



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16967 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ВОВЧАКОВОГО АНТИКОАГУЛЯНТУ У ХВОРИХ НА ГЕМОФІЛІЮ

1

2

(21) u200512005

(22) 14.12.2005

(24) 15.09.2006

(46) 15.09.2006, Бюл. № 9, 2006 р.

(72) Стасишин Олександра Василівна, Красівська
Валерія Валеріївна, Логінський Володимир
Євстахович, Євстахевич Ігор Йосипович, Новак
Василь Леонідович

(73) ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА
ТРАНСФУЗІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АМН УКРАЇНИ,
Стасишин Олександра Василівна, Красівська
Валерія Валеріївна, Логінський Володимир
Євстахович, Євстахевич Ігор Йосипович, Новак
Василь Леонідович

(57) Спосіб діагностики вовчакового
антикоагулянту (ВА) у хворих на гемофілію, що

включає послідовне виконання коагулологічних
тестів: активований парціальний
тромбопластиновий час (АПТЧ) з основною
концентрацією АПТЧ-реагента, протромбіновий
час (ПЧ) з розведеним тромбопластином 1:50,
1:500 (ПЧ_{1:50}, ПЧ_{1:500}), лебетоксовий тест
(скринінгові тести), лебетокс/ехітоксовий індекс
(тест на підтвердження), який відрізняється тим,
що додатково вводять тести на підтвердження
відношення АПТЧ у безтромбоцитній плазмі
(АПТЧ_{БТП}) до АПТЧ із зруйнованими шляхом
заморожування і розморожування тромбоцитами
(АПТЧ_{ЗТП}) однієї особи (I_{АПТЧ}) та різниці АПТЧ у
БТП на 2-й (АПТЧ₂) і 10-й (АПТЧ₁₀) хвилині її
інкубації.

Корисна модель відноситься до медицини, а
саме до гематології, і може бути використана для
діагностики вовчакового антикоагулянту (ВА) у
хворих на гемофілію.

ВА, антикардіоліпінові антитіла, антитіла до
різних негативно заряджених фосфоліпідів
відносяться до групи антифосфоліпідних антитіл
(АФЛА). АФЛА представляють собою гетерогенну
популяцію аутоантитіл (IgG, IgM, IgA або їх суміш),
що розпізнають комплекси фосфоліпідів з білками.
ВА відноситься до імуноглобулінів класу IgG і
представляє собою групу антитіл проти негативно
заряджених фосфоліпідів [4,6,7].

В зв'язку з дефіцитом факторів зсідання VIII
(IX) хворі на гемофілію постійно потребують
проведення замісної трансфузійної терапії, на
фоні якої спостерігається зростання частоти
імунних ускладнень та резистентності до замісної
терапії. Основною причиною резистентності до
замісної терапії у хворих на гемофілію є поява
інгібіторних антитіл до факторів зсідання VIII (IX),
однак все частіше в літературі з'являються
повідомлення про роль АФЛА, зокрема ВА у її
розвитку [5,8,9,10].

Аналоги і прототиби.

Підкомітетом з вовчакового антикоагулянту /
антифосфоліпідних антитіл Комітету з науки і
стандартизації Міжнародного товариства з
тромбозів та гемостазу [Subcommittee on lupus
anticoagulant/ antiphospholipid antibodies of the
Scientific and Standardisation Committee of the ISTH]
та Британським гематологічним товариством
розроблено і рекомендовано трьохетапний
комплекс тестів для виявлення активності ВА
[1,2,3,7].

I етап. Скринінгові тести — тести на основі
фосфоліпідів різного походження (фосфоліпід-
залежні тести). Присутній в дослідній плазмі ВА
може здовжувати скринінгові тести за рахунок
блокади ним незначної кількості фосфоліпідів
тромбоцитарних мікровезикул та здійснювати
блокаду реакцій у процесі зсідання, що
відбуваються на фосфоліпідній матриці;

а) каоліновий час зсідання у бідній на
тромбоцити плазмі (БТП).

