

ISSN 2313-7347 (print)

ISSN 2500-3194 (online)

АКУШЕРСТВО ГИНЕКОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИЯ

Включен в перечень ведущих
рецензируемых журналов и изданий ВАК

2024 • том 18 • № 2



OBSTETRICS, GYNECOLOGY AND REPRODUCTION

2024 Vol. 18 No 2

<https://gynecology.su>

Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта <http://www.gynecology.su>. Не предназначено для использования в коммерческих целях. Информацию о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru.



Частота обнаружения и длительность циркуляции маркеров антифосфолипидного синдрома у пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19

Ю.В. Михайлова, Н.В. Чепурченко, А.П. Обрядина

ООО «НПО «Диагностические системы»; Россия, 603093 Нижний Новгород, ул. Яблонева, д. 22 (а/я 69)

Для контактов: Юлия Владимировна Михайлова, e-mail: mikhailovauv@npods.ru

Резюме

Цель: разработать иммуноферментные тесты для определения маркеров антифосфолипидного синдрома (АФС) и определить частоту обнаружения трех типов антифосфолипидных антител (аФЛ) у пациентов с COVID-19 на разных стадиях заболевания.

Материалы и методы. Проведено сравнительное продольное контролируемое исследование, обследованы 120 человек с диагнозом COVID-19, подтвержденным с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. В качестве контрольной группы использовали образцы сыворотки крови доноров, собранные до ноября 2019 г. Лабораторное исследование включало определение IgA, IgM и IgG к кардиолипину, β_2 -гликопротеину 1 (англ. β_2 -glycoprotein 1, β_2 -GP1), фосфатидилсерин-протромбиновому комплексу (англ. phosphatidylserine-prothrombin complex, PS-PT) с использованием тест-систем отечественного производства на основе непрямого двухстадийного иммуноферментного анализа.

Результаты. Валидация разработанных экспериментальных тестов проведена в сравнении с коммерческими аналогами зарубежного производства и относительно международных стандартов. Изучены альтернативные антигенные мишени для эффективной диагностики антител к β_2 -GP1. Анализ частоты обнаружения аФЛ у пациентов на разных стадиях COVID-19 показал, что аутоантитела среди пациентов в острой фазе встречались в 1,3 раза чаще, чем в стадии реконвалесценции (81,7 и 65,0 % соответственно). Первое ранговое место по частоте обнаружения занимали IgG к β_2 -GP1, кардиолипину и PS-PT, второе – IgM к кардиолипину. Профиль выявляемых аФЛ изменялся в зависимости от стадии заболевания и времени, прошедшего от момента постановки диагноза.

Заключение. Созданы рекомбинантные конструкции и оптимизированы условия проведения анализа для определения различных типов аФЛ. Показано, что наравне с другими вирусными инфекциями COVID-19 является триггером выработки аутоантител. У 54,2 % лиц, инфицированных SARS-CoV-2, обнаруживался как минимум один тип аутоантител. Большинство из этих вирус-ассоциированных аФЛ предположительно являются транзиторно позитивными.

Ключевые слова: антифосфолипидные антитела, аФЛ, COVID-19, антифосфолипидный синдром, АФС, антитела к β_2 -гликопротеину 1, $\alpha\beta_2$ -GP1, антитела к кардиолипину, aCL, антитела к фосфатидилсерин-протромбиновому комплексу, aPS-PT

Для цитирования: Михайлова Ю.В., Чепурченко Н.В., Обрядина А.П. Частота обнаружения и длительность циркуляции маркеров антифосфолипидного синдрома у пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19. *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. 2024;18(2):180–187. <https://doi.org/10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2024.504>.

Detection frequency and duration of circulating antiphospholipid syndrome markers in patients with verified COVID-19

Yulia V. Mikhailova, Natalia V. Chepurchenko, Anna P. Obriadina

RPC Diagnostic Systems Ltd; 22 Yablonevaya Str., Nizhny Novgorod 603093, Russia

Corresponding author: Yulia V. Mikhailova, e-mail: mikhailovauv@npods.ru

Abstract

Aim: to develop enzyme-linked immunosorbent tests for assessing the antiphospholipid syndrome (APS) markers and determine prevalence of three antiphospholipid antibody (aPL) types at different COVID-19 stages.

Materials and Methods. A comparative longitudinal controlled study was conducted by examining 120 subjects with COVID-19 diagnosis verified by reverse transcription polymerase chain reaction. Donor serum samples collected before November 2019 were used as a control group. The laboratory study included measurement of IgA, IgM and IgG against β_2 -glycoprotein 1 (β_2 -GP1), cardiolipin, phosphatidylserine-prothrombin complex (PS-PT) by using domestically produced test systems based on indirect two-step enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. Validation of the developed experimental tests was carried out in comparison with foreign commercial analogues in accordance with international standards. Alternative antigenic targets for effective diagnosis of antibodies against β_2 -GP1 were studied. Analyzing rate of aPL in patients at different COVID-19 stages showed that in acute vs. convalescence stage it was higher by 1.3-fold (81.7 and 65.0 %, respectively). The first rank detection place was assigned to IgG against β_2 -GP1, cardiolipin and PS-PT, the second – IgM against cardiolipin. The profile of the detected antibodies changed at various COVID-19 stages driven by time frame elapsed from the moment of diagnosis.

