

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Чельдиева Ф.А.^{1,2}, Решетняк Т.М.^{1,2}, Черкасова М.В.¹, Ли́ла А.М.^{1,2}

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИФОСФОЛИПИДНЫХ АНТИТЕЛ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДАМИ У ПАЦИЕНТОВ С АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ И СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ)

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», лаборатория сосудистой ревматологии, 115522 Москва, Россия;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, кафедра ревматологии, 123995, Москва, Россия

Антифосфолипидные антитела (аФЛ) – это семейство различных аутоантител, которые приводят к рецидивирующим тромбозам сосудов любой локализации и калибра, и/или акушерской патологии – потере плода. К серологическим маркерам антифосфолипидного синдрома (АФС) отнесены только три вида аФЛ – волчаночный антикоагулянт (ВА), антитела к кардиолипину (аКЛ) классов IgG и IgM, антитела к β2-гликопротеину1 (аβ2ГП1) классов IgG и IgM. Средние и высокие уровни аКЛ и аβ2ГП1 (IgG и/или IgM) были выбраны в качестве серологических маркеров в АФС классификационных критериях 2006 г. Порог значений, используемый от низких до умеренных и высоких уровней не был стандартизирован. Вопросы стандартизации аФЛ до сих пор остаются нерешенными, что приводит к получению неоднородных результатов проводимых исследований. Целью исследования была оценка сопоставимости исследования IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-аβ2ГП1 иммуноферментным и хемилюминесцентным анализами у пациентов с АФС с системной красной волчанкой (СКВ) и без нее. Материалом для исследования служила периферическая кровь 70 пациентов (49 женщин и 21 мужчин) с АФС, из которых 21 (30%) – были с первичным АФС (пАФС) и 49 (70%) – с АФС в сочетании с СКВ. Всем участникам исследования проводилось определение IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-аβ2ГП1 методом иммуноферментного анализа. Методом хемилюминесцентного анализа было проведено исследование: IgG/IgM-аКЛ – у 70 пациентов; IgG/IgM-аβ2ГП1 – у 69 пациентов. Результаты предварительных данных таковы: определение IgG-аКЛ и IgG-аβ2ГП1 хемилюминесцентным анализом информативнее согласно уровням позитивности по данным фирмы-производителя, по сравнению с иммуноферментным анализом ($p < 0,05$). Однако, при учете уровней позитивности антител, определяемых по результатам иммуноферментного анализа, уровень положительных значений по данным хемилюминесцентного анализа был гораздо выше показателей фирмы-производителя.

Ключевые слова: антифосфолипидные антитела; антифосфолипидный синдром; системная красная волчанка; иммуноферментный анализ; хемилюминесцентный анализ; антитела к β2 гликопротеину 1; антитела к кардиолипину

Для цитирования: Чельдиева Ф.А., Решетняк Т.М., Черкасова М.В., Ли́ла А.М. Исследование антифосфолипидных антител иммуноферментным и хемилюминесцентным методами у пациентов с антифосфолипидным синдромом и системной красной волчанкой (предварительные данные). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 546-551. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-546-551>

Для корреспонденции: Решетняк Татьяна Магомедовна; д-р мед.наук, проф., зав. лаб. сосудистой ревматологии НИИР им. В.А. Насоновой, проф. каф. ревматологии РМАНПО; e-mail: t_reshetnyak@yahoo.com

Cheldieva F.A.^{1,2}, Reshetnyak T.M.^{1,2}, Cherkasova M.V.¹, Lila A.M.^{1,2}

STUDY OF ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODIES BY ENZYME IMMUNOASSAY AND CHEMILUMINESCENT METHODS IN PATIENTS WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (PRELIMINARY DATA)

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Laboratory of Vascular Rheumatology, 115522, Moscow, Russia;

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia, Department of Rheumatology, 123995, Moscow, Russia

Antiphospholipid antibodies (aPL) are a family of different autoantibodies that lead to recurrent vascular thrombosis of any localization and caliber, and/or obstetric pathology – fetal loss. Serological markers of antiphospholipid syndrome (APS) include only three types of aPL – lupus anticoagulant (VA), antibodies to cardiolipin (aCL) classes IgG and IgM, antibodies to β2-glycoprotein 1 (aβ2GPI) classes IgG and IgM. Medium and high levels of aCL and aβ2GPI (IgG and / or IgM) were selected as serological markers of APS in the 2006 classification criteria. However, the threshold of values used from low to moderately high levels has not been standardized. aPL standardization issues are still unresolved, resulting in heterogeneous results of the ongoing studies. The aim of the study was to assess the comparability IgG/IgM-aCL and IgG/IgM-aβ2GPI by enzyme-linked immunosorbent assay and chemiluminescent analysis in patients with APS with and without (systemic lupus erythematosus) SLE. The study included 70 patients (49 women and 21 men) with APS, of which 21 (30%) were with primary APS (pAPS) and 49 (70%) with APS in combination with SLE. All study participants underwent determination of IgG/IgM-aCL and IgG/IgM-aβ2GPI by enzyme-linked immunosorbent. A study was performed by the chemiluminescent analysis: IgG/IgM-aCL – in 70 patients; IgG/IgM-aβ2GPI – in 69 patients. Results. According to preliminary data, the determination of IgG-aCL and IgG-aβ2GPI by the chemiluminescent analysis is informative in assessing positivity according to the manufacturer, compared with the enzyme-linked immunosorbent ($p < 0.05$). However, when taking into account the levels of antibody positivity determined by enzyme-linked immunosorbent, the level of positive values according to chemiluminescent analysis was much higher than the performance of the manufacturer.

Key words: antiphospholipid antibodies; antiphospholipid syndrome; systemic lupus erythematosus; enzyme immunoassay; chemiluminescent analysis; antibodies to β2 glycoprotein 1; antibodies to cardiolipin

For citation: Cheldieva FA, Reshetnyak T.M., Cherkasova M.V., Lila A.M. Study of antiphospholipid antibodies by enzyme immunoassay and chemiluminescent methods in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus (preliminary data). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (9): 546-551. (in Russ.) <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-9-546-551>

For correspondence: *Reshetnyak T.M.*, MD, PhD, professor, head of the Laboratory of Vascular Rheumatology at the V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, professor of the Department of Rheumatology at the Russian Medical Academy of Postgraduate Education; e-mail: t_reshetnyak@yahoo.com

Information about authors:

Cheldieva F.A., <https://orcid.org/0000-0001-5217-4932>

Reshetnyak T.M., <https://orcid.org/0000-0003-3552-2522>

Cherkasova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-3246-1157>

Lila A.M., <https://orcid.org/0000-0002-6068-3080>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interests.*

Received 05.05.2021

Accepted 21.05.2021

Введение. Антифосфолипидные антитела (аФЛ) – это семейство различных аутоантител, которые взаимодействуют с фосфолипидными детерминантами клеточных мембран, фосфолипидно-белковыми комплексами, фосфолипид-связывающими белками, белками свертывающей системы [1]. Наличие этих антител ассоциируется с развитием определенного клинического симптомокомплекса, именуемого антифосфолипидным синдромом (АФС). АФС – аутоиммунная патология сосудов, клинически проявляющаяся рецидивирующими тромбозами сосудов любой локализации и калибра, и/или акушерской патологией – рецидивирующими потерями плода [2, 3]. К серологическим маркерам АФС, согласно Международным классификационным критериям [2], отнесены только три вида аФЛ, обнаруживаемые вместе или по отдельности – это волчаночный антикоагулянт (ВА), IgG и IgM антитела к кардиолипину (аКЛ), а также IgG и IgM антитела к β 2-гликопротеину1 (β 2ГП1). Для диагностики АФС уровень этих антител должен быть средне- и высокопозитивным в двух последовательных определениях с промежутком не менее 12 недель. Это позволяет исключить транзиторное их повышение на фоне инфекций.

Средние и высокие уровни аКЛ (IgG и / или IgM) ассоциированные с клиническими проявлениями АФС были выбраны в качестве серологических критериев в 2006 году [2]. Однако порог, используемый от низких до умеренных и высоких уровней не был стратифицирован [2], и, обычно, используемые в клинических условиях анализы, особенно иммуноферментный, не имеют стандартизированных наборов, что приводит к существенным различиям в оценке позитивности антител между различными лабораториями [4–7].

Хемилюминесцентный анализ был использован для тестирования аутоантител [8–10], а полностью автоматизированная панель анализа HemosIL AcuStar показала сходные характеристики с коммерческими наборами для иммуноферментного анализа [8]. F. Van Hoeske и соавт. [11] оценили уровни аКЛ и β 2ГП1 в автоматизированном хемилюминесцентном анализаторе для диагностики АФС и пришли к выводу, что хемилюминесцентный анализ сравним с иммуноферментным. Преимущества первого метода, по мнению авторов, в более простом (автоматизированном) использовании. S. Zhang и соавт. [12] установили, что хемилюминесцентный анализ показал хорошие результаты в измерении β 2ГП1 и аКЛ, особенно для выявления IgG- β 2ГП1, и может быть более чувствительным в лабораторной диагностике АФС.

Цель исследования – оценить сопоставимость исследования IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-ab2ГП1 иммуноферментным и хемилюминесцентным анализами у пациентов с АФС с системной красной волчанкой (СКВ) и без нее.

Материал и методы. В исследование были включены 70 пациентов (49 женщин и 21 мужчина) с АФС, из которых у 21 (30 %) пациентов был первичный АФС (пАФС) и у 49 (70%) – АФС в сочетании с СКВ. Характеристика пациентов приведена в табл. 1.

Критериями включения в исследование служили наличие информированного согласия пациента, достоверность диагноза АФС [2], пациенты с «вероятным» АФС (наличие позитивных аФЛ в сочетании с одним из признаков: тромбоцитопения, livedo reticularis, патология клапанного аппарата сердца и др.), а также пациенты с достоверным диагнозом СКВ (ACR, 1997 г.) [13]. Критерии исключения: выраженная хроническая сердечно-легочная недостаточность, хроническая болезнь почек V стадии, печеночная недостаточность декомпенсированная, хронические инфекции, способные привести к органной недостаточности, онкологические заболевания.

Всем пациентам проводилось определение IgG/IgM-аКЛ, IgG/IgM- β 2ГП1 методом иммуноферментного анализа на автоматическом анализаторе для лабораторной диагностики аутоиммунных заболеваний Alegria (фирма «Orgentec Diagnostika GmbH», Германия) с набором реагентов для определения антител фирмы Orgentec Diagnostika GmbH (Германия). IgG-аКЛ измерялись в фосфолипидсвязывающей активности IgG-аКЛ на 1 мкг/мл в единицах GPL (IgG phospholipid binding units (GPL Ед/мл), а IgM-аКЛ – в фосфолипидсвязывающей активности IgM-аКЛ на 1 мкг/мл в MPL (IgM phospholipid binding units (MPL Ед/мл). IgG/IgM-ab2ГП1 измеряли в Ед/мл. Уровни позитивности для IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-ab2ГП1 приведены в табл. 2.

Методом хемилюминесцентного анализа было проведено исследование IgG/IgM-аКЛ у 70 пациентов, IgG/IgM- β 2ГП1 – у 69 пациентов. Хемилюминесцентный анализ проводили на автоматизированном хемилюминесцентном анализаторе BioFlash (фирма «Biokit S.A.», Испания). Набор реагентов для определения IgG/IgM-ab2ГП1 и IgG/IgM-аКЛ – AcuStar, Испания. Все антитела, определяемые хемилюминесцентным анализом, измерялись в относительных световых единицах (relative light units – RLU). Позитивными, согласно фирме изготовителя, считались уровни ≥ 20 RLU для IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-ab2ГП1.

Таблица 1

Характеристика пациентов, включенных в исследование

Параметры	IgG/IgM-aКЛ, n=70	IgG/IgM-aβ2ГП1, n=69
Возраст, годы (M ± SD)	38,8 ± 9,6	38,8 ± 9,6
Число пациентов с СКВ+АФС / пАФС	48 / 22	48 / 21
Продолжительность АФС, Ме [25-75%], годы	9,9 [3,5-16,0]	9,9 [3,2-16,5]
Продолжительность СКВ, Ме [25-75%], годы	10,0 [3,8-20,0]	10,9 [3,4-20,2]
Пол: жен./муж., абс. (%)	49/21	48/21
Тромбоз в анамнезе, абс. (%)	Венозный	21 (30)
	Артериальный	17 (24)
	Сочетанный	16 (23)
Акушерская патология*, абс. (%)	26/20 (77)	25/20 (80)
Преднизолон, абс. (%)	38 (54)	38 (55)
Антикоагулянты, абс. (%)	НМГ	12 (17)
	Варфарин	15 (21)
	ПОАК	25 (36)
	Без а/к терапии	18 (26)
Низкие дозы ацетилсалициловой кислоты, абс. (%)	25 (36)	25 (36)
Гидроксихлорохин, абс. (%)	55 (79)	54 (78)

Примечание. SD – стандартное отклонение, Ме – медиана и в квадратных скобках дан интерквартильный 25%-75% разброс, НМГ – низкомолекулярные гепарины, ПОАК – пероральные антикоагулянты. * – акушерская патология рассчитана из числа женщин, имевших беременность на фоне заболевания, процент указан из числа женщин, имевших беременность на фоне заболевания. В числителе – число женщин, имевших беременность на фоне заболевания, в знаменателе – число женщин с акушерской патологией.

Таблица 2

Границы степеней позитивности при оценке результатов определения aКЛ и ab2ГП1 [14]

Степень позитивности	aКЛ		ab2ГП1	
	IgG-aКЛ (GPL)	IgM-aКЛ (MPL)	IgG-ab2ГП1, Ед/мл	IgM-ab2ГП1, Ед/мл
Высокопозитивные	≥ 65,0	≥ 45,0	≥ 60,0	≥ 60,0
Среднепозитивные	35,0-65,0	35,0-45,0	30,0-60,0	30,0-60,0
Низкопозитивные	25,0-35,0	24,7-35,0	15,3-30,0	17,0-30,0
Негативные	< 25,0	< 24,7	< 15,3	< 17,0

Примечание. aКЛ – антитела к кардиолипину, ab2ГП1 – антитела к β2-гликопротеину 1.

Статистический анализ результатов исследований проводился с использованием программ Statistica и Epi Info. Применялись методы описательной статистики и непараметрические методы. Статистическая значимость показателей была определена с вероятностью ложноположительных результатов $p < 0,05$. При описании центральных моментов количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, использовались среднее значение (M) и среднеквадратичное отклонение (SD), при описании признаков, не имеющих нормального распределения, применялись медиана (Me) и интерквартильный размах [между 25-й и 75-й перцентильями]. При сравнении по количественному признаку двух независимых групп использовались критерии Манна-Уитни. Качественные показатели в 2-х несвязанных группах сравнивались в таблице сопряженности 2x2 с помощью теста χ^2 . При количестве наблюдений менее 5 достоверность (P) оценивалась в программе Statistica и указывалась с поправкой по Йетесу. При количестве наблюдений более 5, статистическая обработка данных производилась в программе Epi Info, χ^2 оценивался при достоверном p , указывалось отношение шансов с 95% доверительным интервалом.

Результаты. У 50 (71%) из 70 пациентов выявлялись позитивные IgG-aКЛ при исследовании методом иммуноферментного анализа и у 61 (87%) – методом хемиллюминесцентного анализа (табл. 3). Преобладало число пациентов с высоко-позитивными уровнями IgG-aКЛ по

результатам иммуноферментного анализа, медиана этих антител по данным хемиллюминесцентного анализа составила 704,8 [461,9-2024,0]. Уровни антител при исследовании хемиллюминесцентным методом были разделены на высокопозитивные, среднепозитивные и низкопозитивные в соответствии их степени позитивности по данным иммуноферментного анализа. Высокопозитивные уровни в хемиллюминесцентном анализе, соответствовавшие высокопозитивным значениям в иммуноферментном, были достоверно выше по сравнению со значениями средних уровней по данным хемиллюминесцентного анализа ($p = 0,009$). Среднепозитивные и низкопозитивные уровни IgG-aКЛ хемиллюминесцентным анализом между собой не различались. У 15 пациентов отмечалось расхождение в уровнях IgG-aКЛ по данным обоих методов определения: 13 из них с отрицательными уровнями IgG-aКЛ по результатам иммуноферментного анализа имели позитивные значения по данным хемиллюминесцентного анализа, и их медиана составила 100,2 RLU [38,1-183,4]. По градации фирмы-изготовителя они соответствовали позитивности (>20 RLU) по этим антителам, однако по градации по уровням позитивности в соответствии со значениями в иммуноферментном анализе у 5 пациентов из этих 13 выявлялись уровни IgG-aКЛ выше 108,0 RLU, что соответствовало низко-позитивным уровням по данным иммуноферментного анализа. Медиана низкопозитивных уровней IgG-aКЛ методом хемиллюминесцентного анализа составила 294,5 [108,7-480,4]. Восемь из 13 пациентов с

отрицательными уровнями IgG-аКЛ по результатам иммуноферментного анализа при исследовании хемиллюминесцентным анализом имели уровни этих антител менее 108,0 RLU. Два пациента в иммуноферментном анализе имели высокопозитивные уровни IgG-аКЛ (>120 GPL), которые были отрицательными в хемиллюминесцентном методе.

Позитивные уровни IgM-аКЛ были зарегистрированы у 19 (27%) из 70 пациентов иммуноферментным анализом и у 22 (31%) – хемиллюминесцентным. Значения IgM-аКЛ в хемиллюминесцентном анализе, в соответствии с уровнями позитивности по данным иммуноферментного метода, между собой не различались, несмотря на высокопозитивные значения IgM-аКЛ в хемиллюминесцентном анализе – 190,1 [20,3-248,1] RLU (табл. 3). Как видно из табл. 3, медиана низкопозитивных значений в хемиллюминесцентном анализе была 24,5 [22,4-26,7] RLU, чуть выше позитивных значений по данным фирмы-изготовителя. У 13 пациентов отмечалось расхождение в уровнях IgM-аКЛ по данным обоих методов исследования. У 8 пациентов, IgM-аКЛ отрицательных по результатам иммуноферментного анализа, отмечались позитивные уровни в хемиллюминесцентном анализе. У двух из них уровни IgM-аКЛ были ≥ 50 RLU, у оставшихся 6 они колебались в пределах 22,0 – 33,2 RLU. У 3 из 5 пациентов с отрицательными IgM-аКЛ в хемиллюминесцентном анализе эти показатели в иммуноферментном анализе были выше 100,0 MPL и соответствовали высокопозитивным уровням. У оставшихся двух – уровни IgM-аКЛ в иммуноферментном анализе составили 49,8 и 30,6 MPL соответственно.

IgG-а β 2ГП1 были выявлены у 56 (80%) из 69 пациентов в иммуноферментном анализе и у 64 (93%) – в хемиллюминесцентном анализе (см. табл. 3). Высокопозитивные уровни IgG-а β 2ГП1 были у 38 (68%) из 56 позитивных пациентов по результатам иммуноферментного анализа. Медиана высокопозитивных, среднепозитивных и низкопозитивных значений IgG-а β 2ГП1 хемиллюминесцентным анализом была 190,1 [20,3-248,1] и 43,5 [4,5-82,5], 24,5 [22,4-26,7], соответственно. Медиана высокопозитивных уровней IgG-а β 2ГП1 в хемиллюминесцентном анализе у этих пациентов была достоверно выше по сравнению с низкопозитивными уровнями ($p = 0,001$), а среднепозитивные уровни были выше по сравнению с низкопозитивными уровнями ($p = 0,005$). Высокопозитивные и среднепозитивные значения IgG-а β 2ГП1 между собой в хемиллюминесцентном анализе были сопоставимы. У 11 пациентов отмечалось расхождение в уровнях IgG-а β 2ГП1 при исследовании обоими методами определения. У 10 пациентов IgG-а β 2ГП1 отрицательных в иммуноферментном анализе регистрировались позитивные уровни в хемиллюминесцентном анализе согласно значениям фирмы-изготовителя, но уровень IgG-а β 2ГП1 только у одного (830,1 RLU) из них превышал 420,4 RLU (значение, соответствующее низкопозитивному уровню в иммуноферментном анализе). У 7 из этих 10 пациентов значения IgG-а β 2ГП1 колебались в пределах 27,7 – 189,8 RLU (значения соответствовали отрицательным уровням в иммуноферментном анализе) и у оставшихся двоих – они составили 211,8 и 356 RLU, которые так же были отрицательными в иммуноферментном анализе. У 1 пациента с негативными уровнями IgG-а β 2ГП1 в хемиллюминесцентном методе они в иммуноферментном были 100 Ед/мл, что соответствовало высокопозитивному уровню по результатам иммуноферментного анализа.

Позитивные уровни IgM-а β 2ГП1 были зарегистрированы у 18 (26%) пациентов и у 17 (25%) из 69 пациентов при определении иммуноферментным и хемиллюминесцентным анализами соответственно. Высокопозитивные уровни в иммуноферментном анализе были выявлены у 9 (50%) из 18 больных, их медиана в хемиллюминесцентном анализе была достоверно выше по сравнению с медианой низкопозитивных уровней ($p=0,003$) и по сравнению с медианой среднепозитивных уровней ($p=0,02$) (табл. 3). Среднепозитивные и низкопозитивные уровни IgM-а β 2ГП1 по данным хемиллюминесцентного анализа между собой не различались. У 9 пациентов отмечалось расхождение в уровнях IgM-а β 2ГП1 по результатам обоих методов определения. У 4 пациентов, IgM-а β 2ГП1 отрицательных в иммуноферментном анализе, отмечались позитивные уровни в хемиллюминесцентном анализе и колебались от 31,1 RLU до 61 RLU. У 5 пациентов с отрицательными значениями IgM-а β 2ГП1 хемиллюминесцентным анализом, значения этих антител в иммуноферментном анализе были позитивными и колебались от 18,2 до 54,9 Ед/мл. Отрицательные уровни IgM-а β 2ГП1 в хемиллюминесцентном анализе у 2 из этих 5 пациентов соответствовали среднепозитивным значениям в иммуноферментном анализе.

Обсуждение. В настоящее время определено более 30 различных аФЛ, некоторые из которых непосредственно связываются с отрицательно заряженными фосфолипидами (например, фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин), а другие реагируют с фосфолипидсвязывающими белками (например, отдельные домены β 2ГП1, протромбина, аннексина-V) [15, 16]. Исторически иммуноферментный анализ был ведущим методом определения аФЛ к β 2-гликопротеину 1 (β 2GPI) и его комплексу с кардиолипином (КЛ) из-за специфических иммунохимических свойств полистироловой поверхности в качестве твердой фазы для адсорбции основных аутоантигенов [17]. Альтернативой иммуноферментного анализа является автоматизированный хемиллюминесцентный метод с рядом преимуществ: высокий уровень автоматизации, что потенциально может привести к улучшению воспроизводимости и снижению межлабораторных вариаций [11, 18, 19]. Системы хемиллюминесцентного анализа сокращают время ручного труда по сравнению с трудоемкими системами иммуноферментного анализа. Тестирование хемиллюминесцентным анализом основано на двухфазном методе иммуноанализа: вначале специфические антитела, присутствующие в образце, связываются с твердой фазой, содержащей магнитные частицы, покрытые антигеном, а затем, после добавления реагентов, запускающих реакцию хемиллюминесценции, излучаемый свет детектируется оптической системой. Результаты обычно представляются в RLU, которые прямо пропорциональны концентрации аФЛ в образце [11, 20, 21]. По данным литературы хемиллюминесцентный анализ имеет более низкую чувствительность в целом, по сравнению с иммуноферментным, но более специфичен, чем иммуноферментный анализ для идентификации пациентов с АФС [8]. Это связано с тем, что системы хемиллюминесцентного анализа отличаются от систем иммуноферментного анализа наличием антигенных и фосфолипид-протеиновых комплексов на магнитных частицах, а не на поверхности микротитровальных углублений. Важным является связывание β 2GPI с твердой фазой, поскольку это связывание влияет как на плотность антигена, так и на ориентацию и конформацию белка. Системы покрытий, используемые методом хемиллюминесцентно-

Частота положительных значений IgG/IgM-аКЛ, IgG/IgM-аβ2ГП1 в иммуноферментном и хемилюминесцентном анализах

Показатель	ИФА		ХМА		χ ² ; p
	Число позитивных пациентов, n (%)	Уровни позитивности в GPL/MPL Ме [25-75%]	Число позитивных пациентов, n (%)	Уровни позитивности в RLU Ме [25-75%]	
IgG-аКЛ, n = 70	50 (71)	109,0 [67,1-120,0]	61 (87)	480,4 [205,0-1810,8]	5,2; 0,02
Низкопозитивные	2 (4)	30,2 [28,9-31,5]		294,5 [108,7-480,4]	
Среднепозитивные	10 (20)	48,5 [43,6-50,7]		316,9 [205,0-386,5]	
Высокопозитивные	38 (76)	120,0 [90,1-120,0]		704,8 [461,9-2024,0]*	
IgM-аКЛ, n = 70	19 (27)	66,8 [49,7-80,0]	22 (31)	67,6 [30,1-236,0]	НД; 0,6
Низкопозитивные	2 (10,5)	25,7 [24,9-26,5]		24,5 [22,4-26,7]	
Среднепозитивные	2 (10,5)	36,0 [30,6-41,5]		43,5 [4,5-82,5]	
Высокопозитивные	15 (79)	80,0 [30,1-82,4]		190,1 [20,3-248,1]	
IgG-аβ2ГП1, n = 69	56 (80)	100,0 [52,3-100,0]	64 (93)	1733,1 [529,3-6100,0]	4,0; 0,04
Низкопозитивные	6 (11)	24,0 [21,1-27,9]		529,3 [420,4-705,9]	
Среднепозитивные	12 (21)	45,0 [40,8-52,3]		1726,2 [1214,4-2093,5]***	
Высокопозитивные	38 (68)	100,0 [100,0-100,0]		3117,6 [1043,4-6100,0]**	
IgM-аβ2ГП1, n = 69	18 (26)	58,5 [27,2-98,8]	17 (25)	144,5 [64,1-194,3]	НД; 0,8
Низкопозитивные	5 (28)	26,0 [25,0-26,8]		15,5 [10,2-64,1]	
Среднепозитивные	4 (22)	46,0 [39,0-52,9]		42,6 [4,7-117,8]	
Высокопозитивные	9 (50)	98,8 [88,3-100,0]		194,3 [152,3-258,2]****	
IgG+IgM-аКЛ	13 (19)		20 (29)		НД; 0,2
IgG+IgM-аβ2ГП1	17 (24)		15 (21)		НД; 0,7

Примечание. ИФА – иммуноферментный анализ, ХМА – хемилюминесцентный анализ, аКЛ – антитела к кардиолипину, аβ2ГП1 – антитела к β2-гликопротеину 1, Ме – медиана, [25%-75%] – интерквартильный размах, p – сравнение частоты встречаемости по таблице сопряженности; НД – не достоверно; *p = 0,009 по сравнению со среднепозитивными уровнями в ХМА; **p = 0,008 по сравнению с низкопозитивными уровнями в ХМА; ***p = 0,005 по сравнению с низкопозитивными уровнями в ХМА; ****p = 0,003 по сравнению с низкопозитивными уровнями в ХМА и p=0,03 по сравнению со среднепозитивными уровнями в ХМА.

го анализа, обеспечивают принципиальную разницу по сравнению с иммуноферментным анализом, и вместе с реакцией амплификации по хемилюминесцентному принципу объясняют значительно более высокие уровни аФЛ (особенно аКЛ), которые выявляются с помощью автоматизированных систем. Таким образом, в диагностике АФС хемилюминесцентные анализаторы демонстрируют чувствительность, достигающую 100% при специфичности составляющей 72,3% [22]. По данным К. Оку и соавт., исследование аФЛ хемилюминесцентным анализом является более полным (так как этим методом помимо стандартных аФЛ исследуются также антитела как: IgA-аКЛ, IgM-аβ2ГП1, антитела к домену I β2ГП1), быстрым и менее трудоемким процессом [23]. Проанализировав чувствительность и специфичность IgG/IgM-аКЛ и IgM-аβ2ГП1, авторы пришли к выводу, что эти характеристики схожи в обоих методах исследования. По данным исследования А. Carozzi и соавт. [24], проведенного на 314 пациентах, было выявлено, что определение аКЛ хемилюминесцентным и иммуноферментным анализами не отличалось. Напротив, у 30,13% пациентов с отрицательным ВА, отрицательными аβ2ГП1 и положительными аКЛ по данным иммуноферментного анализа, значения аβ2ГП1 были положительными в хемилюминесцентном анализе. По результатам нашей работы, позитивные значения IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-аβ2ГП1 антител (см. табл. 2) выше в хемилюминесцентном методе, по сравнению с уровнями антител в иммуноферментном анализе. Однако, по литературным данным, не проводилось сопоставление уровней позитивности антител по данным обоих методов исследования. В нашей работе при проведении оценки уровней позитивности (низко-, средне- и высокопозитивные) в иммуноферментном анализе и при сопоставлении их с уровнями в хеми-

люминесцентном анализе было выявлено, что данные фирмы-производителя, а именно позитивные значения (>20 RLU), не соответствуют уровням позитивности антител, определяемых иммуноферментным анализом. Медиана низко-позитивных значений IgG-аКЛ при оценке хемилюминесцентным анализом составила 294,5 RLU с разбросом от 108,7 до 480,4 RLU, что соответствовало отрицательным значениям по градации на уровни позитивности в иммуноферментном методе. При анализе 13 пациентов с IgG-аКЛ в хемилюминесцентном анализе (по уровню фирмы-изготовителя > 20 RLU), которые были негативными в иммуноферментном анализе, у 8 пациентов значения IgG-аКЛ были ниже нижней границы (< 108,7 RLU) в соответствии с градацией позитивности в иммуноферментного анализа. И только у 5 из 13 пациентов уровни IgG-аКЛ были выше 108,7 RLU.

Кроме несоответствия уровней позитивности в обоих методах исследования выявлено большое количество расхождений при сопоставлении хемилюминесцентного с иммуноферментным анализом по позитивным значениям. Так, у 2 IgG-аКЛ отрицательных пациентов в хемилюминесцентном анализе их уровни в иммуноферментном анализе соответствовал высокопозитивным уровням. У 3 из 5 пациентов с IgM-аКЛ отрицательными в хемилюминесцентном анализе в иммуноферментном анализе их уровень был высокопозитивным (более 100,0 MPL), у двух из этих 5 пациентов – среднепозитивным. У одного пациента отрицательного по IgG-аβ2ГП1 в хемилюминесцентном анализе в иммуноферментном анализе уровень составил 100 Ед/мл, что соответствовало высокопозитивным значениям. У 2 из 5 пациентов с отрицательным значением IgM-аβ2ГП1 в хемилюминесцентном анализе эти антитела в иммуноферментном анализе отмечались в среднепозитивных уровнях, у 3 из 5 – в низкопозитивных.

На результаты значений аКЛ и аβ2ГП1 при исследовании иммуноферментным анализом могут влиять множество факторов: свойства стандартных и контрольных сывороток (специфичность, avidность, стабильность), технология иммуноферментного анализа, аналитические характеристики используемых тест-систем, способ построения калибровочной кривой для количественной оценки полученных данных, наличие интеркуррентной инфекции и др. [14].

Наша работа является предварительной и приведены описательные методы статистики, без анализа отрицательной и положительной предсказательной ценности, а также ROC-кривых.

Заключение. Таким образом, наши предварительные результаты по сопоставимости двух методов исследования аФЛ (аКЛ и аβ2ГП1) показали, что при оценке позитивности по данным фирмы-производителя (> 20 RLU) определение IgG-аКЛ и IgG-аβ2ГП1 методом хемилуминесцентного анализа информативнее, чем иммуноферментным анализом ($p < 0,05$), что согласуется с литературными данными [11, 12, 21, 22-24]. Но при учете уровней позитивности по данным иммуноферментного анализа, уровень положительных значений по результатам хемилуминесцентного анализа был гораздо выше показателей фирмы-производителя, что указывает на необходимость дальнейшего исследования и набора контроля для вычисления уровней позитивности IgG/IgM-аКЛ и IgG/IgM-аβ2ГП1 методом хемилуминесцентного анализа.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках темы ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой «Разработка методов персонализированной терапии ревматических заболеваний с коморбидной патологией» (AAAA-A19-119021190151-3, 0514-2019-0020).

ЛИТЕРАТУРА (pp. 2-13, 15, 16, 18, 20-24
см. REFERENCES)

1. Решетняк Т.М. Антифосфолипидный синдром: диагностика и клинические проявления (лекция). *Научно-практическая ревматология*. 2014;52(1):56-71.
3. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром. Монография. Москва: Литтера; 2004.
14. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Решетняк Т.М., Ключкина Н.Г., Решетняк Д.В., Насонов Е.Л. и соавт. Антитела к β2-гликопротеину I и антитела к кардиолипину при антифосфолипидном синдроме: анализ чувствительности и специфичности. *Клиническая медицина*. 2003;9: 25-31.
17. Волкова М.В., Кундер Е.В., Генералов И.И., Роггенбук Д. Антифосфолипидные антитела: современные представления о патогенетическом действии и лабораторной диагностике. *Вестник ВГМУ*. 2015;3: 6-15.
19. Ткаченко О.Ю., Лапин С.В., Лазарева Н.М., Шмонин А.А., Соловьева Л.Н., Бондарева Е.А. и соавт. Сравнительный анализ информативности тест-систем разных производителей для определения антифосфолипидных антител для диагностики антифосфолипидного синдрома. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;62(1): 40-4.

REFERENCES

1. Reshetnyak T.M. Antiphospholipid syndrome: diagnosis and clinical manifestation (a lecture). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014;52(1): 56-71. (in Russian)
2. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.* 2006;4(2):295-306.
3. Nasonov E.L. Antiphospholipid syndrome [Antifosfolipidnyi sindrom. Monografiya]. Moscow: Littera; 2004. (in Russian)
4. Devreese K.M. Standardization of antiphospholipid antibody assays. Where do we stand? *Lupus*. 2012;21:718-21.

5. Ruffatti A., Olivieri S., Tonello M., Bortolati M., Bison E., Salvan E. et al. Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J. Thromb. Haemost.* 2008;6:1693-6.
6. Forastiero R., Papalardo E., Watkins M., Nguyen H., Quirbach C., Jaskal K. et al. Evaluation of different immunoassays for the detection of antiphospholipid antibodies: Report of a wet workshop during the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin. Chim. Acta*. 2014;428: 99-105.
7. Reber G., Boehlen F., de Moerloose P. Technical aspects in laboratory testing for antiphospholipid antibodies: is standardization an impossible dream? *Semin. Thromb. Hemost.* 2008;34(4): 340-6.
8. De Moerloose P., Reber G., Musial J., Arnout J. Analytical and clinical performance of a new, automated assay panel for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(7):1540-6.
9. Chung Y., Kim J.E., Lim H.S., Kim H.K. Clinical performance of anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibodies using a new automated chemiluminescent assay: Superior thrombotic prediction of combined results measured by two different methods. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2014;25:10-5.
10. Meneghel L., Ruffatti A., Gavasso S., Tonello M., Mattia E., Spiezia L. et al. The clinical performance of a chemiluminescent immunoassay in detecting anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibodies. A comparison with a homemade ELISA method. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015;53:1083-9.
11. Van Hoeske F., Persijn L., Decavele A-S., Devreese K. Performance of two new, automated chemiluminescence assay panels for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Int. J. Lab. Hematol.* 2012;34(6): 630-40.
12. Zhang S., Wu Z., Li P., Bai Y., Zhang F., Li Y. Evaluation of the clinical performance of a novel chemiluminescent immunoassay for detection of anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Medicine*. 2015;94:e2059.
13. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*. 1997;40(9):1725.
14. Alexandrova E.N., Novikov A.A., Reshetnyak T.M., Klukvina N.G., Reshetnyak D.V., Nasonov E.L. et al. Antibodies to beta2-glycoprotein I and antibodies to cardiolipin in antiphospholipid syndrome: sensitivity and specificity analysis. *Klinicheskaya meditsina*. 2003;9: 25-31. (in Russian)
15. Volkov I., Seguro L., Leon E.P., Kovacs L., Roggenbuck D., Schierack P. et al. Profiles of criteria and non-criteria antiphospholipid autoantibodies are associated with clinical phenotypes of the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun. Highlights*. 15;11(1): 8.
16. Mekinian A., Bourrienne M.C., Carbillon L., Benbara A., Noemie A., Chollet-Martin S. et al. Non-conventional antiphospholipid antibodies in patients with clinical obstetrical APS: prevalence and treatment efficacy in pregnancies. *Semin. Arthritis Rheum*. 2016;46(2): 232-7.
17. Volkova M.V., Kunder E.V., Generalov A.I., Roggenbuk D. Antiphospholipid antibodies: modern ideas about pathogenetic action and laboratory diagnosis. *Vestnik VGMU*. 2015;3:6-15. (in Russian)
18. Devreese K., Hoylaerts M.F. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome. *Eur. J. Haematol*. 2009;83(1):1-16.
19. Tkachenko O.Y., Lapin S.V., Lazareva N.M., Shmonin A.A., Solovieva L.N., Bondareva E.A. et al. Comparative analysis of the informativeness of test systems from different manufacturers to determine antiphospholipid antibodies for diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017;62(1):40-4. (in Russian)
20. Sciascia S., Amigo M-C., Roccatello D., Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2017;13(9): 548-60.
21. Persijn L., Decavele A-S., Schouwers S., Devreese K. Evaluation of a new set of automated chemiluminescence assays for anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in the laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Res*. 2011;128(6): 565-9.
22. Noubouossie D., Valsamis J., Corazza F., Rozen L., Debaugnies F., Demulder A. An automated chemiluminescence immunoassay may detect mostly relevant IgG anticardiolipin antibodies according to revised Sydney criteria. *Acta Clin. Belg.* 2012;67(3):184-9.
23. Oku K., Amengual O., Kato M., Bohgaki T., Horita T., Yasuda S. et al. Significance of fully automated tests for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thrombosis Research*. 2016;146:1-6.
24. Capozzi A., Lococo E., Grasso M., Longo A., Garofalo T., Misasi R. et al. Detection of antiphospholipid antibodies by automated chemiluminescence assay. *J. Immunol. Methods*. 2012;379(1-2): 48-52.