б) активований парціальний
тромбопластиновий час (АПТЧ) з основною
концентрацією АПТЧ-реагента у БТП, індекс
ААПТЧ розраховується як співвідношення АПТЧ
досліджуваної плазми до АПТЧ контрольної
плазми). Підвищення індексу більше, ніж на 1,3

(19) UA (11) 16967 (13) U

порівняно з нормальною величиною вказує на наявність ВА в досліджуваній плазмі.

в) АПТЧ із зниженою концентрацією АПТЧ-реагента, індекс АПТЧ_{3Н} (тест на розведення). Для підвищення чутливості методу використовується знижена концентрація фосфоліпідів (розведення основної концентрації АПТЧ-реагенту 1:20), що полегшує їх блокаду ВА.

г) протромбіновий час (ПЧ) з розведеним тромбoplastином 1:50, 1:500 (ПЧ_{1:50}, ПЧ_{1:500}). Збільшення індексу (розраховується як співвідношення ПЧ досліджуваної плазми до ПЧ контрольної плазми) більше, ніж 1,1 вказує на присутність ВА і характеризує його кількісно.

д) тест з розведеною фосфоліпід-залежною отрутою змії (гадюки Рассела або порзи) — лебетоксовий тест. Зростання індексу лебетоксового часу (I_L), що розраховується як співвідношення лебетоксового часу досліджуваної плазми до лебетоксового часу контрольної плазми, більше, ніж 1,15, може бути пов'язане з дією ВА.

II етап. Корекційні тести - тести, які виключають дефіцит коагуляційних факторів. Нормалізація подовжених скринінгових тестів при додаванні до системи невеликої кількості (1:4 або 1:1) нормальної БТП вказує на дефіцит факторів зсідання. Відсутність корекції може означати наявність ВА;

а) тест корекції каолінового часу.

б) тест корекції АПТЧ.

III етап. Тести, які підтверджують присутність ВА - підтверджують фосфоліпід-залежну природу інгібітора. При наявності ВА при додаванні до дослідної плазми надлишку фосфоліпідів, або в результаті руйнування власних тромбоцитів, вкорочується (нормалізується) час у змінених скринінгових тестах за рахунок зв'язування антитіл із введеними фосфоліпідами і втрати ними інгібіторної дії на реакції коагуляції;

а) тест нейтралізації ВА з допомогою відмитих і заморожених тромбоцитів донора в концентрації 100×10^9 /л. Фосфоліпіди зруйнованих тромбоцитів нейтралізують ВА, що приводить до вкорочення подовжених скринінгових тестів:

- АПТЧ (якщо корекції не спостерігається при звичайній концентрації реагенту, то слід застосувати АПТЧ-реагент у низькій концентрації (розведення 1:20), що може підвищити чутливість тесту. Вкорочення тесту більше, ніж на 5 с вказує на присутність інгібітора).

б) лебетокс/ехітоксовий індекс (аналог текстарин/екаринового індексу). Базується на паралельному виконанні і співставленні результатів фосфоліпідзалежних і фосфоліпіднезалежних тестів з отрутами змії. Визначення I_L в лебетоксовому тесті (на основі фосфоліпідзалежної отрути Гюрзи) було проведено у групі скринінгових тестів. Коагулологічна дія отрути змії ефі є фосфоліпіднезалежною і на її основі виконують ехітоксовий тест та вираховують ехітоксовий індекс (I_E), як співвідношення ехітоксового часу досліджуваної плазми до ехітоксового часу контрольної плазми. Далі вираховують

лебетокс/ехітоксовий індекс як співвідношення між I_L і I_E . В нормі лебетокс/ехітоксовий індекс дорівнює $1,00 \pm 0,1$ при мануальному визначенні.

Позитивний результат одного чи більше тестів на підтвердження свідчить про наявність активності ВА у досліджуваній плазмі.

Недоліком розглянутого прототипу є те, що у нього включені тести, які у хворих на гемофілію завжди будуть подовженими або позитивними, оскільки їх результат залежить від дефіциту або інгібування плазматичних факторів внутрішнього механізму коагуляції (VIII, IX, XI, XII). До таких тестів належить каоліновий час, АПТЧ із зниженою концентрацією АПТЧ-реагента, тести, які виключають дефіцит коагуляційних факторів (тест корекції каолінового часу, тест корекції АПТЧ). Тому, діагностика ВА у хворих на гемофілію має труднощі (особливості), які пов'язані не тільки з внутрішньою гетерогенністю ВА як антитіла, але й з первинним порушенням внутрішнього шляху тромбіногенезу, спричиненим дефіцитом факторів зсідання VIII (IX) у цих хворих [9,10].

Враховуючи, що у хворих на гемофілію не всі тести стандартизованого методу є інформативними, метою корисної моделі є розробка алгоритму діагностики ВА на основі стандартизованої методики діагностики з врахуванням особливості гемостазу (дефіцит фактора VIII), шляхом вдосконалення, спрощення, збільшення інформативності рекомендованого алгоритму та покращення його специфічності для цієї групи хворих.

Суттю даної корисної моделі є створення алгоритму (способу) діагностики ВА коагулологічним методом для хворих на гемофілію.

Поставлена мета досягається тим, що до інформативних тестів для хворих на гемофілію (з трьохетапного комплексу тестів рекомендованого Міжнародним товариством з тромбозів та гемостазу та Британським гематологічним товариством) АПТЧ з основною концентрацією АПТЧ-реагента, ПЧ_{1:50}, ПЧ_{1:500}, лебетоксового тесту (скринінгові тести), лебетокс/ехітоксовий індекс (тести на підтвердження) включено додаткові 2 тести на основі АПТЧ з основною концентрацією АПТЧ-реагента:

1. Відношення АПТЧ у БТП (АПТЧ_{БТП}) і АПТЧ зі зруйнованими шляхом заморожування і розморожування тромбоцитами (АПТЧ_{БТП}) однієї особи ($I_{АПТЧ}$). Значення АПТЧ у плазмі з ВА залежить від концентрації тромбоцитарних фосфоліпідів, тому ми визначаємо АПТЧ у плазмі збагаченій зруйнованими тромбоцитами та в БТП. За наявності ВА різниця між вказаними двома показниками АПТЧ перевищуватиме 16,4%. Індекс вкорочення АПТЧ обчислюється за формулою:

$$I_{АПТЧ} = \frac{АПТЧ_{БТП} - АПТЧ_{ЗТП}}{АПТЧ_{ЗТП}} * 100\%$$

$I_{АПТЧ}$ - індекс АПТЧ;

АПТЧ_{БТП} - АПТЧ безтромбоцитної плазми;

АПТЧ_{ЗТП} - АПТЧ у плазмі з зруйнованими тромбоцитами.

2. Різниця АПТЧ у БТП на 2-й (АПТЧ₂) і 10-й (АПТЧ₁₀) хвилині її інкубації при 37°C. Адсорбція ВА на тромбоцитарних фосфоліпідах сильніша впродовж більш тривалого часу, тому за наявності ВА вкорочення АПТЧ на 10-й хвилині інкубації порівняно з АПТЧ на 2-й хвилині інкубації більш значне. Різниця між АПТЧ₂ і АПТЧ₁₀ в нормі складає 11 секунд. Різниця більше, ніж 11с вказує на наявність В А [3].

Перевагою запропонованого алгоритму є те, що на відміну від стандартизованої методики, він включає тільки ті тести, які є інформативними для хворих на гемофілію в умовах дефіциту прокоагулянтів. Для визначення можливості застосування запропонованого способу діагностики ВА у хворих на гемофілію було виконано дослідження у 200 хворих. Контрольну групу для визначення нормальних показників склали 50 здорових осіб (25 чоловіків і 25 жінок середнього віку), які не приймали жодних ліків. Статистичну обробку результатів і розрахунок коефіцієнтів кореляції проводили з використанням пакету статистичного аналізу електронних таблиць Excel. Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента. Вірогідність отриманих результатів оцінювали на рівні достовірності не менше 95% ($P > 0,05$).

Хворі були розділені на 2 групи: 1 група - 35 хворих на гемофілію А з виявленим В А (ВА+) і 2 група - 165 хворих на гемофілію А без ВА (ВА-).

Як показали дослідження, у скринінгових тестах (Табл.1), у хворих обох груп було значне подовження АПТЧ_{БТП} У порівнянні з контролем —

на 133% у 1 групі, що становить $109,4 \pm 35,4$ с і на 92,3% ($90,2 \pm 14,2$ с) у 2 групі досліджуваних. Таке значне порушення АПТЧ у обох групах відбувається завдяки дефіциту фактора VIII у цих хворих на гемофілію. Виконання цього тесту є необхідним, оскільки він використовується надалі у III етапі (підтверджувальних тестах).

У тесті ПЧ₅₀ в групі 1 (ВА+) спостерігається значне збільшення часу до $53,1 \pm 9,6$, що становить подовження на 61,9% у порівнянні з відповідним показником у групі здорових осіб. Індекс ПЧ_{1:50} у 1 групі був збільшений $-1,3 \pm 0,4$ (при нормі до 1,1), що може свідчити про наявність активності В А. У хворих 2 групи (ВА-) значення ПЧ_{1:50} і індексу ПЧ_{1:50} були в межах норми. За показниками ПЧ_{1:500} та індексу ПЧ_{1:500} спостерігається значна різниця між 1 і 2 групами. У хворих на гемофілію ВА+ відбувається подовження на 47,3% ($103,7 \pm 33,6$ с) відносно контролю і індекс становить $1,6 \pm 0,7$ при нормі до 1,1), тоді як у хворих на гемофілію без ВА значення ПЧ_{1:500} і індексу ПЧ_{1:500} залишаються нормальними, що свідчить про відсутність ВА у цих хворих. Про наявність ВА у хворих 1 групи також свідчить ще один тест з групи скринінгових тестів - лебетоксовий час і відповідно $I_{\text{л}}$. У 1 групі лебетоксовий час зростає на 36,0% у порівнянні з контролем, а $I_{\text{л}}$ збільшений до $1,6 \pm 0,3$ при нормі $1,0 \pm 0,2$, що підтверджує наявність ВА у хворих цієї групи. У групі хворих без ВА лебетоксовий час і $I_{\text{л}}$ залишаються в межах норми.

Показники скринінгових тестів у хворих на гемофілію

Таблиця 1

У хворих на гемофілію при позитивному результаті хоч одного тесту з ПЧ_{1:50}, ПЧ_{1:500}, лебетоксового часу слід перейти до виконання тестів III етапу - тестів на підтвердження фосфоліпід-залежної природи інгібітора

Показник	Здорові n=50	Хворі на гемофілію ВА(+) n=35		Хворі на гемофілію (ВА-) n=165	
	Час, с	Час, с	Подовження, %	Час, с	Подовження, %
АПТЧ _{БТП}	$46,9 \pm 2,1$	$109,4 \pm 35,4$	133,2	$90,2 \pm 14,2$	92,3
Індекс АПТЧ _{БТП}	0,8-1,2	$2,2 \pm 0,7$	-	$2,5 \pm 0,3$	-
ПЧ _{1:50}	$32,8 \pm 0,9$	$53,1 \pm 9,6$	61,9	$37,4 \pm 2,8$	14,0
Індекс ПЧ _{1:50}	0,9-1,1	$1,3 \pm 0,4$	-	$1,0 \pm 0,2$	-
ПЧ _{1:500}	$70,4 \pm 2,9$	$103,7 \pm 33,6$	47,3	$65,5 \pm 7,8$	-6,9
Індекс ПЧ _{1:500}	0,9-1,1	$1,6 \pm 0,7$	-	$1,1 \pm 0,3$	-
лебетоксовий тест	$38,6 \pm 4,2$	$52,5 \pm 10,0$	36,0	$44,6 \pm 8,1$	15,5
$I_{\text{л}}$	$1,0 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	-	$1,1 \pm 0,2$	-

Показники тестів на підтвердження у хворих на гемофілію

Таблиця 2

Показник	Здорові n=50	Хворі на гемофілію (ВА+) n=35	Хворі на гемофілію (ВА-) n=165
Ехітоксовий час (с)	$40,1 \pm 2,8$	$31,4 \pm 3,6$	$42,6 \pm 5,3$
$I_{\text{Е}}$	$1,1 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$
$I_{\text{л/Е}}$	$1,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$
$I_{\text{АПТЧ}}$ (%)	$4,8 \pm 0,9$	$27,0 \pm 5,3$	$6,4 \pm 1,6$
АПТЧ ₂ - АПТЧ ₁₀ (с)	$2,9 \pm 0,8$	$46,2 \pm 6,8$	$3,0 \pm 0,6$

У 1 і 2 групі хворих ехітоксовий час і $I_{\text{Е}}$ істотно не відрізнялись: $31,4 \pm 3,6$ с і $42,6 \pm 5,3$ с відповідно, індекси в межах норми. Спостерігається зростання

$I_{\text{л/Е}}$ У хворих на гемофілію ВА+ до $2,0 \pm 0,3$, на відміну від хворих 2 групи, де $I_{\text{л/Е}}$ становить

1,0±0,2. Таке збільшення індексу у хворих 1 групи підтверджує наявність в них ВА.

Для збільшення інформативності стандартизованої методики нами були введені додаткові два тести, показники яких у хворих на гемофілію з ВА і хворих без ВА значно відрізнялись. У 1 групі І_{АПТЧ} був збільшений до 27,0±5,3% при граничному значенні - 16,4%, що є підтвердженням наявності ВА і співпадає з попередніми даними. У хворих 2 групи цей показник становить 6,4±1,6% і є в межах норми. Різниця АПТЧ₂ - АПТЧ₁₀ у хворих ВА+ була значною і становила 46,2±6,8с і перевищувала

11С.Цей показник в 2 групі був аналогічним до значення у здорових осіб і становив 3,0±0,6с.

Аналіз отриманих даних показав, що у алгоритмі тести у хворих на гемофілію з виявленим ВА є позитивними, на відміну від показників групи хворих без ВА, що є підтвердженням придатності запропонованого нами алгоритму діагностики.

Тести з різних етапів стандартизованої методики, що виявились не інформативними для хворих на гемофілію, і виконання яких ми не рекомендуємо, представлені в Табл.3,4.

Показники скринінгових тестів у хворих на гемофілію

Таблиця 3

Показники каолінового часу, АПТЧ_{3Н} і індексу АПТЧ_{3Н} однаково здовжені в обох групах хворих на гемофілію (в зв'язку з дефіцитом фактора VIII), що підтверджує їх не інформативність і тому їх проведення ми вважаємо недоцільним

Показник	Здорові n=50	Хворі на гемофілію (ВА+) n=35		Хворі на гемофілію (ВА-) n=165	
	Час, с	Час, с	Подовження, %	Час, с	Подовження, %
каоліновий час у БТП	87,4±4,6	248,3±80,1	184,4	219,8±12,7	151,5
АПТЧ _{3Н}	60,8±3,4	179±50,5	194,4	128±9,3	110,5
Індекс АПТЧ _{3Н}	0,9-1,2	3,3±1,0	-	2,1±0,3	-

Виконання групи корекційних тестів та тесту нейтралізації АПТЧ відмитими тромбоцитами донора (з групи тестів на підтвердження) ми також вважаємо недоцільним, оскільки корекційний тест, що має за мету виключення дефіциту факторів зсідання, у всіх хворих на гемофілію є позитивним, незалежно від наявності інгібіторів (нейтралізуючого чи ВА) (Табл.4), В цих тестах у хворих на гемофілію обох груп (ВА+) та (ВА-)

відбувається значна або повна нормалізація подовжених показників за рахунок надходження у систему з нормальною плазмою дефіцитного фактора. Корекція відмитими тромбоцитами донора у тесті АПТЧ у 1 і 2 групах хворих є однаковою і незначною, що підтверджує їх не інформативність для діагностики ВА у хворих на гемофілію.

