

Определение порогового значения (cut-off) нормализованного отношения для определения волчаночного антикоагулянта в нормальной плазме доноров – здоровых добровольцев (результат исследования крупной сетевой лаборатории)

М. С. Пименов, старший менеджер по направлению гемостаз и анализ мочи¹

А. В. Васильев, руководитель отдела по контролю качества клинических лабораторных исследований

П. С. Садовников, руководитель проектов²

О. В. Ляшенко, врач по контролю качества²

З. В. Севрук, врач по контролю качества²

Л. Б. Копеева, ведущий специалист клинико-диагностической лаборатории²

И. И. Скибо, директор по технологиям и проектным работам²

Т. В. Вавилова, д.м. н, проф. кафедры клинической лабораторной диагностики³

¹ООО «Сисмекс РУС», г. Москва

²ООО НПФ «Хеликс», г. Санкт-Петербург

³ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Determination of cut-off threshold of normalized ratio for determining lupus anticoagulant in normal plasma of donors – healthy volunteers (large network laboratory study results)

M.S. Pimenov, A.V. Vasilyev, P.S. Sadovnikov, O.V. Lyashenko, Z.V. Sevruck, L.B. Kopaeva, I.I. Skibo, T.V. Vavilova

Sysmex RUS Co., Moscow; Helix Co., Saint Petersburg; North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov, Saint Petersburg; Russia

Резюме

Лабораторное определение волчаночного антикоагулянта необходимо для постановки диагноза «антифосфолипидный синдром» (АФС). Для достижения максимальной чувствительности из-за гетерогенной природы волчаночного антикоагулянта рекомендуется использовать две тест-системы с различными аналитическими принципами: тест с разбавленным ядом гадюки Рассела (dRVVT) и АЧТВ, чувствительный к волчаночному антикоагулянту. Целью данного исследования является проспективное определение референсных интервалов и пороговых значений нормализованного отношения в двух вариантах размораживания плазм. Точки cut-off нормализованного отношения (НО) составили 1,21; 1,18; 1,07 и 1,08 для НО LA1/LA1 (37 °C, 30 минут), НО LA1/LA1 (22–25 °C, 30 минут), НО FSL/FS (37 °C, 30 минут) и НО FSL/FS (22–25 °C, 30 минут) соответственно.

Ключевые слова: волчаночный антикоагулянт, пороговое значение, АФС, dRVVT, АЧТВ.

Summary

Laboratory tests for lupus anticoagulant (LA) are necessary for antiphospholipid syndrome (APS) diagnosis. Due to antibody heterogeneity, there are two test systems recommended to maximize detection rates: one of them is the dilute Russell's viper venom time (dRVVT) and the second one is the activated partial thromboplastin time (APTT). Current guidelines recommend getting the reference ranges and cut-off of the normalized screen/confirm ratio in dRVVT and APTT in every laboratory. The aim of this work is establishing of reference ranges and cut-off for the normalized ratio in dRVVT and APTT reagents using two type of sample preparation. The cut-off values of LA1/LA2 (37 °C, 30 minutes), LA1/LA2 (22–25 °C, 30 minutes), Actin FSL/Actin FS (37 °C, 30 minutes) and Actin FSL/Actin FS (22–25 °C, 30 minutes) pairs in the normalized ratio were 1.21, 1.18, 1.07 and 1.08, respectively.

Key words: lupus anticoagulant, cut-off values, APS, dRVVT, APTT.

