

# ОБЗОРЫ

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА

Е.Н.Александрова, А.А.Новиков, Д.С. Новикова  
ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

Антитела к фосфолипидам (аФЛ) – семейство аутоантител, распознающих антигенные детерминанты анионных и нейтральных фосфолипидов (ФЛ) и комплексные эпитопы, образующиеся в процессе взаимодействия ФЛ и фосфолипидсвязывающих белков плазмы крови [1]. Гиперпродукция аФЛ ассоциируется с развитием антифосфолипидного синдрома (АФС), к клиническим проявлениям которого относятся рецидивирующие венозные и артериальные тромбозы, привычное невынашивание беременности и тромбоцитопения [2,3,4]. Выделяют первичный АФС (ПАФС) и вторичный АФС (ВАФС), связанный с системной красной волчанкой (СКВ) и другими аутоиммунными заболеваниями, а также с инфекциями, злокачественными новообразованиями и приемом лекарственных препаратов [3]. Основными методами лабораторной диагностики АФС являются обнаружение волчаночного антикоагулянта (ВА) с помощью фосфолипидзависимых коагуляционных тестов и определение  $\beta_2$ -гликопротеин -I ( $\beta_2$ -ГПИ)-зависимых антител к кардиолипину (аКЛ) класса IgG и IgM стандартным иммуноферментным методом (ИФМ) [5-12]. Вместе с тем, стандартные методы исследования ВА и аКЛ не позволяют выявить весь спектр аФЛ, ассоциирующихся с различными клиническими проявлениями АФС. При наличии у пациентов характерных клинических признаков АФС и низкоположительных или отрицательных результатов тестирования ВА и аКЛ целесообразно использовать дополнительные лабораторные методы для постановки диагноза АФС, в первую очередь, определение антител к  $\beta_2$ -ГПИ (а $\beta_2$ -ГПИ), реже - IgA аКЛ и антител к другим ФЛ (фосфатидилинозитолу - ФИ, фосфатидилсерину - ФС, фосфатидилэтаноламину - ФЭ, фосфатидилхолину - ФХ, смеси ФЛ) и фосфолипидсвязывающим белкам (протромбину, аннексину V и др.) [13]. Методы идентификации ВА представлены в обзоре З.С.Баркагана и соавт. [14]. Целью настоящего исследования являлось изучение диагностической точности и методических аспектов иммуноферментного анализа аФЛ.

Результаты количественного определения аКЛ с помощью ИФМ не соответствует закону нормального распределения, что затрудняет использование параметрических тестов при интерпретации полученных данных. Для улучшения воспроизводимости и межлабораторной сопоставимости результатов рекомендуется оценка концентрации IgG- и IgM-аКЛ в международных единицах GPL и MPL с использованием стандартных сывороток, предоставляемых лабораторией по стандартизации аФЛ (Louisville). Имеются также стандарты для количественного определения IgA-аКЛ [13]. Одна единица GPL соответствует фосфолипидсвязывающей активности 1 мкг/мл IgG-аКЛ, а одна единица MPL- 1 мкг/мл IgM-аКЛ, очищенных методом афинной хроматографии. Пересчет показателей ОП исследуемых сывороток в единицы концентрации GPL и MPL осуществляется с помощью построения калибровочной кривой зависимости логарифма ОП стандарта от логарифма концентрации аКЛ, представленной уравнением линейной регрессии [15]. По данным литературы верхняя граница нормальной концентрации IgG-аКЛ в сыворотке крови составляет от 7,0 до 23,0 GPL, IgM-аКЛ - от 6,0 до 15,0 MPL [16]. Со-

гласно международным рекомендациям при интерпретации результатов следует использовать не абсолютные значения уровня аКЛ в GPL/MPL, а уровень позитивности [15] (табл.1).

Таблица 1

### ГРАНИЦЫ СТЕПЕНЕЙ ПОЗИТИВНОСТИ ПРИ ОЦЕНКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ аКЛ

| Степень позитивности | Класс аКЛ     |               |
|----------------------|---------------|---------------|
|                      | IgG аКЛ (GPL) | IgM аКЛ (MPL) |
| Высокопозитивные     | > 65          | > 45          |
| Умереннопозитивные   | 30-65         | 35-45         |
| Низкопозитивные      | 23-30         | 26-35         |
| Негативные           | < 23          | < 26          |

С позиций доказательной медицины оптимальный подход к анализу диагностической точности ИФМ определения аФЛ связан с использованием характеристических кривых (ROC-curve - receiver-operator characteristic curve) [17, 18, 19]. При построении графика ROC-кривых по оси абсцисс откладывают частоту ложноположительных результатов (1-специфичность) (%), а по оси ординат - частоту истинноположительных результатов (чувствительность) (%). Значения чувствительности и соответствующие им доли ложноположительных результатов определения аФЛ, рассчитанные по всему диапазону точек разделения между нормой и патологией, наносятся на плоскость и соединяются плавной линией. Точка, наиболее близкая к перегибу графика, рассматривается как оптимальное соотношение чувствительности и специфичности. Выбор точки разделения делается с учетом соотношения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Универсальным методом анализа ROC-кривых является оценка площади под кривой (area under curve - AUC), изменяющейся от 0,5 (отсутствие диагностической эффективности теста) до 1,0 (максимальная эффективность теста).