Таблиця 4

Показники корекційних тестів та тестів на підтвердження у хворих на гемофілію

Показник	Здорові n=50		Хворі на гемофілію ВА(+) n=35		Хворі на гемофілію ВА(-) n=165	
	Час, с	Корекція, %	Час, с	Корекція, %	Час, с	Корекція, %
Корекція каолінового часу*	86,5±6,7	-1,02	91,3±12,4	63,2	89,2±7,4	60,0
корекція АПТЧ*	48,4±2,1	3,2	55,7±8,8	49,1	65,7±9,5	27,2
Нейтралізація відмитими тромбоцитами донора АПТЧ	49,7±1,9	-6,0	95,6±15,4	12,6	77,8±5,2	13,7

* - корекція нормальною плазмою

Отже, запропонований спосіб (алгоритм) діагностики ВА є придатним для хворих на гемофілію, інформативним для цієї категорії хворих і має вигляд, представлений на рис 1. Застосування даного способу виявлення активності ВА коагулологічним методом дозволить удосконалити діагностику патологічних інгібіторів у хворих на гемофілію, зменшити розхід реактивів та часу виконання дослідження, що покращить профілактику та лікування геморагічних проявів у цих хворих.

Джерела інформації:

1. Brandt J.T., Triplet D.A., Alving B., Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulant: an update. On behalf of the Subcommittee on lupus anticoagulant/ antiphospholipid antibodies of the

Scientific and Standardisation Committee of the ISTH// Thromb Haemos.- 1995, 74:1185-90.

2. л.П. Папаян, П.В. Хролова, А.С.Щитикова, Т.А. Ермолаева и др. Методы диагностики нарушений гемостаза при ангиопатиях с тромбогенными проявлениями.- Пособие для врачей в области гематологии.- Санкт-Петербург.- 1996г.- 20 С.

3. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы диагностики нарушений гемостаза.-Москва: Издательство "Ньюамед - АО", 1999.-213с.

4. Баркаган З.С., Момот А.П., Сердюк В., Цыпкина Л.П. Основы диагностики и терапии антифосфолипидного синдрома.- Москва: Издательство "Ньюамед", 2003.-45с.

5. Кацадзе Ю.Л. Циркулирующие ингибиторы в патологии гемостаза: тромбофилия и/или гемофилия // "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии": Матер. научн.-практ. конференции, Санкт-Петербург, 6-8 июня 2000г.- СПб.Б.п, 2000- С.194.

6. J. Arnout, M. Jankowski Antiphospholipid syndrome// The hematology Journal.-2004.-5, S1-S5.

7. P.G. De Groot, H.W.M. Derksen Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome// Thrombosis and Haemostasis.-2005.- V.3.- P. 1854-1860.

8. Wermes C, Sycora K.W., Depka-Prodzinski M.V., Welte K., Barthels M. Antiphospholipid antibodies in hemophilia All Abstracts of XXIII th WFH, May 17-21, Hague, 1998,- P.293.

9. Логінський В.Є., Руденко В.П., Сташишин О.В., Красівська В.В., Гриценког.М. Лабораторна діагностика вовчакового антикоагулянту// Лабораторна діагностика.-2000.-№4.-С.5-10.

10. Руденко В.П., Логінський В.Є., Сташишин О.В. Особливості діагностики вовчакового антикоагулянту у хворих на гемофілію// Український журнал гематології та трансфузіології.-2001.-№1.-С.11-14.