Введение

Антифосфолипидный синдром (АФС) диагностируется у пациентов с сосудистым тромбозом или осложнениями во время беременности, лабораторные анализы которых демонстрируют наличие антифосфолипидных антител (АФЛ) [1]. Так как тромбоз и синдром потери плода неспецифичны для АФС, то диагноз будет зависеть от точного и надежного обнаружения АФЛ. Два критерия антитела: анти-

кардиолипиновые антитела (АКЛ) и антитела против β_2 -гликопротеина I ($\alpha\beta_2$ GPI) обнаруживаются методом ИФА, в то время как волчаночный антикоагулянт (ВА) выявляется путем проведения фосфолипид-зависимых клоттинговых тестов. Ни один из клоттинговых тестов не является чувствительным для всех ВА, и для достижения максимальной чувствительности и специфичности обнаружения необходимы две тест-системы

с различными аналитическими принципами [2, 3, 4]. Согласно международным руководствам основным тестом для выявления ВА является тест с разбавленным ядом гадюки Рассела (dRVVT) [2, 3, 4], и главным образом для специфичности выявления клинически значимого ВА в паре используют чувствительный к ВА реагент для определения активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ).

Классически каждый тип теста включает в себя первоначальный скрининг-тест с неразбавленной плазмой пациента, который при повышении значения продолжается тестом со смешиванием для доказательства ингибирования, и если он также повышен, то выполняется подтверждающий тест с неразбавленной плазмой для демонстрации фосфолипидной зависимости [2, 4].

Последние рекомендации Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) [4] и Британского общества гематологии (BSH) [2] поддерживают классический алгоритм. Тем не менее в рекомендациях BSH говорится, что при отсутствии других причин удлинения времени свертывания образцы с отрицательным тестом со смешиванием, но с положительным скринингом и подтверждением в неразбавленной плазме могут быть классифицированы как ВА-положительные. Это означает, что все три теста выполняются, а затем интерпретируются в свете комплексного анализа, а тест со смешиванием не используется для принятия диагностического решения как основного критерия. Руководство Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) переориентирует порядок тестирования (скрининг затем подтверждение, затем тест со смешиванием) и рекомендует, чтобы тест со смешиванием выполнялся только тогда, когда скрининг и подтверждение не являются четкими и (или) когда известны другие причины удлиненного времени свертывания или подозревается ВА [3]. В настоящее время все вышеперечисленные рекомендации [2, 3, 4] предлагают делать заключение о наличии ВА у пациентов на основании подсчета нормализованного отношения (НО), определения среднего нормального времени для каждого реагента и фиксировать пороговое значение (точку cut-off) в каждой лаборатории.

Целью данного исследования является проспективное определение референсных интервалов и порогового значения (точку cut-off) нормализованного отношения в двух вариантах размораживания плазмы для теста с разбавленным ядом гадюки Рассела и для теста АЧТВ, чувствительного к ВА.

Материалы и методы

Настоящее исследование проводилось в лабораторной службе «Хеликс» в городах Санкт-Петербург и Москва.

Пациенты и контроли

В исследование были включены 47 здоровых доноров обоих полов в равной пропорции со следующими критериями включения: отсутствие в анамнезе аутоиммунных заболеваний, нарушений системы гемостаза, случаев тромбоза, два и более случая выкидышей, возраст от 18 до 60 лет. Критерии исключения: лица, принимающие антикоагулянты, дезагреганты, гормон-заместительную терапию и оральные контрацептивы, беременные женщины и лица, перенесшие вирусную инфекцию в течение последних 14 дней.

Кровь забирали из средней локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette с двойной стенкой с натрия цитратом 3,2 % (Greiner-Bio-One, Австрия) с использованием игл Vacuette 22 калибра (Greiner-Bio-One, Австрия) и минимального застоя. Все образцы дважды центрифугировали: 15 минут при 1500 g, затем 10 минут при более 2500 g для получения бедной тромбоцитами плазмы [6]. Каждую плазму после центрифугирования алиquotировали и замораживали при -20°C и хранили 7 дней до тестирования.

В соответствии с международными руководствами CLSI [3, 6], рекомендуется размораживать плазму на водяной бане в течение 5 минут, в то же время они позволяют валидировать свой режим разморозки, который больше соответствует технологическому процессу лаборатории. Для исследования было выбрано два режима разморозки: в термостате при 37°C в течение 30 минут и при комнатной температуре ($22\text{--}25^{\circ}\text{C}$) в течение 30 минут.