Нами изучена диагностическая точность ИФМ определения аКЛ и а $\beta_2$ -ГПИ у 170 больных, включая 41 больного с ПАФС, 50 больных с ВАФС (СКВ с АФС) и 79 больных с СКВ при уровнях позитивности, установленных по верхней границе нормы у 100 здоровых лиц [20], и с использованием ROC-кривых. Анализ значений аФЛ относительно верхней границы нормы показал, что IgG а $\beta_2$ -ГПИ в целом более чувствительный и специфичный маркер АФС и тромбозов, чем IgG и IgM аКЛ. По результатам ROC-анализа при использовании оптимальных "cut off" значений аФЛ, ассоциирующихся с диагнозом АФС, IgG а $\beta_2$ -ГПИ являлся более специфичным, но менее чувствительным маркером АФС по сравнению с IgG и IgM аКЛ (табл. 2). Относительно тромбозов IgG аКЛ и IgG а $\beta_2$ -ГПИ проявляли сходную чувствительность (53-54%) и специфичность (84-85%), значительно превосходя по уровню специфичности IgM аКЛ (64,6%). При этом оптимальный уровень позитивности IgG аКЛ, ассоциирующийся с развитием тромботических осложнений (33,2 GPL), оказался выше, чем



Таблица 2

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТОЧНОСТЬ ИФМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ аФЛ ОТНОСИТЕЛЬНО АФС

| Тип аФЛ                                | IgG аКЛ     | IgM аКЛ     | IgG аβ <sub>2</sub> -ГПІ |
|----------------------------------------|-------------|-------------|--------------------------|
| <b>АНАЛИЗ ПО ВЕРХНЕЙ ГРАНИЦЕ НОРМЫ</b> |             |             |                          |
| "Cut-off"                              | 23,0 GPL    | 26,0 MPL    | 9,3 ед/мл                |
| Чувствительность, %                    | 57,1        | 69,1        | 60,0                     |
| Специфичность, %                       | 73,5        | 80,9        | 83,8                     |
| <b>АНАЛИЗ ПО ROC- КРИВЫМ</b>           |             |             |                          |
| "Cut-off"                              | 18,1 GPL    | 7,8 MPL     | 11,2 ед/мл               |
| Чувствительность, %                    | 62,4        | 67,8        | 56,2                     |
| Специфичность, %                       | 71,4        | 72,3        | 85,9                     |
| AUC                                    | 0,763;      | 0,704;      | 0,821;                   |
| (ДИ 95%)                               | 0,691-0,835 | 0,620-0,789 | 0,758-0,884              |

Таблица 3

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТОЧНОСТЬ ИФМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ аФЛ ОТНОСИТЕЛЬНО ТРОМБОЗОВ

| Тип аФЛ                                | IgG аКЛ      | IgM аКЛ     | IgG аβ <sub>2</sub> -ГПІ |
|----------------------------------------|--------------|-------------|--------------------------|
| <b>АНАЛИЗ ПО ВЕРХНЕЙ ГРАНИЦЕ НОРМЫ</b> |              |             |                          |
| "Cut-off"                              | 23,0 GPL     | 26,0 MPL    | 9,3 ед/мл                |
| Чувствительность, %                    | 54,5         | 58,6        | 58,1                     |
| Специфичность, %                       | 72,7         | 77,0        | 84,6                     |
| OR                                     | 4,21         | 1,49        | 4,80                     |
| (ДИ 95%)                               | (2,20-8,10)  | (0,37-2,86) | (1,48-5,43)              |
| <b>АНАЛИЗ ПО ROC- КРИВЫМ</b>           |              |             |                          |
| "Cut-off"                              | 33,2 GPL     | 8,0 MPL     | 13,4 ед/мл               |
| Чувствительность, %                    | 53,3         | 61,0        | 53,8                     |
| Специфичность, %                       | 84,8         | 64,6        | 83,8                     |
| AUC                                    | 0,729;       | 0,617;      | 0,779;                   |
| (ДИ 95%)                               | 0,650-0,808  | 0,527-0,708 | 0,708-0,851              |
| OR                                     | 6,42         | 2,83        | 5,60                     |
| (ДИ 95%)                               | (3,10-13,35) | (1,48-5,43) | (2,69-11,61)             |

OR (odds ratio) – отношение шансов.