Conclusion. Recombinant constructs are created and analytical conditions are optimized for determining various aPL types. It was shown that along with other viral infections, COVID-19 triggers autoantibody production demonstrating that 54.2 % individuals infected with SARS-CoV-2 were positive at least for one autoantibody type. The majority of such virus-associated aPL are presumably transiently positive.

Keywords: antiphospholipid antibodies, aPL, COVID-19, antiphospholipid syndrome, APS, anti- β_2 -glycoprotein 1 antibodies, a β_2 -GP1, anticardiolipin antibodies, aCL, anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies, aPS-PT

For citation: Mikhailova Yu.V., Chepurchenko N.V., Obriadina A.P. Detection frequency and duration of circulating antiphospholipid syndrome markers in patients with verified COVID-19. *Akusherstvo, Ginekologia i Reprodukcija = Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. 2024;18(2):180–187. (In Russ.). <https://doi.org/10.17749/2313-7347/ob.gyn.rep.2024.504>.

Основные моменты

Что уже известно об этой теме?

- ▶ Ряд инфекционных заболеваний служит триггером для формирования аутоиммунной патологии, а аутоантитела, в свою очередь, вызывают развитие тромбозов, увеличивая тяжесть заболевания.
- ▶ Учитывая значительное сходство иммунных механизмов развития тромбоза между антифосфолипидным синдромом (АФС) и COVID-19, ряд авторов связывают склонность к тромбообразованию при новой коронавирусной инфекции с наличием антифосфолипидных антител (аФЛ).
- ▶ В условиях импортозамещения остро стоял вопрос создания отечественных тестов для диагностики маркеров АФС.

Что нового дает статья?

- ▶ Выявлена высокая встречаемость аФЛ у пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 в острой фазе и ранее не имевших в анамнезе АФС.
- ▶ Впервые оценены изменения в спектре выявляемых аФЛ и длительность циркуляции на протяжении 9 мес от момента постановки диагноза.

Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?

- ▶ Патогенная природа аФЛ, связанных с COVID-19, требует пристального изучения как фактора отсроченного тромбообразования в постковидный период.
- ▶ Некритериальные аФЛ, такие как антитела к фосфатидилсерин-протромбиновому комплексу, могут быть более распространены, чем критериальные, поэтому следует рассмотреть вопрос включения их в скрининг лабораторных маркеров АФС у ковидных больных.
- ▶ Компания ООО «НПО «Диагностические системы» является первым отечественным производителем ИФА-тестов для обнаружения маркеров АФС. Разработанные диагностикумы успешно прошли клинические испытания, имеют подтвержденные высокие аналитические характеристики, что может свидетельствовать о высокой степени достоверности полученных с их использованием результатов анализов в таком сложном направлении лабораторной диагностики, как аутоиммунная патология.

Highlights

What is already known about this subject?

- ▶ Some infectious diseases serve as a trigger for developing autoimmune pathology, and autoantibodies, in turn, cause thrombosis development, aggravating disease severity.
- ▶ Considering the prominent similarity in immune mechanisms underlying thrombosis development between antiphospholipid syndrome (APS) and COVID-19, some studies associate thrombogenesis trend in novel coronavirus infection with detected antiphospholipid antibodies (aPL).
- ▶ Within import substitution process generation of domestic tests for APS marker diagnostics was a pressing issue.

What are the new findings?

- ▶ A high aPL prevalence was noted in patients with verified COVID-19 in acute disease stage without previous APS history.
- ▶ Changes in the spectrum of aPL detection and circulation lasting for 9 months from the moment of diagnosis were also assessed for the first time.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ The pathogenic aPL nature related to COVID-19 requires a detailed study contributing to delayed thrombogenesis in post-COVID period.
- ▶ Non-criteria vs. criteria aPL, such as anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies, may be more common justifying a need to include them into APS laboratory marker screening in COVID-19 patients.
- ▶ RPC Diagnostic Systems, Ltd. is the first domestic manufacturer of ELISA tests for APS markers detecting. The developed diagnostic kits successfully passed clinical trials and provide validated high analytical characteristics that may evidence about high reliability for the obtained test data in problematic field of laboratory diagnostics including autoimmune pathology.

Введение / Introduction

Антифосфолипидный синдром (АФС) является приобретенным и потенциально опасным для жизни пациентов симптомокомплексом, который обусловлен синтезом антифосфолипидных антител (аФЛ). Одними из триггеров развития АФС являются инфекционные заболевания [1]. В настоящее время описаны случаи выявления аФЛ у больных COVID-19, что свидетельствует о высоком риске возникновения артериальных и венозных тромбозов у таких пациентов [2, 3]. Показано сродство диффузной коагулопатии при COVID-19 с развитием катастрофического АФС, который часто заканчивается фатально [2].

Согласно международным рекомендациям (XI Международный конгресс по аФЛ, 2006, Сидней) лабораторным критерием АФС является выявление волчаночного антикоагулянта (ВА) и/или антикардиолипидных антител IgG/IgM (англ. anti-cardiolipin antibodies, aCL) и/или антител к β_2 -гликопротеину 1 (англ. anti- β_2 -glycoprotein 1 antibodies, β_2 -GP1) IgG/IgM. В качестве дополнительного исследования при подозрении на АФС и отрицательных результатов на вышеуказанные маркеры рекомендуется определение aCL IgA и β_2 -GP1 IgA [4–6]. Значительный интерес в качестве более специфичного маркера АФС представляют антитела к отдельным доменам (D) β_2 -GP1. Так, субпопуляция антител к D1 (aD1- β_2 -GP1) предполагается в основном ответственной за развитие тромбозов при АФС [7, 8]. Доказательное значение в диагностике АФС антител к другим фосфолипидам и кофакторным белкам, таким как фосфотидилсерин-протромбиновый комплекс (англ. phosphatidylserine-prothrombin complex, PS-PT) в настоящий момент рассматривается. В ряде случаев обнаружение этих антител рассматривается как «пре-АФС»/«вероятный АФС» и предшествует развитию тромботических осложнений [9]. Определенный профиль аФЛ может быть идентифицирован как высокий/низкий риск последующего развития тромбозов, а также может коррелировать с тяжестью течения заболевания [10, 11].

К настоящему времени отечественному здравоохранению доступен целый ряд зарубежных коммерческих тестов, и практически нет отечественных аналогов для определения аФЛ. Вместе с тем стандартизация и сходимость результатов лабораторных тестов разных производителей по отдельным маркерам АФС остаются существенной проблемой, что ведет к ошибкам в диагностике аутоантител. Расхождение результатов тестирования на наличие аФЛ обусловлено гетерогенностью методик выявления, вариативностью используемых реагентов, отсутствием общепризнанных международных стандартов и единиц измерения концентрации аутоантител [12].

Цель: разработать иммуноферментные тесты для определения маркеров АФС и определить частоту об-

наружения трех типов аФЛ у пациентов с COVID-19 на разных стадиях заболевания.

Материалы и методы / Materials and Methods

Дизайн исследования / Study design

Проведено сравнительное продольное контролируемое исследование, обследованы 120 человек в возрасте 18–67 лет с диагнозом COVID-19, подтвержденным с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). У большинства пациентов заболевание протекало в среднетяжелой (68,5 %) или легкой форме (26,2 %), тяжелая форма COVID-19 установлена у 3,0 % обследованных, и в 2,3 % случаев инфекция протекала бессимптомно. Больные в острой фазе COVID-19 проходили лечение в амбулаторных условиях или находились в стационаре (на базе ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА, Нижний Новгород), сбор клинического материала для исследования проводили на сроке 2–4 недели от постановки диагноза. Реконвалесценты COVID-19 (доноры ФБУЗ «Оренбургская областная клиническая станция переливания крови», Оренбург) были обследованы в динамике: через 1,5, 3,5 и 9 мес от постановки диагноза. Данные о сроках инфицирования взяты из анамнеза пациентов. В качестве контрольной группы использовали 60 образцов сыворотки крови доноров, собранные до ноября 2019 г.

Методы исследования / Study methods

Лабораторное исследование включало определение антител классов IgA, IgM и IgG к кардиолипину, β_2 -GP1, PS-PT. Для определения данных аФЛ на базе ООО «НПО «Диагностические системы» были разработаны экспериментальные наборы реагентов на основе непрямого двухстадийного иммуноферментного анализа (ИФА).

Валидация экспериментальных тестов для выявления разных типов аФЛ проведена на образцах сывороток крови от больных первичным и вторичным АФС ($n = 70$); с системными ревматоидными заболеваниями ($n = 10$); с инфекционными заболеваниями разной этиологии ($n = 251$); от беременных с патологией на фоне АФС ($n = 10$); содержащие ревматоидный фактор ($n = 11$); от доноров (случайная выборка, $n = 201$). Было проведено сравнение с коммерческими аналогами производства Orgentec Diagnostika GmbH (Германия), Euroimmune AG (Германия), Innova Diagnostics Inc. (США). Калибраторы аттестованы относительно E.N. Harris стандарта (Louisville APL Diagnostics, США) и IgG Sapporo стандарта (HCAL, Werfen, Австралия) с использованием коллекции образцов, аттестованных в референс-тесте – Orgentec Diagnostika. Положительными считали результаты проведенного ИФА-теста

на аФЛ при пороговом значении выше 99-го перцентиля для каждого из выявляемых маркеров АФС.

Использование тестирования на аD1- β_2 -GP1 в качестве более специфичного маркера АФС затруднено низкой сходимостью результатов между существующими немногочисленными коммерческими наборами [8]. Так, несомненный интерес представляет поиск альтернативных эпитопов/доменов β_2 -GP1 в качестве диагностически эффективных мишеней для детекции аутоантител. Предполагается, что сигнальный пептид P1, содержащий аФЛ-связывающий мотив и не присутствующий в зрелом β_2 -GP1, способен вызывать аутоиммунные реакции. В работе P. de Moerloose с соавт. (2017) показано, что CD4+ Т-клетки были способны распознавать последовательность P1 [13].

Для этой цели были изучены потенциальные антигенные эпитопы β_2 -GP1, смоделированные с помощью рекомбинантных белков ($n = 12$) и синтетических пептидов ($n = 3$). Выбор и создание возможных иммунологически значимых областей β_2 -GP1 проведены на основании данных, опубликованных в базах PubMed Национального центра биотехнологической информации США (англ. National Center for Biotechnology Information, NCBI) и GenBank NCBI. Для дальнейшей работы в качестве перспективных были отобраны 4 последовательности, оптимизированы условия проведения ИФА индивидуально для каждой из этих конструкций. Для верификации созданных конструкций, содержащих в своем составе последовательности белка β_2 -GP1, были использованы: 34 образца сыворотки крови, содержащие а β_2 -GP1 (аттестованные как положительные в тестах Orgentec, Euroimmune, Innova Diagnostics); 5 образцов, содержащих аD1- β_2 -GP1 (аттестованные как положительные в тесте Innova Diagnostics); 46 образцов от доноров крови.

Этические аспекты / Ethical aspects

Все процедуры, выполненные в данном исследовании, соответствуют этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Клинический материал для исследования представлял собой не персонализированные остаточные образцы, полученные в ходе рутинного тестирования, или архивные образцы из банка образцов предприятия (ООО «НПО «Диагностические системы»). Добровольное информированное согласие от пациентов получено в начале лечебно-диагностического процесса по месту лечения.

Статистический анализ / Statistical analysis

Аккумуляция базы собранных клинических данных выполнялась с помощью электронной таблицы Microsoft Excel. Статистический анализ результатов был проведен с использованием пакетов программ Analyse-it 5/66 компании Analyse-it Software, Ltd. (Великобритания) для ряда параметров валида-

ции экспериментальных тестов и SPSS Statistics 26.0 (англ. Statistical Package for the Social Sciences) производства IBM (США) для расчета частоты встречаемости отдельных типов аутоантител в группах сравнения (значение выражено в процентном соотношении с расчетом стандартного отклонения). Достоверность различий между двумя парными выборками считали с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and Discussion

Валидация экспериментальных тестов / Validation of experimental tests

Валидация экспериментальных тестов показала, что внутрисплавечная, межсплавечная, межсерийная воспроизводимость (повторяемость) каждого из наборов реагентов не превышала 8 %. Для сравнения использованы тесты производства Orgentec Diagnostika GmbH (Германия). Получена корреляция между тестами ООО «НПО «Диагностические системы» и Orgentec: для аCL разных классов получено значение $R^2 = 0,92$; для а β_2 -GP1 разных классов – $R^2 = 0,95$.

Оценка перекрестной реактивности с инфекционными заболеваниями показала отсутствие таковой при ВИЧ-инфекции, гепатитах В и С как для тестов на аCL, так и а β_2 -GP1. При сифилисе этот показатель составил 2,2 % (95 % доверительный интервал (ДИ) = 0,4–11,6 %), при COVID-19 – 1,7 % (95 % ДИ = 0,5–5,8 %) как для тестов на аCL, так и а β_2 -GP1.

Проведенные исследования по валидации данных наборов реагентов (в сравнении с референс-тестами; с использованием признанных международных стандартов; оценкой перекрестной реактивности на образцах, полученных от пациентов с соматическими, аутоиммунными и инфекционными заболеваниями и т. д.) показали высокие аналитические характеристики тестов. Аналитическая чувствительность тестов не превышает 0,5 Ед/мл.

Альтернативные антигенные мишени для эффективной диагностики а β_2 -GP1 / Alternative antigenic targets for effective а β_2 -GP1 diagnostics

В качестве альтернативной антигенной мишени для эффективной диагностики а β_2 -GP1 были рассмотрены отдельные эпитопы/домены β_2 -GP1. Результаты оценки выбранных рекомбинантных белков и пептидов представлены в **таблице 1**.

Установлено, что максимальную диагностическую эффективность для определения а β_2 -GP1 имеют пептид P1 (71,5 %) и рекомбинантный белок D1 (66aa) – 60,8 %. Полученные результаты требуют дальнейшего изучения диагностической значимости данных областей в ассоциации с клиническими проявлениями АФС. Кроме того, аФЛ-связывающие

Частота обнаружения и длительность циркуляции маркеров антифосфолипидного синдрома у пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19

Таблица 1. Результаты оценки выбранных последовательностей на образцах, содержащих и не содержащих антитела к полноразмерному белку β_2 -гликопротеин 1.

Table 1. Results of evaluating select sequences in samples with antibodies against full-length protein β_2 -glycoprotein 1.

Антиген/пептид Antigen/peptide	Чувствительность, % Sensitivity, % n = 34	Специфичность, % Specificity, % n = 46	Диагностическая эффективность, % Diagnostic efficiency, % n = 80
Антиген D1 (66aa) D1 antigen (66aa)	11 (32,4)	41 (89,1)	52 (60,85)
Антиген D4-5 D4-5 antigen	14 (41,2)	36 (78,3)	50 (59,8)
Пептид P1 P1 Peptide	19 (55,9)	40 (87,0)	59 (71,5)
Пептид P6 P6 Peptide	6 (17,6)	40 (87,0)	46 (52,3)

мотивы, присутствующие в пептидах, способны ингибировать активность аФЛ и могут обеспечить стратегию профилактики АФС в качестве альтернативы использованию антикоагулянтов [7].

Частота обнаружения аФЛ на разных стадиях COVID-19 / aPL detection frequency at different COVID-19 stages

Среди пациентов в острой фазе COVID-19 аФЛ выявлены у 81,7 % обследованных, что в 5 раз превысило аналогичный показатель среди контрольной группы (16,7 %) ($t = 9,38$; $p < 0,001$) (рис. 1). В стадию реконвалесценции отмечено достоверное снижение данного показателя ($t = 2,10$; $p = 0,038$), аФЛ выявлялись у 36–39 % переболевших на протяжении 9 мес после постановки диагноза.

В образцах сыворотки крови доноров контрольной группы отмечена одинаково низкая встречаемость отдельных маркеров АФС, не превышающая 1,7–3,3 %. В то же время у лиц, инфицированных SARS-CoV-2, профиль выявленных аФЛ и частота обнаружения отличались значительными колебаниями (табл. 2).

Среди всех выявляемых маркеров АФС у больных COVID-19 первое ранговое место по частоте обнаружения занимают IgG к β_2 -GP1, кардиолипину и PS-PT (38,3, 35,0 и 33,3 % соответственно), на втором месте – aCL IgM (30,0 %), наименьшая встречаемость показана для IgA к PS-PT и β_2 -GP1 (11,7 и 10,0% соответственно).

У реконвалесцентов COVID-19 исследование было проведено трижды с интервалами между сбором клинического материала в 2,5–3 мес, что позволило оценить изменения в профиле аФЛ, которые преобладают на разных сроках после постановки диагноза (рис. 2). В первые 6 мес лидирующие позиции занимали IgG к PS-PT и aCL IgM. На момент третьего сбора клинического материала у этих лиц резко начинали превалировать aCL IgG (30,0 % от всех выявленных маркеров), что можно рассматривать как отсроченные последствия перенесенной инфекции или влияние других факторов, не связанных с COVID-19.

Следует отметить, что a β_2 -GP1 IgM у больных не выявлены как в острой фазе COVID-19, так и в стадии реконвалесценции. IgM к PS-PT отсутствовали

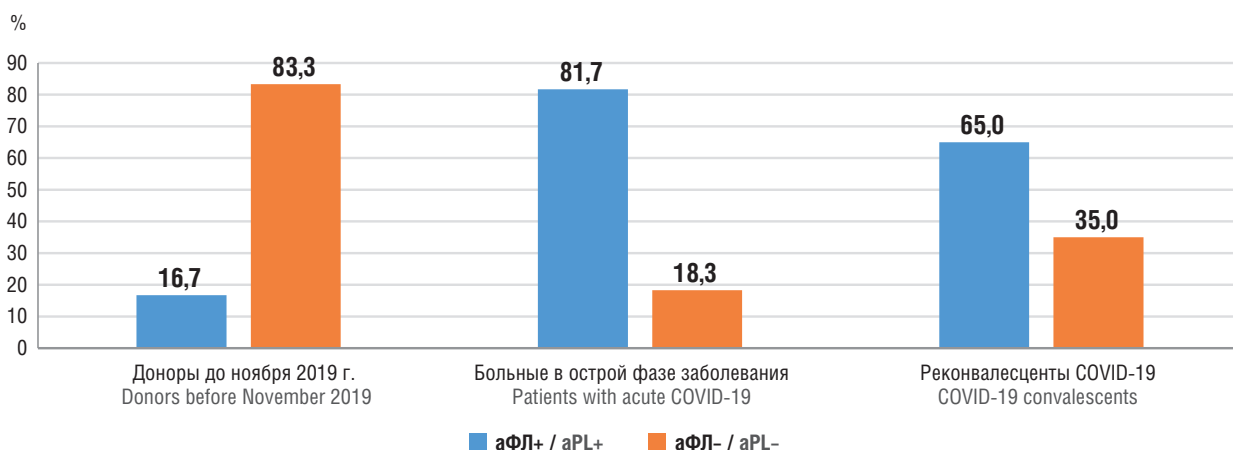


Рисунок 1. Частота выявления (%) антифосфолипидных антител (аФЛ) среди обследованного контингента.

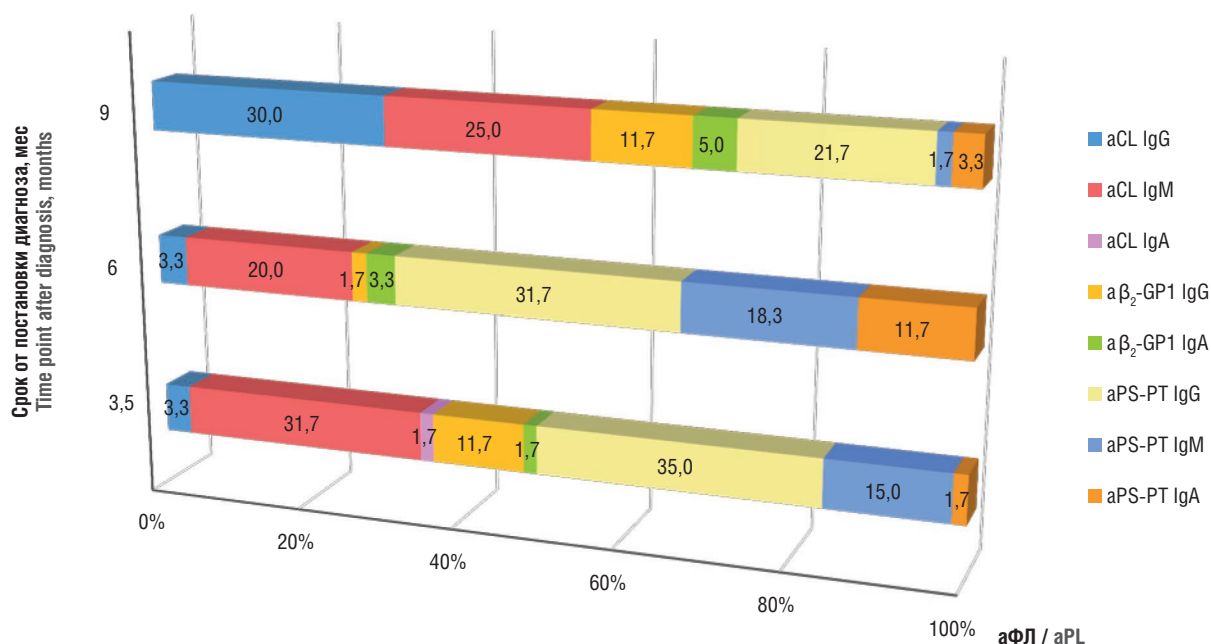
Figure 1. Frequency (%) of antiphospholipid antibody (aPL) detection in the examined subject cohort.

Таблица 2. Частота выявления антифосфолипидных антител (аФЛ) среди обследованных групп.**Table 2.** Frequency of antiphospholipid antibody (aPL) detection among the groups examined.

Тип аФЛ Type of aPL	Контрольная группа Control group n = 60 n (%)	Больные в острой фазе COVID-19 Patients with acute COVID-19 n = 60 n (%)	Реконвалесценты COVID-19, месяцы от постановки диагноза COVID-19-convalescents, months after diagnosis n = 60 n (%)		
			3,5	6	9
aCL IgG	1 (1,7)	21 (35,0)	2 (3,3)	2 (3,3)	18 (30,0)
aCL IgM	1 (1,7)	18 (30,0)	19 (31,7)	12 (20,0)	15 (25,0)
aCL IgA	1 (1,7)	0 (0,0)	1 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
a β_2 -GP1 IgG	1 (1,7)	23 (38,3)	7 (11,7)	1 (1,7)	7 (11,7)
a β_2 -GP1 IgM	1 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
a β_2 -GP1 IgA	1 (1,7)	6 (10,0)	1 (1,7)	2 (3,3)	3 (5,0)
aPS-PT IgG	2 (3,3)	20 (33,3)	21 (35,0)	19 (31,7)	13 (21,7)
aPS-PT IgM	1 (1,7)	0 (0,0)	9 (15,0)	11 (18,3)	1 (1,7)
aPS-PT IgA	1 (1,7)	7 (11,7)	1 (1,7)	7 (11,7)	2 (3,3)
Любые аФЛ Any aPL	10 (16,7)	49 (81,7)	39 (65,0)	36 (60,0)	39 (65,0)

Примечание: aCL – антикардиолипиновые антитела; a β_2 -GP1 – антитела к β_2 -гликопротеину 1; aPS-PT – антитела к фосфотидилсерин-протромбиновому комплексу.

Note: aCL – anticardiolipin antibodies; a β_2 -GP1 – anti- β_2 -glycoprotein 1 antibodies; aPS-PT – anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies.

**Рисунок 2.** Профиль антифосфолипидных антител (аФЛ) у реконвалесцентов COVID-19 на разных сроках от постановки диагноза.

Примечание: aCL – антикардиолипиновые антитела; a β_2 -GP1 – антитела к β_2 -гликопротеину 1; aPS-PT – антитела к фосфотидилсерин-протромбиновому комплексу.

Figure 2. Antiphospholipid antibody (aPL) profile in COVID-19 convalescents at varying time points after diagnosis.

Note: aCL – anticardiolipin antibodies; a β_2 -GP1 – anti- β_2 -glycoprotein 1 antibodies; aPS-PT – anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies.

на ранних стадиях заболевания и появлялись только спустя 3,5 мес от постановки диагноза.

Таким образом, при проведении исследования по обнаружению аФЛ среди пациентов на различных стадиях COVID-19 нами была установлена зна-

чительная частота встречаемости данных аутоантител. У всех пациентов с диагнозом COVID-19 в острую стадию течения заболевания обнаружен, по крайней мере, один лабораторный маркер АФС: 10 (20,8 %) пациентов были с положительным результатом теста

на 2 и более типов аФЛ и 12 (25,0 %) – на 3 и более типов антител. Около трети лиц с диагнозом COVID-19 имеют высокую вероятность возникновения тромбозов [4–6]. В нашем исследовании более половины положительных находок были связаны с двумя типами аФЛ: IgG к PS-PT и aCL IgM; доля больных с наличием антител к PS-PT и отсутствием других аФЛ составила 6,7 %. В ряде случаев состояние этих пациентов может рассматриваться как предшествующее развитию тромботических осложнений [9].

Динамический анализ позволил выявить изменения в спектре циркулирующих аФЛ в организме больного по мере развития заболевания. Большинство из этих вирус-ассоциированных аФЛ предположительно являются транзиторно позитивными и циркулируют кратковременно в организме больного. Вместе с тем клинические последствия их появления требуют дальнейшего изучения. Некоторые исследователи предполагают, что местная иммунная стимуляция вследствие вирусной инфекции может накладываться на ранее циркулирующие в организме человека аФЛ и таким образом приводить к тяжелому тромбовоспалительному поражению легких пациентов с COVID-19 [2, 14].

Нами не установлено достоверных различий в частоте обнаружения каких-либо аФЛ в зависимости от тяжести COVID-19.

Заключение / Conclusion

Созданы рекомбинантные конструкции для определения различных типов аФЛ и альтернативных иммунологически значимых областей β_2 -GP1. Оптимизированы условия проведения ИФА индивидуально для каждого вида определяемых аутоантител. Дизайн тестов, требования к образцам, метрологическая прослеживаемость соответствуют российским и международным стандартам, что позволяет рекомендовать данные тест-системы для использования в клинической лабораторной диагностике с целью выявления маркеров АФС.

Показано, что наравне с другими вирусными инфекциями COVID-19 является триггером выработки аФЛ. У 54,2 % лиц, инфицированных SARS-CoV-2, обнаруживался как минимум один тип аФЛ, у 45,8 % обследованных лиц были выявлены 2 и более лабораторных маркеров АФС. Вместе с тем некритериальные аФЛ, такие как антитела к PS-PT, могут быть более распространены, чем критериальные, поэтому следует рассмотреть вопрос включения их в скрининг лабораторных маркеров АФС у ковидных больных. Роль длительно циркулирующих вирус-ассоциированных аФЛ в развитии тяжелого тромбовоспалительного поражения у больных COVID-19 и особенно в постковидный период требует дальнейшего изучения.

ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ	ARTICLE INFORMATION
Поступила: 14.03.2024. В доработанном виде: 08.04.2024.	Received: 14.03.2024. Revision received: 08.04.2024.
Принята к печати: 16.04.2024. Опубликовано: 30.04.2024.	Accepted: 16.04.2024. Published: 30.04.2024.
Вклад авторов	Author's contribution
Все авторы принимали равное участие в сборе, анализе и интерпретации данных.	All authors participated equally in the collection, analysis and interpretation of the data.
Все авторы прочитали и утвердили окончательный вариант рукописи.	All authors have read and approved the final version of the manuscript.
Конфликт интересов	Conflict of interests
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interests.
Финансирование	Funding
Работа выполнена на базе ООО «НПО «Диагностические системы».	The work was performed at the RPC Diagnostic Systems, Ltd.
Согласие пациентов	Patient consent
Получено.	Obtained.
Политика раскрытия данных	Clinical Trials Disclosure Policy
Протокол исследования, план статистического анализа, принципы анализа будут доступны по методологически обоснованному запросу. Предложения должны быть направлены на почтовый ящик mikhailova@npods.ru. Чтобы получить доступ, лица, запрашивающие данные, должны будут подписать соглашение о доступе к данным.	Study protocol, statistical analysis plan, analytic code will be available at methodologically sound request. Requests should be sent to the mailbox mikhailova@npods.ru. In order to gain access, data requesters will need to sign a data access agreement.
Происхождение статьи и рецензирование	Provenance and peer review
Журнал не заказывал статью; внешнее рецензирование.	Not commissioned; externally peer reviewed.

Литература:

- Abdel-Wahab N., Talathi S., Lopez-Olivo M.A., Suarez-Almazor M.E. Risk of developing antiphospholipid antibodies following viral infection: a systematic review and meta-analysis. *Lupus*. 2018;27(4):572–83. <https://doi.org/10.1177/0961203317731532>.
- Zuo Y., Estes Sh.K., Ali R.A. et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci Transl Med*. 2020;12(570):eabd3876. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3876>.
- Devreese K.M.J., Linsens E.A., Benoit D., Peperstraete H. Antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19: A relevant observation? *J Thromb Haemost*. 2020;18(9):2191–201. <https://doi.org/10.1111/jth.14994>.
- Miyakis S., Lockshin M., Atsumi T. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>.

- Клинические рекомендации по лечению антифосфолипидного синдрома. М., 2013. 23 с. Режим доступа: <https://mzur.ru/upload/iblock/8f0/AFS.pdf>. [Дата обращения: 20.02.2024].
- Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Рекомендации по лабораторной диагностике ревматических заболеваний Общероссийской общественной организации «Ассоциация ревматологов России» – 2015. *Современная ревматология*. 2015;9(4):25–36.
- Середавкина Н.В., Решетняк Т.М. IX Европейский форум по антифосфолипидным антителам. Краткий обзор. *Научно-практическая ревматология*. 2014;52(1):115–21. <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2014-115-121>.
- De Laat B., Derksen R.H., Urbanus R.T., de Groot P.G. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood*. 2005;105(4):1540–5. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3387>.
- Zohoury N., Bertolaccini M.L., Rodriguez-Garcia J.L. et al. Closing the serological gap in the antiphospholipid syndrome: the value of «non-criteria» antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol*. 2017;44(11):1597–602. <https://doi.org/10.3899/jrheum.170044>.
- Choi B., Choudhary M.C., Regan J. et al. Persistence and evolution of SARS-CoV-2 in an immunocompromised host. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2291–93. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2031364>.
- Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844–7. <https://doi.org/10.1111/jth.14768>.
- Meroni P.L., Biggioggero M., Pierangeli S.S. et al. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(1):35–43. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.180>.
- De Moerloose P., Fickentscher C., Boehlen F. et al. Patient-derived anti-β₂GP1 antibodies recognize a peptide motif pattern and not a specific sequence of residues. *Haematologica*. 2017;102(8):1324–32. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.170381>.
- Sciascia S., Sanna G., Murru V. et al. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost*. 2014;111(2):354–64. <https://doi.org/10.1160/TH13-06-0509>.

References:

- Abdel-Wahab N., Talathi S., Lopez-Olivo M.A., Suarez-Almazor M.E. Risk of developing antiphospholipid antibodies following viral infection: a systematic review and meta-analysis. *Lupus*. 2018;27(4):572–83. <https://doi.org/10.1177/0961203317731532>.
- Zuo Y., Estes Sh.K., Ali R.A. et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. *Sci Transl Med*. 2020;12(570):eabd3876. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3876>.
- Devreese K.M.J., Linskens E.A., Benoit D., Peperstraete H. Antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19: A relevant observation? *J Thromb Haemost*. 2020;18(9):2191–201. <https://doi.org/10.1111/jth.14994>.
- Miyakis S., Lockshin M., Atsumi T. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x>.
- Clinical guidelines for antiphospholipid syndrome treatment. [Klinicheskie rekomendacii po lecheniyu antifosfolipidnogo sindroma]. Moscow, 2013. 23 p. (In Russ.). Available at: <https://mzur.ru/upload/iblock/8f0/AFS.pdf>. [Accessed: 20.02.2024].
- Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. The 2015 guidelines for the laboratory diagnosis of rheumatic diseases by the All-Russian Public Organization «Association of Rheumatology of Russia». [Rekomendacii po laboratornoj diagnostike revmaticheskikh zabolevaniy]. *Sovremennaya revmatologiya*. 2015;9(4):25–36. (In Russ.).
- Seredavkina N.V., Reshetnyak T.M. The IX European forum on antiphospholipid antibodies. A brief review. [IX Evropejskij forum po antifosfolipidnym antitelam. Kratkij obzor]. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014;52(1):115–21. (In Russ.). <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2014-115-121>.
- De Laat B., Derksen R.H., Urbanus R.T., de Groot P.G. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood*. 2005;105(4):1540–5. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3387>.
- Zohoury N., Bertolaccini M.L., Rodriguez-Garcia J.L. et al. Closing the serological gap in the antiphospholipid syndrome: the value of «non-criteria» antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol*. 2017;44(11):1597–602. <https://doi.org/10.3899/jrheum.170044>.
- Choi B., Choudhary M.C., Regan J. et al. Persistence and evolution of SARS-CoV-2 in an immunocompromised host. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2291–93. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2031364>.
- Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844–7. <https://doi.org/10.1111/jth.14768>.
- Meroni P.L., Biggioggero M., Pierangeli S.S. et al. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(1):35–43. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.180>.
- De Moerloose P., Fickentscher C., Boehlen F. et al. Patient-derived anti-β₂GP1 antibodies recognize a peptide motif pattern and not a specific sequence of residues. *Haematologica*. 2017;102(8):1324–32. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.170381>.
- Sciascia S., Sanna G., Murru V. et al. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost*. 2014;111(2):354–64. <https://doi.org/10.1160/TH13-06-0509>.

Сведения об авторах:

Михайлова Юлия Владимировна – к.б.н., главный редактор, начальник редакционно-издательского отдела ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород, Россия. E-mail: mikhailovauv@npods.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5161-908X>.

Чепурченко Наталья Валерьевна – микробиолог отдела внедрения новых технологий ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород, Россия.

Обрядина Анна Петровна – д.б.н., зам. генерального директора ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород, Россия.

About the authors:

Yulia V. Mikhailova – MD, PhD (Biology), Editor-in-Chief, Head of the Editorial and Publishing Department, RPC Diagnostic Systems, Ltd, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: mikhailovauv@npods.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5161-908X>.

Natalia V. Chepurchenko – MD, Microbiologist, New Technologies Implementation Department, RPC Diagnostic Systems, Ltd, Nizhny Novgorod, Russia.

Anna P. Obriadina – MD, Dr Sci Biol, Deputy Director General, RPC Diagnostic Systems Ltd, Nizhny Novgorod, Russia.