Оборудование и реагенты

Для проведения исследования использовали анализатор плазменного и тромбоцитарного гемостаза CS-5100 (Sysmex Corporation, Япония) и реагенты (Siemens Healthineers, Германия).

Тест dRVVT: реагент для скрининга LA1, реагент для подтверждения LA2.

Тест АЧТВ: реагент для скрининга Actin FSL, реагент для подтверждения Actin FS.

Нормализованное отношение вычислялось по формуле $(b/a) / (d/c)$, где a – среднее значение для скрининга, b – значение скрининга, c – среднее значение для подтверждения и d – значение подтверждения.

Статистическая обработка производилась с использованием программного обеспечения MedCalc версии 19.1 (MedCalc Software, Бельгия).

Метод Тьюки был использован для оценки выбросов, которые не использовались для подсчета средних значений.

Референсный интервал нормализованного отношения и скрининговых тестов вычисляли процедурой непараметрического бутстрепа. В качестве референсных интервалов принимали 95%-ный доверительный интервал в соответствии с рекомендациями CLSI [7].

Для анализа различий между двумя режимами разморозки проводили статистический анализ. Нормальность распределения в группе определялась тестом Шапиро-Уилка при 0,05 %-ном уровне значимости. Если распределение соответствовало закону нормального распределения, для установления различия от исходного уровня внутри группы применялись однофакторный тест ANOVA с последующим тестом Ньюмана-Келса и t-тест Стьюдента (для попарного сравнения двух режимов размораживания образцов). Если распределение в группе не соответствовало закону нормального распределения, для установления различия от исходного уровня внутри группы применялся непараметрический тест Крускала-Уоллиса с последующим тестом Данна и тест Манна-Уитни (для попарного сравнения двух режимов размораживания образцов).

Результаты

Полученные данные теста с разбавленным ядом гадюки Рассела (LA1 и LA2) проверили на выбросы двусторонним методом Тьюки. В скрининге были определены пять выпадающих значений при обоих режимах разморозки, которые не учитывались при подсчете среднего значения. В подтверждающем тесте выпадающих значений обнаружено не было, поэтому при подсчете нормализованного отношения были исключены пять значений. Средние значения

Таблица 1
Референсный интервал для теста с разбавленным ядом гадюки Рассела (LA1 и LA2)

Реагент / параметр	Разморозка в термостате (37 °С, 30 мин.)	Разморозка при комнатной температуре (22–25 °С, 30 мин.)
Среднее время LA1 (скрининг), с	41,19	40,77
Среднее время LA2 (подтверждение), с	32,64	33,07
Отношение скрининг LA1 [90%-ный ДИ]	0,79 [0,7364; 0,8283] – 1,21 [1,1588; 1,2600]	0,81 [0,7697; 0,8530] – 1,20 [1,1539; 1,2350]
Отношение подтверждение LA2 [90%-ный ДИ]	0,90 [0,8761; 0,9163] – 1,11 [1,0865; 1,1275]	0,90 [0,8787; 0,9214] – 1,11 [1,0852; 1,1288]
Нормализованное отношение LA1/LA2 [90%-ный ДИ]	0,79 [0,7364; 0,8343] – 1,21 [1,1484; 1,2618]	0,82 [0,7827; 0,8570] – 1,18 [1,1356; 1,2247]

Таблица 2
Референсный интервал для теста АЧТВ (Actin FSL и Actin FS)

Реагент / параметр	Разморозка в термостате (37 °С, 30 мин.)	Разморозка при комнатной температуре (22–25 °С, 30 мин.)
Среднее время Actin FSL (скрининг), с	30,46	31,39
Среднее время Actin FS (подтверждение), с	26,67	27,34
Отношение скрининг Actin FSL [90%-ный ДИ]	0,86 [0,8281; 0,8891] – 1,14 [1,1031; 1,1712]	0,86 [0,8338; 0,8885] – 1,14 [1,1019; 1,1701]
Отношение подтверждение Actin FS [90%-ный ДИ]	0,85 [0,8224; 0,8834] – 1,17 [1,1277; 1,1978]	0,85 [0,8222; 0,8756] – 1,15 [1,1060; 1,1822]
Нормализованное отношение Actin FSL / Actin FS [90%-ный ДИ]	0,91 [0,8998; 0,9309] – 1,07 [1,0500; 1,0851]	0,90 [0,8848; 0,9240] – 1,08 [1,0549; 1,0957]

