА (рис. 1, рис. 2).

Так как одним из преимуществ ЛБ является возможность обнаружения 10 видов АФА, была оценена частота выявления как а β 2GPI1, аКл, так и других АФА – аФк, аФх, аФэм, аФг, аФэл, аФс, аАн V и аПр (рис. 3). В общей когорте пациентов чаще всего обнаруживались а β 2GPI1, аФс, аКл, аАн V, аФк.

Анализ спектра антифосфолипидных антител может играть значимую роль в клинической практике. Мы оценили встречаемость одной разновидности АФА, а также одновременного выявления двух, трех и более АФА в общей когорте пациентов. У 19% пациентов обнаружен только один представитель семейства АФА: в 4,6% случаях детектировался только а β 2GPI1, в 3,7% – аАн V и аФс, в 2,7% – аФк, а также аФг, аФэл. В 13% случаев одновременно детектировались два маркера, одним из которых в 6,4% случаев были а β 2GPI1, в 4,6% – аФк. Три и более АФА детектировались в 8% случаев, наиболее часто – комбинации а β 2GPI1, аАн V и аФс. Нами не было обнаружено ассоциаций между спектром антифосфолипидных антител и клинической картиной на примере данной когорты больных.

Обсуждение

Согласно международным критериям АФС, лабораторная диагностика играет решающую роль в постановке диагноза и дальнейшей тактике ведения больных. Однако несовершенство традиционных методов выявления АФА ведет к необходимости повторного обследования пациентов, что затрудняет своевременную постановку диагноза. Действующие критерии рекомендуют учитывать в диагностике АФС только высокие титры АФА, в то время как на практике низкие титры антител встречаются в разы чаще, но их клиническое значение установить обычно не удается.

Для диагностики АФС активно разрабатываются новые методы детекции аутоантел [1, 2, 4, 5, 6], такие как хемилюминесцентный анализ и мультиплексный метод лайн-блоттинга [15]. Данные методы твердофазного анализа характеризуются новыми подходами к сорбции антигена, обеспечивая большую плотность антигена на твердофазном носителе. Особенностью ЛБ является высокое сродство фосфолипидов к PVDF-мембране, что позволяет ориентировать гидрофильные участки молекул, обеспечивая их взаимодействие с белковыми кофакторами [11]. Результатом оптимизации характеристик твердой фазы становится увеличение аналитической чувствительности теста и расширение диапазона измеряемых показателей.

Для определения встречаемости АФА с помощью разных методов мы исследовали 3 группы пациентов с клиническими проявлениями АФС. В первую вошли 44 пациента с некардиоэмболическими ишемическими инсультами, во вторую – 19 пациентов с рецидивирующими тромбозами глубоких вен нижних конечностей, третья состояла из 45 пациентов с двумя и более выкидышами. В качестве группы сравнения использовались сыворотки крови 50 здоровых доноров. Мы провели сравнительный анализ встречаемости а β 2GPI1 и аКл между методом ЛБ и ИФА тест-системами ПР1 и ПР2, а также встречаемость спектра 10 разновидностей АФА в группах пациентов с клиническими проявлениями АФС, измеренных с помощью ЛБ.

Сходимость ИФА тест-систем ПР1, ПР2 и ПР3 для детекции а β 2GPI1 составила 75%, для детекции аКл – 84% соответственно. Большинство АФА при использовании ИФА тест-систем и метода ЛБ в нашем исследовании были обнаружены в низком титре. При оценке встречаемости АФА вне зависимости от титра мы не выявили преимуществ метода ЛБ по сравнению с методом ИФА. Но при анализе частоты средних и высоких титров новый метод показал достоверно более высокую чувствительность для детекции маркера АФС – аКл. Это позволяет избавиться от значительного числа низкоположительных неспецифических реакций АФА, которые могут быть обусловлены транзиторными непатогенными антителами. Значимость выявления АФА в средних и высоких титрах, их выраженная связь с клиническими проявлениями была описана рядом авторов и включена в международные критерии АФС [15, 16].

Важность оценки спектра АФА для определения риска клинических проявлений подчеркивается исследованиями Pengo и соавт. (2005). При

проспективном анализе когорты больных АФС было установлено, что одновременное выявление нескольких разновидностей АФА позволяет установить риск развития тромбоэмболических событий и патологии беременности [22, 23]. Пациенты, у которых одновременно детектируются аКл и аβ2GPI и ВАК в среднем или высоком титре, состоят в группе наиболее высокого риска развития клинических проявлений АФС. Основываясь на этом наблюдении, для диагностики АФС и стратификации риска развития осложнений Otomo и соавт. [21] разработали диагностический комплекс, включающий 5 коагуляционных тестов для детекции ВАК и 6 ИФА тестов (аКл класса IgG/IgM, аβ2GPI класса IgG/IgM, фосфатидилсерин-зависимые аПр класса IgG/IgM) [21]. Позже была создана шкала для стратификации риска АФС GAPSS [26], включающая, помимо лабораторных маркеров, демографические и клинические показатели. В связи с этим важным преимуществом метода ЛБ является единовременная детекция аКл,

аβ2GPI, аФх, аФэм, аФг, аФэл, аФс, аФк, аАн V и аПр классов IgG и IgM. Мы оценили встречаемость одного, двух, трех и более АФА в общей когорте пациентов, обследованных с помощью метода ЛБ. В нашем исследовании у 19% пациентов обнаружен только один маркер АФС, два и более маркера – в 21% случаев. Таким образом, можно выделить значительное количество случаев, при котором АФС подтверждается несколькими серологическими биомаркерами. В проведенной работе нам не удалось выявить взаимосвязи между клинической картиной и встречаемостью одного, двух, трех и более АФА у обследованных нами пациентов, что может быть обусловлено небольшим размером группы и коротким временем наблюдения.

Таким образом, метод мультиплексного лайн-блоттинга показывает более высокую чувствительность при детекции средних и высоких титров АФА, а также позволяет выявить пациентов с множественной серологической позитивностью.

Список литературы / References

1. Лапин С.В., Мазинг А.В., Булгакова Т.В., Маслянский А.Л., Иливанова Е.П., Козаренко А.А., Тотолян А.А. Аналитические и диагностические характеристики отечественной тест-системы для выявления антител к циклическому цитруллиновому пептиду // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. № 12. С. 12-17. [Lapin S.V., Mazing A.V., Bulgakova T.V., Maslyansky A.L., Ilivanova E.P., Kozarenko A.A., Totolian A.A. Analytical and diagnostic characteristics of the domestic test system for detection of antibodies to cyclic citrulline peptide. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, no. 12, pp. 12-17. (In Russ.)]
2. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб.: Человек, 2006. 128 с. [Lapin S.V., Totolian A.A. Immunological laboratory diagnostics of autoimmune diseases]. St. Petersburg: Chelovek, 2006. 128 p.
3. Лапин С.В., Тотолян А.А. Иммунологическая лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний. СПб.: Человек, 2010. 272 с. [Lapin S.V., Totolian A.A. Immunological laboratory diagnostics of autoimmune diseases]. St. Petersburg: Chelovek, 2006. 272 p.
4. Созина А.В., Иливанова Е.П., Шульман А.М., Шульман М.А., Шемеровская Т.Г., Лапин С.В., Тотолян А.А. Клинико-диагностическое значение выявления антиядерного фактора, антител к двуспиральной ДНК и кардиолипину у больных системной красной волчанкой // Клиническая лабораторная диагностика, 2008. № 5. С. 44-47. [Sozina A.V., Ilivanova E.P., Shulman A.M., Shulman M.A., Shemerovskaya T.G., Lapin S.V., Totolian A.A. Clinical and diagnostic significance of detection of the antinuclear factor, antibodies to double-stranded DNA and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2008, no. 5, pp. 44-47. (In Russ.)]
5. Созина А.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Лапин С.В. Сочетанная встречаемость аутоантител у больных с диффузными болезнями соединительной ткани // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 1. С. 69-76. [Sozina A.V., Neustroeva Yu.A., Tikhomirova T.A., Lapin S.V. Combined prevalence of autoantibodies in patients with diffuse connective tissue diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 1, pp. 69-76. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2007-1-69-76.
6. Роггенбук Д., Ширак П., Сак У., Лапин С.В., Мазинг А.В., Тотолян Арег А. Новые подходы к стандартизации выявления аутоантител в лабораторной диагностике аутоиммунных ревматических заболеваний // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 3. С. 221-226. [Roggenbuck D., Schierac P., Sack U., Lapin S.V., Mazing A.V., Totolian A.A. Novel methods for autoantibody detection in laboratory diagnostics of autoimmune

rheumatic diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 3, pp. 221-226. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-3-221-226.

7. Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А., Сельков С.А., Чепанов С.В., Тотолян А.А. Сравнительный анализ иммунологических методов детекции антифосфолипидных антител // Клиническая лабораторная диагностика, 2017. Т. 62, № 1. С. 40-44. [Tkachenko O.Yu., Lapin S.V., Mazing A.V., Lazareva N.M., Shmonin A.A., Solovyova L.N., Bondareva E.A., Selkov S.A., Chepanov S.V., Totolian A.A. The comparative analysis of immunologic techniques of detection of antiphospholipid Antibodies. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, Vol. 62, no. 1, pp. 40-44. (In Russ.)]

8. Ambrosino P, Lupoli R, Spadarella G, Tarantino P, di Minno A, Tarantino L, di Minno M.N. Autoimmune liver diseases and antiphospholipid antibodies positivity: A meta-analysis of literature studies. *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 2015, Vol. 24, no. 1, pp. 25-34.

9. Dalekos G.N., Zachou K., Liaskos C. The antiphospholipid syndrome and infection. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2001, Vol. 3, no. 4, pp. 277-285.

10. Devreese K.M., Pierangeli S.S., de Laat B., Tripodi A., Atsumi T., Ortel T.L.; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the IS TH. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 5, pp. 792-795.

11. Egerer K., Roggenbuck D., Büttner T., Lehmann B., Kohn A., von Landenberg P., Hiemann R., Feist E., Burmester G.R., Dörner T. Single-step autoantibody profiling in antiphospholipid syndrome using a multi-line dot assay. *Arthritis Res. Ther.*, 2011, Vol. 13, no. 4, R118. doi: 10.1186/ar3421.

12. Galli M., Comfurius P., Maassen C., Hemker H.C., de Baets M.H., van Breda-Vriesman P.J., Barbui T., Zwaal R.F., Bevers E.M. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*, 1990, Vol. 335, no. 8705, pp. 1544-1547.

13. Harris E.N., Gharavi A.E., Boey M.L., Patel B.M., Mackworth-Young C.G., Loizou S., Hughes G.R. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 1983, Vol. 322, no. 8361, pp. 1211-1214.

14. Jeleniewicz R., Majdan M., Targońska-Stepniak B., Dryglewska M. Prevalence of antiphospholipid antibodies in rheumatoid arthritis patients and relationship with disease activity. *Pol. Arch. Med. Wewnętrznej*, 2012, Vol. 122, no. 10, pp. 480-486.

15. Krilis S.A., Giannakopoulos B. Laboratory methods to detect antiphospholipid antibodies. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2014, Vol. 2014, no. 1, pp. 321-328.

16. Meroni P., Chighizola C., Rovelli F., Gerosa M. Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthritis Res. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 2, p. 209.

17. Meroni P.L., Borghi M.O., Raschi E., Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2011, Vol. 7, no. 6, pp. 330-339.

18. Misasi R., Capozzi A., Longo A., Recalchi S., Lococo E., Alessandri C., Conti F., Valesini G., Sorice M. New antigenic targets and methodological approaches for refining laboratory diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 858542. doi:10.1155/2015/858542.

19. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R., Derksen R.H., de Groot P.G., Koike T., Meroni P.L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyiannopoulos P.G., Krilis S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, no. 2, pp. 295-306.

20. Neville C., Rauch J., Kassis J., Chang E.R., Joseph L., le Comte M., Fortin P.R. Thromboembolic risk in patients with high titre anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb. Haemost.*, 2003, Vol. 90, no. 1, pp. 108-115.

21. Otomo K., Atsumi T., Amengual O., Fujieda Y., Kato M., Oku K., Horita T., Yasuda S., Koike T. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum.*, 2012, Vol. 64, no. 2, pp. 504-512.