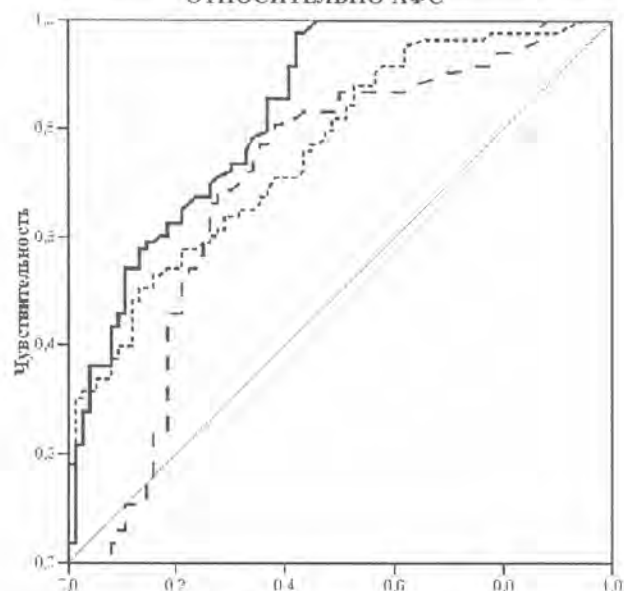
для диагностики АФС (18,1 GPL) (табл.3). AUC у IgG аβ<sub>2</sub>-ГПІ при АФС и тромбозах была больше, чем у IgG и IgM аКЛ (табл. 2 и 3; рис. 1 и 2). Таким образом, анализ ROC-кривых свидетельствует о большей диагностической эффективности определения аβ<sub>2</sub>-ГПІ при АФС по сравнению с аКЛ. Прогностическое значение положительных результатов тестирования аФЛ относительно тромбозов (OR) было выше при "cut off," вычисленных с помощью ROC-кривых (табл.2). Положительные результаты тестирования IgG аКЛ и IgG аβ<sub>2</sub>-ГПІ, в отличие от IgM аКЛ, ассоциировались с высоким риском развития тромботических осложнений, при этом наиболее эффективным тестом для прогнозирования тромбозов являлось определение IgG аКЛ.

Результаты нашего исследования хорошо согласуются с материалами других авторов. По данным литературы чувствительность ИФМ определения аКЛ для диагностики АФС составляет 30–87%, специфичность – 54–86%. Тестирование аβ<sub>2</sub>-ГПІ в сыворотках больных АФС имеет большую специфичность (88–96%) и меньшую чувствительность (32–62%) по сравнению с аКЛ [21–26]. Наиболее высокие показатели чувствительности (83%) и специфичности (99%) аβ<sub>2</sub>-ГПІ получены J.Guerin и соавт. [21]. J.-C.Wasmuth и соавт. [18] применяли анализ ROC-кривых у 144 больных с подозрением на АФС при изучении диагностической точности 23 коммерческих тест-систем для определения аКЛ и аβ<sub>2</sub>-ГПІ. Диагностическая точность большинства методов определения аКЛ и аβ<sub>2</sub>-ГПІ изотипов IgG и IgM возрастала по мере увеличения числа клинических критериев, использовавшихся для постановки диагноза АФС. В том случае, когда диагноз АФС базировался на двух или трех типичных клинических признаках, чувствительность тестирования

аКЛ и аβ<sub>2</sub>-ГПІ составляла не более 67%, AUC – от 0,60 до 0,72. Наиболее высокая диагностическая точность методов определения аКЛ и аβ<sub>2</sub>-ГПІ наблюдалась при наличии четырех и более клинических критериев АФС (чувствительность до 100%, AUC более 0,8), что связано с уменьшением числа ложноотрицательных результатов. По данным J.M. Musial и соавт. [19], анализ характеристических кривых позволяет установить оптимальные "cut-off" значения аФЛ, связанные с основными клиническими симптомами АФС. При исследовании клинического значения аФЛ у 204 больных АФС положительные результаты тестирования ВА ассоциировались с высоким риском развития тромбозов (OR: 3,04; 1,5–6,2; доверительный интервал-ДИ 95%) и повторными потерями плода (OR: 8,7; 2,8–26,7; ДИ- 95%). Анализ ROC кривых показал, что для прогнозирования тромбозов наиболее точным тестом является исследование IgG аКЛ ("cut-off">17,2 GPL; OR: 3,69; 1,8–7,4; ДИ- 95%); повторных потерь плода- IgG аФИ. ("cut-off">22,1 ед.; OR: 6,21; 2,1–18,5; ДИ- 95%), IgG аКЛ и IgG аβ<sub>2</sub>-ГПІ; тромбоцитопении – IgM аФС ("cut-off">6,7 ед.; OR: 1,9; 1,04–3,4; ДИ-95%). При этом у 6,6% больных с клиническими признаками АФС и негативными результатами тестирования на ВА и аКЛ обнаружены другие субтипы аФЛ, главным образом IgM аФИ. Популяционные исследования предсказательной ценности положительных результатов иммуноферментного анализа аКЛ и аβ<sub>2</sub>-ГПІ для диагностики АФС показали, что аКЛ в целом имеют низкую чувствительность и специфичность, а аβ<sub>2</sub>-ГПІ – низкую чувствительность, но высокую специфичность относительно вероятности возникновения тромбозов при АФС [12].

Различия результатов изучения чувствительности и спе-

Рисунок 1  
РОС-КРИВЫЕ ДЛЯ ИФМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ аФЛ  
ОТНОСИТЕЛЬНО АФС



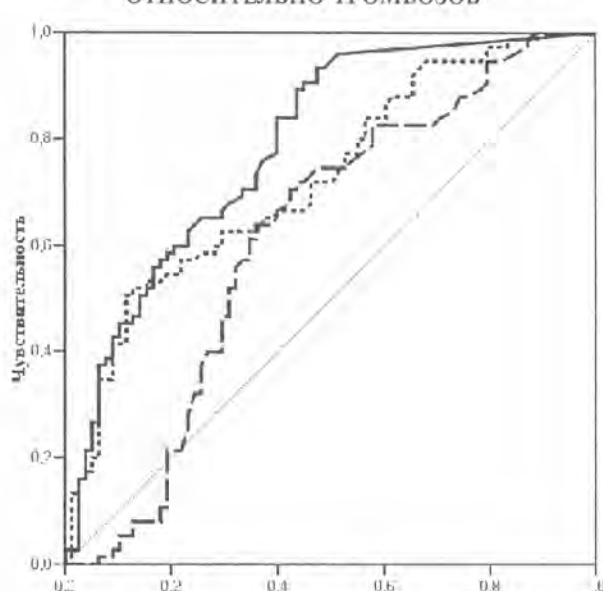
..... IgG аКЛ  
----- IgM аКЛ  
———— IgG  $\beta_2$ -ГПИ

По оси ординат - чувствительность  
По оси абсцисс - 1-специфичность

цифичности аФЛ при АФС могут зависеть от выбранного уровня позитивности, подбора больных АФС и методических особенностей определения аФЛ.

В настоящее время предложено большое количество "home made" методик и коммерческих тест-систем для иммуноферментного анализа аКЛ. Несмотря на стандартизацию основных методических аспектов ИФМ определения аКЛ, полученные результаты нередко носят противоречивый характер. Так, по данным многоцентрового исследования частота обнаружения аКЛ в популяции при использовании 9 различных коммерческих тест-систем варьировала от 31% до 60% для IgG аКЛ и от 6% до 50% для IgM аКЛ; при этом наклон графика линейной регрессионной зависимости результатов измерения концентрации аКЛ в единицах GPL и MPL с помощью стандартов, предоставленных лабораторией по стандартизации аФЛ, и калибраторов тест-систем составлял, 0,159-0,93 для IgG аКЛ и 0,236-0,836 для IgM аКЛ [27]. Имеются также данные о более высокой вариабельности операционных характеристик шести коммерческих и одной "in-house" тест-систем для определения IgG- и IgM аКЛ по сравнению с пятью коммерческими тест-системами на IgG- и IgM  $\beta_2$ -ГПИ [28]. Хорошая воспроизводимость результатов в значительной степени зависит от четкого выполнения ряда рекомендаций, разработанных для иммуноферментного анализа аКЛ. Перед внесением в лунки полистироловых микропланов КЛ растворяют в этаноле либо в смеси этанола и хлороформа. Для иммобилизации КЛ на твердой фазе лунки планшета высушивают под вакуумом, либо в течение 18 часов при 4°C. Предотвращение липидного окисления с помощью азота на данном этапе является спорным вопросом, так как окисление КЛ в целом способствует увеличению его отрицательного заряда и связывающей активности. Ранее интенсивно изучалась возможность использования в тест-системах для иммуноферментного анализа аФЛ помимо КЛ других ФЛ, включая ФИ, ФС, ФЭ, ФХ и различные смеси ФЛ [29]. Полагают, что обнаружение различных субтипов аФЛ при

Рисунок 2  
РОС-КРИВЫЕ ДЛЯ ИФМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ аФЛ  
ОТНОСИТЕЛЬНО ТРОМБОЗОВ



..... IgG аКЛ  
----- IgM аКЛ  
———— IgG  $\beta_2$ -ГПИ

По оси ординат - чувствительность  
По оси абсцисс - 1-специфичность

АФС в основном определяется степенью их связывания с  $\beta_2$ -ГПИ и не зависит от специфического взаимодействия с отдельными ФЛ, за исключением реагирования антител с ФЭ [30]. E.N.Harris и S.S.Pierangeli [13] предложили наряду с исследованием  $\beta_2$ -ГПИ определять антитела к смеси ФЛ с помощью разработанной ими тест-системы "APhL ELISA kit" для диагностики "сомнительного" АФС у больных с отрицательными результатами тестирования аКЛ и ВА или с низкими титрами аКЛ. Однако данный метод не нашел подтверждения в работах H.M.Day и соавт. [26]. Блокирование участков неспецифического связывания обычно проводится с помощью 10% раствора фетальной телячьей или бычьей сыворотки в фосфатно-солевом буфере в качестве источника кофактора  $\beta_2$ -ГПИ, который связывается с иммобилизованным на твердой фазе КЛ и частично - со свободными участками на поверхности микропланов. Следует подчеркнуть, что любые методические различия, касающиеся концентрации бычьей сыворотки, разведения и объема проб в лунке, свойств КЛ (окисление, степень очистки), могут приводить к изменению связывающей активности  $\beta_2$ -ГПИ и результатов определения аКЛ. При измерении соотношения  $\beta_2$ -ГПИ - зависимых и  $\beta_2$ -ГПИ - независимых субфракций аКЛ до и после внесения в тест-систему экзогенного  $\beta_2$ -ГПИ используется буферный раствор с добавлением бычьего сывороточного альбумина или желатина [31]. Тестируемые сыворотки разводятся блокирующим буферным раствором, содержащим не только  $\beta_2$ -ГПИ, но и другие белки сыворотки быка. Кроме того, в образцах исследуемых сывороток может присутствовать и собственный  $\beta_2$ -ГПИ человека. В связи с этим при определении аКЛ в сыворотке крови рекомендуется вычитать ОП лунки без КЛ из ОП лунки с КЛ. В сыворотках больных могут выявляться не только аКЛ и  $\beta_2$ -ГПИ, но и низкоаффинные антитела к протромбину, белкам С и S [32] и кининогену [33], что в целом снижает чувствительность ИФМ определения



аКЛ. Для определения IgG-, IgM- и IgA-аКЛ используют изотипспецифические антитела к иммуноглобулинам человека, меченные пероксидазой. Показано, что в отличие от IgG- и IgM-аКЛ уровень IgA-аКЛ слабо коррелирует с клиническими проявлениями АФС [34]. По данным литературы высокая частота обнаружения IgM-аКЛ в низких титрах может быть связана с увеличением концентрации поликлонального IgM [35], а также наличием IgM-ревматоидного фактора [36] в тестируемых сыворотках. При определении аКЛ с помощью ИФМ не рекомендуется предварительное прогревание сывороток, приводящее к конвертации аКЛ отрицательных образцов в аКЛ-положительные, в том числе и у здоровых лиц [37, 38]. Несмотря на предположение, согласно которому использование в тест-системе для иммуноферментного анализа аКЛ 0,05% буферного раствора детергента Tween 20 позволяет отличить  $\beta_2$ -ГПИ - зависимые от  $\beta_2$ -ГПИ - независимых аКЛ [39], имеются данные, что Tween 20 может полностью блокировать связывание b2-ГПИ с КЛ [40], а также удалять КЛ со дна лунок при отмывках [41].

Одной из наиболее сложных проблем лабораторной диагностики АФС является недостаточно высокая специфичность аКЛ, что в ряде случаев может приводить к ложноположительной диагностике АФС и неоправданному назначению антикоагулянтов. Улучшение диагностики АФС связано с необходимостью определения  $\alpha\beta_2$ -ГПИ, обладающих большей специфичностью в отношении диагноза АФС. При внесении очищенных антител больных в тест-систему для иммуноферментного анализа аКЛ без добавления фетальной сыворотки было показано, что  $\beta_2$ -ГПИ является кофактором, обязательным для специфического связывания "аутоиммунных" аКЛ, ассоциирующихся с АФС, но подавляющим связывающую активность "инфекционных" аКЛ [31,42]. Содержание  $\beta_2$ -ГПИ в иммуноферментном тесте, соответствующее оптимальному связыванию аКЛ, составляет 8 мкг/мл и более; при концентрации  $\beta_2$ -ГПИ менее 1 мкг/мл связывающая активность аКЛ падает до нуля [8]. В сыворотке человека  $\beta_2$ -ГПИ присутствует в концентрации около 200 мкг/мл, в то время как в бычьей сыворотке его уровень в 2-3 раза выше [43]. Большинство, но не все субтипы аКЛ человека связываются с бычьим  $\beta_2$ -ГПИ [44,45]. Количеству аКЛ в тестируемой сыворотке, разведенной 1:100 в 10% растворе фетальной сыворотки, соответствует адекватный для оптимального связывания уровень  $\beta_2$ -ГПИ; использование блокирующего и разводящего раствора без добавления фетальной сыворотки, содержащей экзогенный  $\beta_2$ -ГПИ, приводит к значительному снижению связывающей активности аКЛ [43]. Прямое тестирование  $\beta_2$ -ГПИ с помощью ИФМ относительно иммобилизованного на твердой фазе аффинноочищенного  $\beta_2$ -ГПИ пока недостаточно стандартизировано на международном уровне. При этом для иммуноферментного анализа  $\beta_2$ -ГПИ в основном применяются "высоко связывающие" полистироловые микропласты, подвергнутые рентгеновскому облучению [46]. Противоречивость результатов определения  $\beta_2$ -ГПИ в многом связана с методическими различиями при проведении иммуноферментного анализа. В ряде случаев коммерческие препараты  $\beta_2$ -ГПИ могут подвергаться частичному расщеплению на уровне фрагмента Lys 317-Thr 318, находящегося рядом с фосфолипидсвязывающим сайтом Cys 281-Cys 288 V домена, что приводит к существенной потере функциональной активности  $\beta_2$ -ГПИ [47]. Наряду с этим обнаружена способность плазмина и фактора Ха расщеплять данный фосфолипидсвязывающий участок  $\beta_2$ -ГПИ [48]. b2-ГПИ - гетерогенная группа аутоантител, включающая, главным образом, низкоаффинные антитела, которые проявляют функциональную активность при условии бивалентного связывания и высокой плотности антигена, иммобилизованного на по-

верхности облученных микропласт [49]. Вместе с тем имеется небольшое количество высокоаффинных антител, взаимодействующих с человеческим или бычьим  $\beta_2$ -ГПИ, адсорбированным на необработанных микропластах [5]. По данным R.A.S.Roubeu и соавт. [49] связывающая активность b2-ГПИ человека проявляется при концентрации  $\beta_2$ -ГПИ от 1 до 5 мкг/мл, в то время как J.Guerin и соавт. [21] использовали концентрацию  $\beta_2$ -ГПИ в 20 раз выше. По мнению T.Koike и E.Matsuura [51] высокоаффинные мышиные моноклональные антитела одинаково эффективно связываются с b2-ГПИ, адсорбированным на поверхности необработанных и облученных микропласт, а  $\alpha\beta_2$ -ГПИ человека не взаимодействуют с  $\beta_2$ -ГПИ, покрывающим лунки необработанных микропласт. Для эффективного связывания с антителами важное значение имеют распределение и плотность  $\beta_2$ -ГПИ на твердой фазе, обеспечивающие оптимальное расстояние и корректную пространственную ориентировку каждого его эпитопа относительно молекул  $\alpha\beta_2$ -ГПИ. Показано, что димеризация  $\beta_2$ -ГПИ индуцирует выраженное повышение аффинности поликлональных  $\alpha\beta_2$ -ГПИ у больных АФС, при этом Fab' фрагменты  $\alpha\beta_2$ -ГПИ не реагируют с нативным и димеризованным  $\beta_2$ -ГПИ [49,52]. С другой стороны, нельзя исключить экспрессию ранее скрытых эпитопов  $\beta_2$ -ГПИ в результате конформационных изменений, индуцированных связыванием с  $\alpha\beta_2$ -ГПИ [51]. Результаты иммуноферментного анализа  $\alpha\beta_2$ -ГПИ могут варьировать в зависимости от типа буферного раствора, применяемого для нанесения антигена на поверхность микропласт. При разведении  $\beta_2$ -ГПИ карбонатным буфером наблюдается более высокая чувствительность определения  $\alpha\beta_2$ -ГПИ, чем при использовании Трис-буфера [52]. Выявление низкого и неспецифического связывания  $\alpha\beta_2$ -ГПИ обусловлено реагированием антител больных АФС не только с ФЛ и  $\beta_2$ -ГПИ, но и с широким спектром белков (протромбин, аннексин V, белок C, белок S), потенциально присутствующих в тестируемых сыворотках и связывающихся с незаблокированными участками на дне лунок. Однако в целом данная проблема имеет большее значение для иммуноферментного анализа аКЛ, при котором указанные сывороточные факторы могут содержаться как в исследуемых сыворотках, так и в фетальной бычьей сыворотке. Наряду с этим связывающая активность  $\alpha\beta_2$ -ГПИ зависит от количества и продолжительности отмывок, так как каждый цикл отмывки может приводить к кумулятивному снижению числа связавшихся низкоаффинных  $\alpha\beta_2$ -ГПИ и общему уменьшению чувствительности ИФМ определения  $\alpha\beta_2$ -ГПИ.

Таким образом, лабораторная диагностика АФС должна основываться на определении аФЛ в сыворотке крови с обязательным использованием комплекса методов, включая иммуноферментный анализ аКЛ и  $\alpha\beta_2$ -ГПИ и исследование ВА с помощью коагулологических тестов. аКЛ-чувствительный, но неспецифический маркер АФС, сильно варьирующий из-за низкой межлабораторной сопоставимости результатов и различий в используемых тест-системах. Наличие у больных АФС ассоциации между повышением уровня аКЛ и увеличением риска развития тромбозов не исключает значения низкопозитивных, ложноположительных результатов тестирования аКЛ как потенциальных тромбогенных факторов при атеросклерозе и других заболеваниях, не связанных с АФС. Предсказательная ценность положительных результатов исследования  $\alpha\beta_2$ -ГПИ для постановки диагноза АФС выше, чем у аКЛ и ВА, однако при широком использовании  $\alpha\beta_2$ -ГПИ в качестве лабораторного критерия диагностики АФС необходима дальнейшая стандартизация ИФМ определения данного показателя на международном уровне.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Roubey R.A.S. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Arthr. Rheum.*, 1996, 39, 1444-1454
2. Hughes G.R.V. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet*, 1993, 342, 341-344
3. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. М., Литера, 2004
4. Калашникова Л.А. Неврология антифосфолипидного синдрома. М., Медицина, 2003
5. Harris E.N. The Second International Anticardiolipin Standardization Workshop/The Kingston Antiphospholipid Study (KAPS) Group. *Am.J.Clin.Pathol.*, 1990, 94, 476-484
6. Galli M., Comfurius P., Maassen C. et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*, 1990, 335, 1544-1547
7. Matsuura E., Igarashi Y., Fujimoto M., et al. Anticardiolipin cofactor(s) and different diagnosis of autoimmune disease. *Lancet*, 1990, 336, 177-178
8. McNeil H.P., Simpson R.J., Chesterman C.N., Krilis S.A. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: B2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1990, 87, 4120-4124
9. Brandt J.T., Triplett D.A., Alving B., Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. *Thromb.Haemost.*, 1995, 74, 1185-1190.
10. Pierangeli S.S., Stewart M., Silva L.K., Harris E.N. An antiphospholipid wet workshop: 7th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies. *J.Rheumatol.*, 1998, 25, 156-160
11. Wilson W.A., Gharavi A.E., Koike T. et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthr. Rheum.*, 1999, 42, 1309-1311
12. Reddel S.W., Krilis S.A. Testing for and clinical significance of anticardiolipin antibodies. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.*, 1999, 6, 775-782
13. Harris E.N., Pierangeli S.S. "Equivocal" antiphospholipid syndrome. *J.Autoimmunity*, 2000, 15, 81-85
14. Баркаган З.Г., Момот А.П., Цывкина Л.П., и др. Принципы лабораторной диагностики антифосфолипидного синдрома. *Клин.лаб.диагностика*, 2000, 3, 47-51
15. Александрова Е.Н., Насонов Е.Л., Ковалев В.Ю. Количественный иммуноферментный метод определения антител к кардиолипину в сыворотке крови. *Клин.ревматол.*, 1995, 4, 35-39
16. Tincani A., Balestrieri G., Allegri F. et al. Overview on anticardiolipin ELISA standardization. *J.Autoimmunity*, 2000, 15, 195-197
17. Escalante A., Brey R.L., Mitchell B.D. et al. Accuracy of anticardiolipin antibodies in identifying a history of thrombosis among patients with systemic lupus erythematosus. *Am.J.Med.*, 1995, 98, 559-565
18. Wasmuth J.C., Minarro D.O., Homrighausen A. et al. Phospholipid autoantibodies and the antiphospholipid antibody syndrome: diagnostic accuracy of 23 methods studied by variation in ROC curves with number of clinical manifestations. *Clin.Chem.*, 2002, 48, 1004-1010
19. Musial J., Swadzba J., Motyl A. et al. Clinical significance of antiphospholipid protein antibodies. Receiver operating characteristics plot analysis. *J.Rheumatol.*, 2003, 30, 723-730
20. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Решетняк Т.М. и соавт. Антитела к b2-гликопротеину-I и антитела к кардиолипину при антифосфолипидном синдроме: анализ чувствительности и специфичности. *Клин.мед.*, 2003, 9, 25-31
21. Guerin J., Feighery C., Sim R.B. et al. Antibodies to B2-glycoprotein-I A specific marker for the antiphospholipid syndrome. *Clin.Exp.Immunol.*, 1997, 109, 304-309
22. Detkova D., Gil-Aquado A., Lavilla P. et al. Do antibodies to ?2-glycoprotein I contribute to the better characterization of the antiphospholipid syndrome ? *Lupus*, 1999, 8, 430-438
23. Amengual O., Atsumi T., Khamashta M.A. et al. Specificity of ELISA for antibody to B2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br.J.Rheumatol.*, 1996, 35, 1239-1243
24. Horbach D.A., Oort E.V., Donders R.C.J.M. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Tromb.Haemost.*, 1996, 76, 916-924
25. Roubey R. A. S., Maldonado M.A., Byrd S.N. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to ?2-glycoprotein I and a conventional anticardiolipin immunoassay. *Arthr. Rheum.*, 1996, 39, 1606-1607
26. Day H.M., Thiagarajan P., Ahn C. et al. Antibodies to B2-glycoprotein I in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome: clinical correlations in comparison with other antiphospholipid antibody tests. *J.Rheumatol.*, 1998, 25, 667-674
27. Reber G., Arvieux J., Comby E. et al. Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies. The working group on methodologies in haemostasis from the GEHT (groupe d'Etudes sur le hemostasis et la thrombose). *Thromb.Haemost.*, 1995, 73, 444-452
28. Andrian M.A., Colonna F., Morio F. et al. Comparison of different kits in the detection of autoantibodies to cardiolipin and beta2 glycoprotein I. *Rheumatol. (Oxford)*, 2004, 43, 181-185
29. McNeil H.P., Chesterman C.N., Krilis S.A. et al. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv.Immunol.*, 1991, 49, 193-280
30. Boffa M.C., Berard M., Sugi T. et al. Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies detected by ELISA II Kinigen reactivity. *J.Rheumatol.*, 1996, 23, 1375-1379
31. Matsuura E., Igarashi Y., Fujimoto M. et al. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J.Immunol.*, 1992, 148, 3885-3891
32. Oosting J.D., Derksen R.H.W.M., Bobbin K.I.W. et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood*, 1993, 81, 2618-2625
33. Sugi T., McIntyre J.A. Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. *Blood*, 1995, 86, 3083-3089
34. Alarcon-Segovia D., Deleze M., Oria C.V. et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine*, 1989, 68, 353-365
35. Couchock S., Fort J., Munoz S. et al. False positive ELISA tests for anticardiolipin antibodies in sera from patients with repeated abortious, rheumatologic disorders and primary biliary cirrhosis: correlation with elevated polyclonal IgM and implications for patients with repeated abortion. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998, 73, 289-294
36. Adopian M.S., Boctor F.N., Peter J.B. et al. False-positive test result for IgM anticardiolipin antibody due to IgM rheumatoid factor. *Arthr.Rheum.*, 1988, 31, 1212-1213
37. Hasselaar P., Triplett D.A., La Rue A. et al. Heat treatment of serum and plasma induces false positive results in the antiphospholipid antibody ELISA. *J.Rheumatol.*, 1990, 17, 186-191
38. Cabiedes J., Cabral A.R., Alarcon-Segovia D. Hidden antiphospholipid antibodies in normal human sera circulate as immune complexes whose antigen can be removed by heat, acid, hypermolar buffers or phospholipase treatment. *Eur.J.Rheumatol.*, 1998, 28, 2108-2114



39. Matsuda J., Saiton N., Gohchi K. et al. Distinguishing B2-glycoprotein I dependent (systemic lupus erythematosus type) and independent (syphilis type) anticardiolipin antibody with tween 20. *Br.J.Haematol.*, 1993,85,799-802
40. Arvieux J., Roussel B. Influence of Tween 20 on the detection of B2-glycoprotein I - dependent anticardiolipin antibodies. *Br.J.Haematol.*, 1994,87,443-444
41. Cabral A.R., Cabiedes J., Alarcon-Segovia D. Tween-20 detaches cardiolipin from ELISA plates and makes anticardiolipin antibodies undetectable regardless of the presence of B2-glycoprotein I. *J.Immunol.Methods.*, 1994,175,107-114
42. Hunt J.E., McNeil H.B., Morgan G.J. et al. A phospholipid-B2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus*, 1992, 1, 75-81
43. Roubey R.A. Antigenic specificities of antiphospholipid antibodies implications for clinical laboratory testing and diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Lupus*, 1996,5,425-430
44. McCarthy J.M., wagenknecht D.R., McIntyre J.A. Activity of antiphospholipid antibody ELISA cofactor in different animal sera. *J.Clin.Lab.Anal.*, 1994,8,167-171
45. Arvieux J., Darnige L., Hachulla E. et al. Species specificity of anti-B2 glycoprotein I autoantibodies and its relevance to anticardiolipin antibody quantitation. *Thromb.Haemost.*, 1996,75,725-730
46. Matsuura E., Igarashi Y., Yasuda T., Triplett D., Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J.Exp.Med.*, 1994,179,457-462
47. Hunt J., Krilis S. The fifth domain of beta2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (cys281-cys288), and region recognised by anticardiolipin antibodies. *J.Immunol.*, 1994,152, 653-659
48. Ohkura N., Magihara Y., Yoshimura T. et al. Plasmin can reduce the function of human B2 glycoprotein I by cleaving domain V into a nicked form. *Blood*, 1998,91,4173-4179
49. Roubey R.A.S., Eisenberg R.A., Harper M.F. et al. "Anticardiolipin" autoantibodies recognize B2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of antigen density and bivalent binding. *J.Immunol.*, 1995,154,954-960
50. Arvieux J., Regnault V., Hachulla E. et al. Heterogeneity and immunochemical properties of anti-beta 2 -glycoprotein I autoantibodies. *Tromb.Haemost.*, 1998,80,393-398
51. Koike T., Matsuura E. Anti-B2 -glycoprotein I antibodies: specificity and clinical significance. *Lupus*, 1996,5,378-380
52. Sheng Y., Kandiah D.A., Krilis S.A. et al. Anti-B2 -glycoprotein I antibodies from patients with the "antiphospholipid" syndrome bind to B2-glycoprotein I with low affinity dimerization of B2-glycoprotein I induces a significant increase in anti- B2-glycoprotein I antibody affinity. *J.Immunol.*, 1998,161,2038-2043

Поступила 10.09.04