Таблица 3
Пороговые значения для теста с разбавленным ядом гадюки Рассела и для теста АЧТВ, чувствительного к ВА

Реагент / параметр	Разморозка в термостате (37 °С, 30 мин.)	Разморозка при комнатной температуре (22–25 °С, 30 мин.)
Отношение скрининг LA1	1,21	1,20
Нормализованное отношение LA1/LA2	1,21	1,18
Отношение скрининг Actin FSL	1,14	1,14
Нормализованное отношение Actin FSL/Actin FS	1,07	1,08

Таблица 4
Различия для теста с разбавленным ядом гадюки Рассела и теста АЧТВ, чувствительного к ВА

Группа	Статистически значимое отклонение от нормального распределения	Тест Ньюмана-Келса
LA1, с (22–25 °С, 30 мин.)	W = 0,9812 – отклонения нет (P = 0,7095)	P > 0,05
LA1, с (37 °С, 30 мин.)	W = 0,9537 – отклонения нет (P = 0,0879)	
Actin FSL, с (22–25 °С, 30 мин.)	W = 0,9751 – отклонения нет (P = 0,5312)	P > 0,05
Actin FSL, с (37 °С, 30 мин.)	W = 0,9666 – отклонения нет (P = 0,3089)	
LA2, с (22–25 °С, 30 мин.)	W = 0,9828 – отклонения нет (P = 0,7112)	P > 0,05
LA2, с (37 °С, 30 мин.)	W = 0,9799 – отклонения нет (P = 0,5889)	
Actin FS, с (22–25 °С, 30 мин.)	W = 0,9530 – отклонения нет (P = 0,1120)	P > 0,05
Actin FS, с (37 °С, 30 мин.)	W = 0,9693 – отклонения нет (P = 0,3742)	

для скрининга определены как 41,19 и 40,77 с для термостата и комнатной температуры соответственно, а средние значения для подтверждения – как 32,64 и 30,07 с.

Результаты теста АЧТВ (Actin FSL и Actin FS) также проверили на выбросы двусторонним методом Тьюки. В режиме термостата выпадающих значений не обнаружено. В случае разморозки при комнатной температуре были удалены из анализа одно значение в скрининге и два значения в подтверждении,

которые не учитывались при подсчете среднего значения. При подсчете нормализованного отношения итога было исключено три значения. Средние значения для скрининга определены как 30,46 и 31,39 с для термостата и комнатной температуры соответственно, а средние значения для подтверждения определены как 26,67 и 27,34 с.

Для принятия решения о наличии ВА у пациента необходимо рассчитать пороговое значение нормализованного отношения «скрининг / подтвержде-

ние». Пороговые значения (точки cut-off) определялись верхней границей референсного интервала нормализованного отношения и скрининга в соответствии с рекомендациями CLSI [7].

При сравнении значений, полученных в двух режимах разморозки (табл. 4), и попарного сравнения друг с другом (термостат и комнатная температура) статистических различий не выявлено, что говорит об одинаковом влиянии на результат двух режимов размораживания образцов.

Обсуждение

Отсутствие «золотого стандарта» и эталонной плазмы для обнаружения ВА позволяет многочисленным переменным способствовать неполной аналитической стандартизации в лабораторной диагностике ВА. Различия в составе реагентов и методах определения пороговых значений не допускают принять общие (международные) пороговые значения [9, 10] для определения ВА и, следовательно, обязательно рекомендуют локальное выведение или валидацию референсных интервалов и точек cut-off в каждой лаборатории [2, 3, 4, 5].