22. Pengo V., Biasiolo A., Pegoraro C., Cucchini U., Noventa F., Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.*, 2005, Vol. 93, no. 6, pp. 1147-1152.

23. Pengo V., Ruffatti A., Legnani C., Testa S., Fierro T., Marongiu F., de Micheli V., Gesele P., Tonello M., Ghirarduzzi A., Bison E., Denas G., Banzato A., Padayattil Jose S., Iliceto S. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 17, pp. 4714-4718.

24. Petri M., Orbai A.M., Alarcón G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R., Bruce I.N., Isenberg D., Wallace D.J., Nived O., Sturfelt G., Ramsey-Goldman R., Bae S.C., Hanly J.G., Sánchez-Guerrero J., Clarke A., Aranow C., Manzi S., Urowitz M., Gladman D., Kalunian K., Costner M., Werth V.P., Zoma A., Bernatsky S., Ruiz-Irastorza G.,

Khamashta M.A., Jacobsen S., Buyon J.P., Maddison P., Dooley M.A., van Vollenhoven R.F., Ginzler E., Stoll T., Peschken C., Jorizzo J.L., Callen J.P., Lim S.S., Fessler B.J., Inanc M., Kamen D.L., Rahman A., Steinsson K., Franks A.G. Jr, Sigler L., Hameed S., Fang H., Pham N., Brey R., Weisman M.H., McGwin G. Jr, Magder L.S. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2012, Vol. 64, no. 8, pp. 2677-2686.

25. Ruiz-Irastorza G., Crowther M., Branch W., Khamashta M.A. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*, 2010, Vol. 376, no. 9751, pp. 1498-1509.

26. Sciascia S., Sanna G., Murru V., Roccatello D., Khamashta M.A., Bertolaccini M.L. The global antiphospholipid syndrome score in primary APS. *Rheumatol. (United Kingdom)*, 2014, Vol. 54, no. 1, pp. 134-138.

27. Touré A.O., Ly F., Sall A., Diatta A., Gadji M., Seck M., Faye B., Dieye T., Diop S. Antiphospholipid antibodies and systemic scleroderma. *Turkish J. Haematol.*, 2013, Vol. 30, no. 1, pp. 32-36.

28. Zhou Y., Ying Z., Li R., Zhu J., Li Z. Clinical and immunological relevance of antiphospholipid antibodies in patients with lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2011, Vol. 91, no. 37, pp. 2607-2610.

Авторы:

Ткаченко О.Ю. — врач клинической лабораторной диагностики, лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний, НМЦ по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лавин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине Министерства здравоохранения РФ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Шмонин А.А. — врач-невролог СПб ГБУЗ «Городская больница № 26»; доцент кафедры физических методов лечения и спортивной медицины ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник института экспериментальной медицины ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова

Соловьёва Л.Н. — врач-невролог СПб ГБУЗ «Городская больница № 26», Санкт-Петербург, Россия

Бондарева Е.А. — аспирант кафедры неврологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Tkachenko O. Yu., Clinical Laboratory Diagnostician, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lavin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Shmonin A.A., Neurologist, City Hospital No. 26 of St. Petersburg; Associate Professor, Department of Physical Methods of Treatment and Sports Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, V. Almazov North-West Federal Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Solovyova L.N., Neurologist, City Hospital No. 26 of St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

Bondareva E.A., Postgraduate student, Neurology Department, Center for Molecular Medicine, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Чепанов С.В. — врач клинической лабораторной диагностики, лаборатория клинической иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Роггенбук Дирк — д.м.н., профессор, Бранденбургский технический университет, Коттбус-Зенфтенберг, Зенфтенберг; директор, GA Generic Assays GmbH, Далевиц, Германия

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honoured Worker of Science of the Russian Federation, Head, Department of Immunology, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Chepanov S.V., Clinical Laboratory Diagnostician, Laboratory of Clinical Immunology, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Roggenbuck Dirk, PhD, MD (Medicine), Professor, Brandenburg University of Technology, Cottbus-Senfthenberg, Senfthenberg; director, GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Germany

Поступила 30.10.2017

Отправлена на доработку 02.11.2017

Принята к печати 17.01.2018

Received 30.10.2017

Revision received 02.11.2017

Accepted 17.01.2018