Полученные результаты приближены к рекомендуемым пороговым значениям (менее 1,2) [3] и соответствуют недавнему исследованию [8] на той же аналитической паре (реагент и анализатор).

Стоит отметить, что размораживание образца в термостате более стандартизировано за счет постоянной температуры и сезонные колебания температуры в помещении не будут сказываться на результате. В то же

время нельзя исключать человеческий фактор, поэтому даже непродолжительное превышение нахождения образца в термостате критически скажется на результате, и режим разморозки при комнатной температуре представляется менее рискованным.

Выводы

Определены референсные интервалы для скринингового реагента LA1 и Actin FSL / подтверждающего реагента LA2 и Actin FS. Пороговые значения (точки cut-off) нормализованного отношения составили 1,21; 1,18; 1,07 и 1,08 для HO LA1/LA1 (37 °C, 30 минут), HO LA1/LA1 (22–25 °C, 30 минут), HO FSL/FS (37 °C, 30 минут) и HO FSL/FS (22–25 °C, 30 минут) соответственно. Различия в результатах в двух режимах размораживания образца не обнаружены.

Список литературы

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite anti-phospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295–306.

2. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2012; 157: 47–58.
3. CLSI. Laboratory testing for the lupus anticoagulant; approved guide. CLSI document H60-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
4. Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1737–40.
5. Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 163–71.
6. CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline. CLSI document H21-A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
7. CLSI. document; Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved Guideline. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
8. Moore GW, Kumano. Lupus anticoagulant assay cut-offs vary between reagents even when derived from a common set of normal donor plasmas. *J Thromb Haemost*, 2019. Oct 30.
9. Gardiner C, Mackie IJ, Malia RG, Jones DW, Winter M, Leeming D, Taberner DA, Machin SJ, Greaves M. The importance of locally derived reference ranges and standardized calculation of dilute Russell's viper venom time results in screening for lupus anticoagulant. *Br J Haematol* 2000; 111: 1230–1235.
10. Tripodi A, Chantarangkul V, Cini M, Devreese K, Dlott JS, Giacomello R, Gray E, Legnani C, Martinuzzo ME, Pradella P, Siegmund A, Subramanian S, Suchon P, Testa S. Variability of cut-off values for the detection of lupus anticoagulants. Results of an international multicenter multipoint study. *J Thromb Haemost* 2017; 15: 1180–1190.

Для цитирования: Пименов М.С., Васильев А.В., Садовников П.С., Ляшенко О.В., Севрук З.В., Копеева Л.Б., Скибо И.И., Вавилова Т.В. Определение порогового значения (cut-off) нормализованного отношения для определения волчаночного антикоагулянта на нормальной плазме доноров – здоровых добровольцев (результат исследования крупной сетевой лаборатории). *Медицинский алфавит*. 2020;(5):34–37. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-34-37>

For citation: Pimenov M.S., Vasilyev A.V., Sadovnikov P.S., Lyashenko O.V., Sevruk Z.V., Kopeeva L.B., Skibo I.I., Vavilova T.V. Determination of cut-off threshold of normalized ratio for determining lupus anticoagulant in normal plasma of donors – healthy volunteers (large network laboratory study results). *Medical alphabet*. 2020; (5):34–37. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-34-37>



Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием

Здание Правительства Москвы. Новый Арбат, 36
19-20 марта 2020 г.

www.mdb2020.ru ; www.expodata.info

Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020

Регистрация на сайте www.expodata.info **ОБЯЗАТЕЛЬНА!**
Документация по данному мероприятию будет представлена в Комиссию по оценке учебных мероприятий и материалов для НМО.

Оргкомитет конференции:
ООО «Экспо пресс», 129515,
Москва, ул. Ак. Королева, 13, оф. 806
Тел.: (495) 617-36-43/44; Факс: (495) 617-36-79
E-mail: lvov.m.g@inbox.ru; www.expodata.info

Организатор:
ФБУН Центральный НИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора

Соорганизатор:
СМД
ЦЕНТР
МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ

Технический
организатор:
