



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Detekce antifosfolipidových protilátek v diagnostice
antifosfolipidového syndromu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Markéta Korená
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Korená
Název práce	Detekce antifosfolipidových protilátek v diagnostice antifosfolipidového syndromu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Hemato-onkologická klinika, Olomouc
Vedoucí práce	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Antifosfolipidový syndrom (APS) je získané autoimunitní onemocnění definované klinicky a laboratorně. Klinická diagnostická kritéria zahrnují žilní či arteriální trombózy, komplikace v těhotenství, trombocytopenii. Laboratorně musí být opakovaně prokázány antifosfolipidové protilátky – buď koagulačními testy (LA – lupus antikoagulans), nebo ELISA metodami (ACLA – antikardiolipinové protilátky).
Klíčová slova	Antifosfolipidový syndrom, antifosfolipidové protilátky, autoimunitní onemocnění, trombóza, lupus antikoagulans, potrat
Počet stran	44
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Markéta Korená
Title of thesis	The detection of antiphospholipid antibodies in diagnosis of antiphospholipid syndrome
Type of thesis	Bachelor
Department	Hemato-oncology clinic, Olomouc
Supervisor	doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	Antiphospholipid antibody syndrome (APS) is an acquired autoimmune disorder characterized by clinical and laboratory attributes. Clinical diagnostic criteria comprise venous or arterial thrombosis, pregnancy complications, thrombocytopenia. Laboratory testing must be repeated positive for antiphospholipid antibodies – either coagulation tests (LA – lupus anticoagulant) or ELISA methods (ACLA – anticardiolipin antibody).
Keywords	Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, autoimmune disease, thrombosis, lupus antikoagulans, abortion
Number of pages	44
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Mé poděkování patří doc. Mgr. Luďku Slavíkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

Seznam zkratek a symbolů

ACLA	protilátky proti kardiolipinu
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
Anti β_2 -GP I	anti beta-2-glykoprotein I
APA	antifosfolipidové protilátky
APS	antifosfolipidový syndrom
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový test
β_2 -GP I	beta-2-glykoprotein I
CNS	cévní nervová soustava
dRVVT	test s jedem Russelovy zmije
ELISA	enzymová imunoanalýza
GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
HIV	virus lidského imunodeficitu
KCT	kaolinový test
LA	lupus antikoagulans
PNP	destičkový neutralizační test
PT	protrombinový test
RA	revmatoidní artritida
RIA	radioimunoanalýza
SCT	silica clotting time
SLE	systemový lupus erythematoses

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	6
ÚVOD.....	8
CÍLE PRÁCE.....	8
1 TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 Antifosfolipidový syndrom.....	9
1.1.1 Historie APS.....	9
1.1.2 Epidemiologie	10
1.1.3 Klasifikace a diagnóza APS	12
1.1.4 Klinická manifestace APS	16
1.1.5 Terapie APS.....	19
1.2 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA APA	20
1.2.2 Diagnostika lupus antikoagulans (LA)	22
1.2.4 Diagnostika antikardiolipinů a protilátek proti β_2 -GP I	28
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
2.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	30
2.1.1 Analyzátor.....	30
2.1.2 Spotřební materiál.....	30
2.2 PREANALYTICKÁ FÁZE	30
2.2.1 Odběr vzorku	30
2.2.2 Zpracování vzorků – centrifugace	31
2.2.3 Uchování vzorků	31
2.3 POUŽITÉ LABORATORNÍ METODY	31
2.3.1 aPTT	31
2.3.2 aPTT – LA.....	32
2.3.3 dRVVT	32
2.3.4 Konfirmační test (s hexagonální strukturou fosfolipidů)	32
2.3.5 PNP	33
2.3.6 Normální hodnoty.....	33
3 VÝSLEDKY	34
3.1 Diskuse.....	38
4 ZÁVĚR	39
LITERATURA.....	40
Seznam obrázků	43
Seznam tabulek	44

ÚVOD

Antifosfolipidový syndrom (APS) je systémové autoimunitní onemocnění, charakterizované na laboratorní úrovni přítomností antifosfolipidových protilátek (APA) nebo lupus antikoagulans (LA). APS se klinicky manifestuje jak tepennými tak žilními trombózami. Je také spojován s těhotenskými komplikacemi charakteru spontánních potratů, zvláště po 10. týdnu gravidity, nebo výskytem těžké preeklampsie v pozdějších fázích těhotenství. Rozlišujeme primární a sekundární APS. O primárním hovoříme tehdy, vyskytuje-li se samostatně, bez přítomnosti dalšího autoimunitního onemocnění. Sekundární APS je spojován s přítomností dalšího chorobného stavu. Pro APS je charakteristická přítomnost antifosfolipidových protilátek (APA). První dvě skupiny jsou diagnostikovány za pomoci metod ELISA – jako protilátky proti kardiolipinům (ACLA) a protilátky proti β_2 -glykoproteinu I (anti β_2 -GP I). Poslední skupina APA je zjišťována na základě jejich schopnosti ovlivňovat na fosfolipidech závislé reakce krevního srážení. Označujeme je jako lupus antikoagulans (Penka et al., 2005 a 2011).

Bakalářská práce pojednává ve své teoretické části o problematice APS, klasifikaci, klinických projevech, laboratorní diagnóze a následné léčbě. Důraz je kladen také na antifosfolipidové protilátky, jejich definici, mechanismech působení a jejich vlivu na vznik klinických projevů APS. Dále je popsán vliv APA na diagnostiku LA a postupy testování přítomnosti LA. Praktická část popisuje principy a postupy laboratorních vyšetření antifosfolipidových protilátek. Zahrnuje postupy měření včetně výsledků testů jednotlivých pacientů. Výsledky jsou statisticky vyhodnoceny.

CÍLE PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovit výskyt protilátek proti kardiolipinu, β_2 -glykoproteinu I a lupus antikoagulans v diferenciální diagnostice patologického aPTT tvořící základ diagnostiky antifosfolipidového syndromu. Druhým cílem bylo stanovit rizikovost jednotlivých faktorů pro manifestaci antifosfolipidového syndromu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM

Antifosfolipidový syndrom (APS), též někdy nazývaný Hughesův syndrom, je autoimunitní onemocnění charakterizované opakovanými arteriálními nebo venózními trombózami a/nebo těhotenskými komplikacemi ve spojení s trvale pozitivními antifosfolipidovými protilátkami. Jde o jeden z nejčastějších trombofilních stavů. Syndrom je nazýván dle charakteristické přítomnosti protilátek, tzv. antifosfolipidových protilátek (Hirmerová, 2010).

1.1.1 Historie APS

První zmínky o antifosfolipidových protilátkách se objevují již v roce 1906, kdy Wassermann et al. provedl sérologický test na syfilidu. Tento test potvrzoval na základě sérových autoprotiátek – reaginů (vznikající z přítomnosti infekčního agens ve tkáních s antigenem *in vitro*, jímž byla směs kardiolipinů, lecitinu a cholesterolu z hovězího srdce) – přítomnost specifické luetické infekce. V roce 1941 pak bylo potvrzeno, že touto aktivační antigenní strukturou je fosfolipid, jenž byl později nazván kardiolipin. Antifosfolipidové protilátky poprvé vstoupily mezi odborníky v 50. letech 20. století, kdy u pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE) byla pozorována falešná pozitivita testů na syfilis, i když bylo zřejmé, že tito lidé syfilis netrpí (Mohr et al., 1950 a 1952). V roce 1952 popsali Conely a Hartman přítomnost inhibitorů koagulace u pacientů, kteří měli prodloužené koagulační časy *in vitro* bez větších tendencí ke krvácení *in vivo*. V roce 1972 Feinstein a Rapaport definovali termín „lupus antikoagulans“. Poté bylo prokázáno spojení LA s trombotickými a porodními komplikacemi a trombocytopenií. V roce 1983 byly poprvé detekovány antikardiolipinové protilátky metodami radioimunoanalýzy a enzymoimunoanalýzy. Během roku 1980 byl poprvé zmíněn pojem „primární APS“ u pacientů, u kterých byl pozorován klinický výskyt žilních a/nebo tepenných trombóz bez přítomnosti jiného autoimunitního onemocnění, avšak s výskytem autoprotiátek proti fosfolipidům (Malíčková 2001; Hluší 2003. Poté v roce 1990 popsaly tři na sobě nezávislé vědecké skupiny (McNeil, Galli, Matsura) úlohu β_2 -glykoproteinu I a v následujících letech byly prokázány protilátky proti dalším kofaktorům – proti protrombinu, annexinu V, proteinům C a S nebo proti trombomodulinu (Bulíková, 2012).

1.1.2 Epidemiologie

Aktuální epidemiologické údaje o prevalenci APS nejsou úplně přesně známy. Antifosfolipidový syndrom se většinou vyskytuje ve středním až starším věku. Je jisté, že APS se vyskytuje 2-5x častěji u žen než u mužů. Pro primární APS nebyla definována rasová predominance, sekundární APS se může častěji vyskytovat u hispánské a černošské populace, protože u nich byla prokázána vyšší prevalence SLE. Jedna studie odhalila 33 % incidentů u příbuzných osob s APS (Carsons, 2004). V USA byly APA prokázány až u 5 % zdravých jedinců a předpokládá se, že frekvence na ostatních světadílech je podobná. Odhaduje se, že výskyt APS je přibližně 5 případů na 100 000 osob ročně a prevalence je přibližně 40-50 případů na 100 000 osob (Gómez-Puerta, 2014). Antifosfolipidové protilátky se vyskytují u přibližně 30-40 % pacientů se systémovým lupus erthematodes (SLE), ale jen 10 % případů má APS (Lockshin, 2008). Přibližně polovina případů APS není asociována s dalším revmatickým onemocněním. Ve studii sta pacientů s potvrzenou žilní trombózou a bez anamnézy SLE, byly nalezeny ACLA protilátky ve 24 % a LA ve 4 % případů. Antifosfolipidové protilátky jsou pozitivní přibližně u 13 % pacientů s mozkovou mrtvicí, 11 % infarktem myokardu, 9,5 % pacientů s hlubokou žilní trombózou a 6 % pacientů s těhotenskou nemocností (Cervera, 2017). Antifosfolipidové protilátky se mohou prokazovat i u jinak zdravých jedinců jako náhodný nález – viz tabulka č.1 (Buliková et al.,1998; Petri 2000).

Tabulka 1 Frekvence výskytu antifosfolipidových protilátek v běžné populaci - převzato od Buliková (2005)

studie, rok	počet, skupina	LA (%)	ACLA (%)
Lockwood, 1989	737 těhotných	2,7	2,2
Shi, 1990	499 dárců krve	3,6	5,6
Infante-Rivard, 1991	993 těhotných	3,8	1,5
Patkinson, 1993	933 těhotných	1,2	1
Buliková, 1997	335 dárců krve	0,6	1,19

Důležité je, že se APA mohou vyskytovat i u jinak zdravých jedinců, dalších chorob a při užívání některých léčiv (viz tabulka č.2).

Tabulka 2 Onemocnění provázená výskytem antifosfolipidových protilátek – převzato a upraveno dle Penka (2005)

Autoimunitní choroby	Malignity	Léky	Infekční choroby	Jiné stavy
SLE	Karcinomy (plíce, ledviny, prostata, děložní čípek, kůže, močový měchýř, střevo, jícn,) thymom melanom lymfom leukémie myeloproliferace Waldenströmova makroglobulinémie	fenothiaziny	malárie	renální selhání
RA		prokainamid	syfilis	GVHD
psoriatická artritida		interferon	lepra	
Sjögrenův syndrom		interleukin 2	tuberkulóza	
sklerodermie		chinin/chinidin	borelióza	
Behcethova choroba		hydralazin	salmonela	
vaskulitidy		estrogenní	mykoplazmové infekce	
polymyalgie		kontraceptiva	streptokoky	
Crohnova choroba		kyselina valproová	stafylokoky	
diabetes mellitus		streptomycin	hepatitidy	
AIHA		penicilin	HIV	
		propranolol		

1.1.3 Klasifikace a diagnóza APS

Pokud APS vzniká bez zjevné příčiny, je řazen mezi autoimunitní. Vyskytne-li se bez spojení s dalším chorobným procesem, je označován jako primární. Sekundární APS se vyskytuje u pacientů s jinými autoimunitními chorobami, jako je např. systémový lupus erythematosus (SLE), ve spojení s maligními onemocněními, s infekcemi (zejména chronickými procesy) a v souvislosti s užíváním některých léků – viz tabulka č.2 (Carsons, 2004).

Diagnostická kritéria APS prodělala za posledních pár desítek let několik revizí. První ucelené diagnostické schéma vzešlo z mezinárodního konsenzu na pracovním setkání při 8. mezinárodním kongresu o antifosfolipidových protilátkách v Sapporu v roce 1998 (Wilson et al., 1999). Na 11. mezinárodním kongresu o antifosfolipidových protilátkách v Sydney v roce 2004 byla provedena revize těchto kritérií (Miyakis et al., 2006).

Diagnostická kritéria pro APS se dělí na klinická a laboratorní. K diagnóze je nutné splnění nejméně jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria.

Revidovaná kritéria antifosfolipidového syndromu dle Penka et al. (2009):

- *Klinická kritéria*
 - Trombóza
 - jedna či více klinických manifestací arteriální nebo venózní trombózy, případně trombózy malé cévy ve kterékoli tkáni či orgánu; je prokázána objektivními validovanými kritérii, v případě histopatologického průkazu bez známek zánětu v cévní stěně
 - Porucha těhotenství
 - jedno či více nevysvětlitelných úmrtí morfologicky normálního plodu v nebo po 10. týdnu těhotenství s potvrzením normální morfologie plodu ultrasonograficky či přímým vyšetřením
 - jedno či více předčasných narození morfologicky normálního novorozence před 34. týdnem těhotenství z důvodu eklampsie či těžké preeklampsie podle standardní definice nebo při prokázaných známkách placentární insuficience
 - tři a více nevysvětlitelných následných spontánních potratů před 10. týdnem těhotenství po vyloučení anatomických či hormonálních abnormit matky a chromozomálních abnormit rodičů

- *Laboratorní kritéria*
 - LA
 - Musí být prokázán v plazmě vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů
 - je detekován podle doporučení Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu (ISTH)
 - provádí se screeningové, korekční a konfirmační testy
 - ACLA
 - jsou prokázány v séru či plazmě
 - ve středním a vysokém titru protilátek se nacházejí IgG nebo IgM izotypy
 - jsou prokázány vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů
 - jsou měřeny standardizovaným typem ELISA metody
 - Anti β_2 -GP I
 - jsou prokázány v séru či plazmě, IgG či IgM izotypy
 - jsou prokázány vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů ELISA metodou

Mezinárodní konsenzus navíc určuje časové rozhraní mezi klinickou manifestací a průkazem autoprotilátek, a tudíž diagnózu APS – je to nejméně 12 týdnů (umožňující opakovaný průkaz protilátky) a nejvíce 5 let. Je taktéž doporučeno rozlišovat případy, u nichž je zjištěn další rizikový faktor klinické manifestace, a ty u nichž takováto příčina nebyla nalezena. Přídavné rizikové faktory shrnuje tabulka č.3 (Penka et al., 2009).

Tabulka 3 Přídavné rizikové faktory pro klinickou manifestaci APS podle mezinárodního konsenzu - převzato od Penka et al. (2009)

Skupina	Rizikové faktory
Věk	<ul style="list-style-type: none"> • muži > 55 let, ženy > 65 let
Rizikové faktory kardiovaskulární	<ul style="list-style-type: none"> • hypertenze • diabetes mellitus • zvýšení LDL nebo snížení HDL cholesterolu • kouření cigaret • rodinná anamnéza předčasného výskytu kardiovaskulárního onemocnění • body mass index $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ • mikroalbuminurie • průkaz glomerulární filtrace < 60 ml/min
Vrozené trombofilie	<ul style="list-style-type: none"> • zejména Leidenská mutace faktoru V
Získané rizikové faktory trombózy	<ul style="list-style-type: none"> • hormonální kontraceptiva • nefrotický syndrom • maligní onemocnění • imobilizace • operace

Mezi nemocnými je vhodné rozlišovat skupiny, dle kterých byla laboratorní diagnóza APS stanovena. Na základě poznatků bylo zjištěno, že přítomnost APLA je více asociována s trombózou nežli přítomnost antikardiolipinů. V roce 2002 byla na jednání standardizačního výboru ISTH (Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu) doporučena nová klasifikace laboratorních kritérií pro diagnózu APS. Arnout (2002) doporučuje rozlišovat:

- Skupina I: pozitivita lupus antikoagulans a současně pozitivita protilátek proti β_2 -glykoproteinu I
- Skupina II: izolovaný průkaz lupus antikoagulans
- Skupina III: izolovaná pozitivita protilátek proti β_2 -glykoproteinu I
- Skupina IV: průkaz jiných antifosfolipidových protilátek (proti fosfatidyl-etanolaminu, proti protrombinu atd.)

Stav, u kterého můžeme stanovit diagnózu APS, může vyplývat z různých klinických situací. Rozlišujeme čtyři kategorie (Vincent, 2010):

- a) *Primární antifosfolipidový syndrom* – pacienti s APS, u nichž nebylo zjištěno žádné doprovodné onemocnění systémového onemocnění pojiva
- b) *Sekundární antifosfolipidový syndrom* – APS spojený se systémovým onemocněním pojiva, obvykle se SLE
- c) „*Lupus-like*“ *choroba* – pacienti s APS, u nichž je podezření na systémové onemocnění pojiva, ale klinická kritéria tohoto onemocnění nebyla s jistotou naplněna
- d) *APS z jiných příčin* – léky, nádorová onemocnění, infekce, většinou jen nízký titer bez klinické manifestace onemocnění

Stavy, které jsou spojeny s výskytem APS, ukazuje tab.č.2. Vylučovací kritéria primárního APS byla stanovena již v roce 1993 Piettem (Piette et al., 1993):

Vylučovací kritéria primárního antifosfolipidového syndromu:

- *Klinická kritéria*

- Tvářový exantém, diskoidní exantém
- Ulcerace v ústech a hltanu (ulcerace nosního septa či perforace jsou přípustěny)
- Klinicky zjevná artritida
- Pleuritida bez přítomnosti plicní embolie či levostranného srdečního selhávání
- Perikarditida bez přítomnosti infarktu myokardu či uremie
- Léčba přípravky, o nichž je známo, že indukují tvorbu antifosfolipidových protilátek

- *Laboratorní kritéria*

- trvalá proteinurie > 0,5 g/den z důvodů biopsicky ověřené imunokomplexové glomerulonefritidy
- lymfopenie méně než $1,0 \cdot 10^9/l$
- protilátky proti nativní DNA prokázané RIA nebo imunofluorescenčně
- protilátky proti extrahovatelnému jadernému antigenu
- antinukleární protilátky v titru více než 1:320
- nález LE buněk v serózním výpotku

Je doporučováno nejméně 5-ti leté sledování pacientů od doby vzniku klinických příznaků.

1.1.4 Klinická manifestace APS

Klinické projevy APS jsou velmi pestré. Žilní a arteriální trombózy a komplikace v těhotenství patří k hlavním klinickým rysům APS. Nejčastější manifestací APS jsou žilní trombózy. Další časté stavy spojené s APS jsou opakované spontánní potraty, ztráty plodu, preeklampsie, eklampsie, trombocytopenie, livedo reticularis, postižení CNS ve formě migrén či ischemických mozkových příhod. V mnoha medicínských oborech mohou být klinické projevy velmi rozmanité. Přehled možných symptomů, dle které jsou asociovány s přítomností APA, podává tabulka č.6. (Lockshin 2004, Hughes 1993)

Žilní trombóza, projevující se především na dolních končetinách, je nejčastější klinickou manifestací antifosfolipidového syndromu. Arteriální trombóza a/nebo okluze u APS je o něco méně častým klinickým nálezem. Nejčastějším postižením je ischemická cévní mozková příhoda.

Kožní problémy mohou být spojeny s přítomností antifosfolipidových protilátek. Mezi kožní projevy patří např. kožní ulcerace, livedo reticularis, kožní gangréna a nekróza, nekrotizující a livedoidní vaskulitida, pseudovaskulitické léze a povrchová tromboflebitida.

Také neurologické symptomy mohou být přítomny u řady pacientů s prokázanými APA. Nejčastějším onemocněním je cerebrovaskulární ischemie. Dále pak trombóza cerebrálního venózního sinu nebo demence a jiné kognitivní funkce jako například zhoršení výkonnosti, verbálního učení a paměti. Předpokládá se snížený průtok krve CNS a přímý vliv APA na funkci neuronu.

Kardiální manifestace je nejčastěji spojena s postižením chlopenního aparátu srdce. V patofyziologii se popisuje APA vyvolaná aktivace endoteliálních buněk na chlopních a následná lokální zánětlivá reakce, která vede k chlopennímu postižení. Přítomnost APA hraje roli při terapii koronární srdeční nemocí. Je také popisováno větší riziko vzniku intrakardiálního trombu, ojediněle i souvislost s akutní kardiomyopatií (Buliková et al., 2005).

Přítomnost antifosfolipidových protilátek může také způsobovat trombotické procesy v ledvinných cévách, a to na všech úrovních cévního zásobení, počínaje hlavní renální tepnou a jejími větvemi, přes arterioly, glomerulární kapiláry až po ledvinné žíly (Nochy et al., 2000). Ledviny mohou být postiženy přítomností vlastních antifosfolipidových protilátek, ale i chorobným procesem, který vede k indukci těchto protilátek (nejčastěji SLE). Může docházet k okluzím a stenózám ledvinných tepen. Klinickou manifestací je především těžkoá renovaskulární hypertenze, bolesti v bederní oblasti, hematurie a v případech primárního APS i renální selhání.

Z dalších klinických manifestací je nejčastější plicní embolie a infarkt, kdy až třetina pacientů s trombózou má tuto komplikaci.

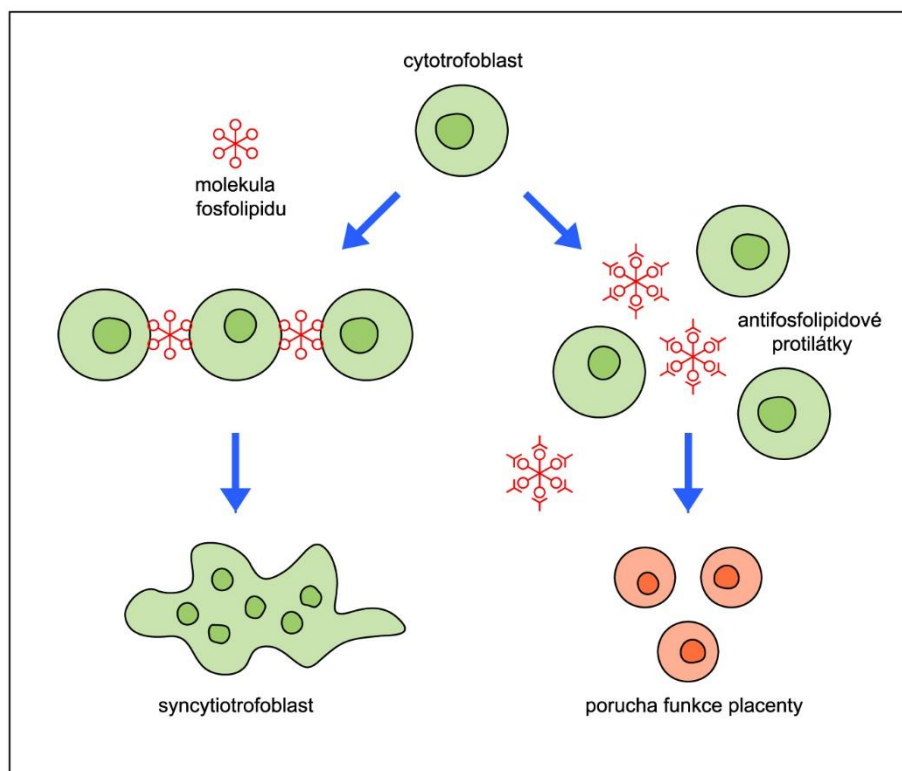
Trombotické postižení očních struktur je jedním z dalších rysů APS. Dochází k epizodické monookulární ztrátě vizu, tzv. amaurosis fugax. Výskyt tohoto onemocnění je typický pro pacienty mladého věku. Mezi další oční postižení patří vazookluzivní retinopatie, postižení cévnatky nebo optická neuropatie.

Při přítomnosti APA může dojít k manifestaci v gastrointestinálním traktu. Nejčastějším důsledkem tohoto postižení je Budd – Chiariho syndrom. Může se také vyvinout venookluzivní nemoc jater, nodulární regenerativní hyperplazie, vzácně i portální hypertenze. Trombotizace mezenterických cév trombem může vést k infarktu střeva.

Trombocytopenie je poměrně častým nálezem u pacientů s APS, a to ve 20 až 30% případů. Počet trombocytů bývá obvykle jen mírně snížen. Jen vzácně počet trombocytů klesá pod $50 \times 10^9/l$ s výskytem krvácivých projevů. Výskyt APA může také doprovázet idiopatickou trombocytopenickou purpuru s tím rozdílem, že v tomto případě je trombocytopenie hlubší než v případě APS a je spojena s nálezem antitrombocytárních protilátek (Buliková et al., 2005).

Další důležitou skupinou klinické manifestace APS jsou komplikace těhotenství. Mezi nejčastější komplikace APS v těhotenství patří těhotenské ztráty, fetální distres, předčasný porod, eklampsie či těžká preeklampsie. APS se mohou v krvi těhotných žen běžně vyskytovat bez příznaků jakéhokoli onemocnění. Mohou však bránit ženě otěhotnět a donosit plod. Na rozdíl od potratů však dochází ke ztrátám plodu u tohoto syndromu obvykle až ve druhém a třetím trimestru těhotenství. Trombózou jsou poškozeny děložní arterie, které vyživují intervilózní prostor placenty. Je zřejmé, že ženy trpící SLE mají daleko větší riziko poškození plodu. Jde hlavně o předčasné porody nezralých plodů či porody mrtvých plodů, u kterých došlo k nitroděložnímu úmrtí. Patogenetické mechanismy těhotenských ztrát u žen s APS nejsou ještě zcela prozkoumány, ale je známo, že v důsledku antifosfolipidových protilátek dochází ke snížení tvorby prostacyklinu, který za určitých podmínek rozšiřuje cévní řečiště a inhibuje agregaci trombocytů. Naopak dochází ke zvýšené tvorbě tromboxanu A_2 , který zvyšuje agregaci trombocytů. Antifosfolipidové protilátky mají tlumící účinek na aktivaci antitrombinu III, inhibují aktivaci proteinů C a S, které jsou závislé na fosfolipidech. Dochází k vazbě endotelových buněk na APA a zvýšené expresi adhezních molekul ICAM-1, VCAM -1, PECAM -1. Dochází tak k přilnutí makrofágů k endoteliím placentárních cév, které začínají produkovat cytokiny a ty zvyšují protrombotické procesy. Vlivem APA dochází k poškození funkce přirozených inhibitorů a regulátorů koagulace, jejichž hlavní funkcí je inhibice jednotlivých kroků koagulační kaskády, která je závislá na přítomnosti fosfolipidů. Nejlépe prozkoumaným placentárním antikoagulačním faktorem je annexin V, který se vyskytuje v placentě ve velkém množství a má vysokou afinitu ke kyselým fosfolipidům. Antifosfolipidové protilátky mohou za retardaci růstu plodu, předčasný porod nebo úmrtí plodu. To vše je způsobeno uteroplacentální insuficiencí, ke které dochází

v důsledku placentálních trombóz a vaskulopatie spirálních arterií, viz obrázek č.1 (Gleicher et al., 2006; Cervera et al., 2009).



Obrázek 1 Vliv antifosfolipidových protilátek na vývoj a funkci placenty – převzato od Křemenová (2010)

Vzácně se vyskytuje katastrofický APS (CAPS), který je spojen s rozsáhlou trombotickou chorobou doprovázenou multiorgánovým selháním s vysokou mortalitou. Laboratorně jsou detekovány zvýšené hladiny fibrin degradačních produktů, D-dimerů a s konzupcí fibrinogenu. Pro diagnózu CAPS je nutná přítomnost APS či APLA, tří a více epizod orgánových trombóz v posledním týdnu, bioptické potvrzení mikrotrombu a vyloučení jiných příčin trombóz či mikrotrombóz (Asherson et al., 2003).

1.1.5 Terapie APS

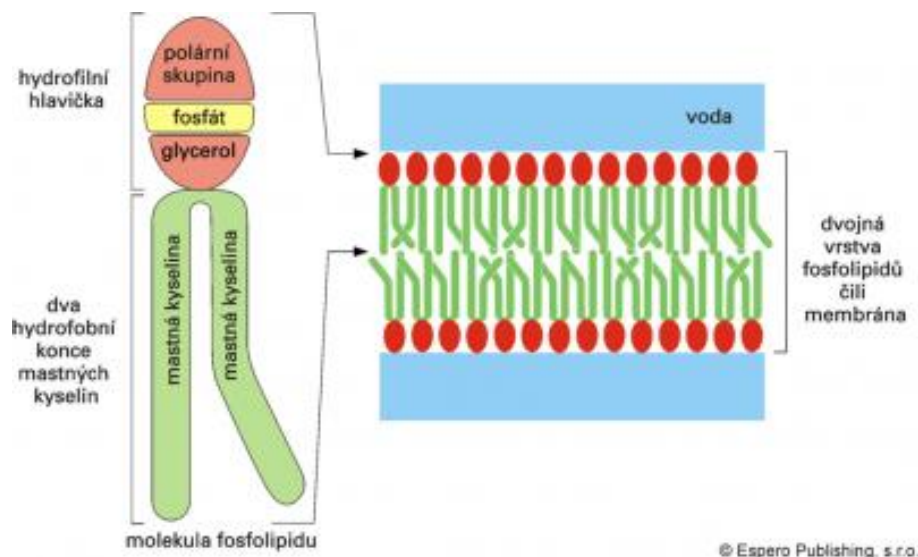
Léčebný přístup k nemocným, u kterých je prokázán APS, není s definitivní platností vyřešen. Řada z těchto pacientů nikdy tromboembolickou příhodu neprodělá, i když je přítomnost APA dlouhodobá či trvalá. Důležitá je primární prevence. V úvahu jsou následující postupy dle Buliková, Penka (2005):

- *Žádná trvalá léčba*
 - pacientům je doporučeno vystříhat se dalších rizikových faktorů – orální kontracepce, kouření, obezita. Je zavedena léčba hypertenze a hypercholesterolemie. Krátkodobá antitrombotická profylaxe obvykle nízkomolekulárním heparinem je zavedena při dalším navýšení trombofilního rizika – operace, úrazy, imobilizace. Nemocní by měli být pečlivě monitorováni.
- *Kyselina acetylosalicylová (ASA)*
 - Nejčastěji používanou léčbou jsou nízké dávky aspirinu (75-100 mg denně). V současné době probíhá prospektivní studie ke zhodnocení efektu tohoto léčebného přístupu.
- *Antimalarika*
 - Protidestičkové působení hydrochlorochinu či chlorochinu je známo od 70-tých let, kdy byly využívány pro profylaxi žilního trombembolizmu po ortopedických operacích. Opakovaně byl v retrospektivních studiích i na zvířecích modelech prokázán jejich efekt jak u primárního, tak sekundárního výskytu APA.
- *Nízkodávkovaná antikoagulační léčba warfarinem*
 - Efekt tohoto typu léčby s cílovým INR 1,5 v kombinaci s nízkodávkovanou ASA je v současné době porovnáván v prospektivní multicentrické studii ve Velké Británii s účinností samotného aspirinu

V současné době jsou diskutovány další léčebné možnosti u APS. Jednak s využitím léků, které se používají rutinně v jiných indikacích, dále pak specifické ovlivnění imunitního systému.

1.2 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA APA

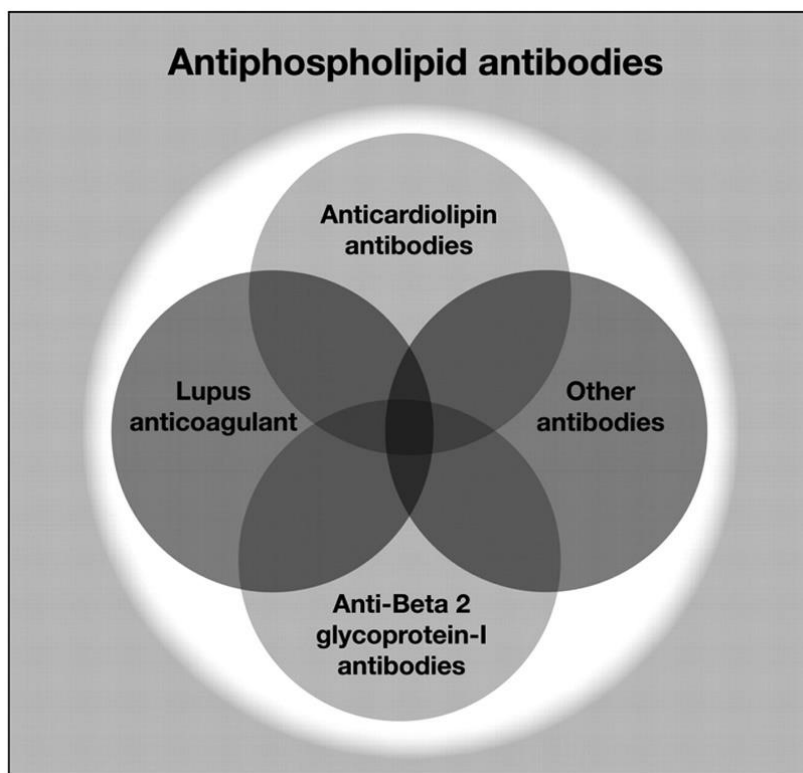
Antifosfolipidové protilátky (APA) jsou heterogenní skupinou autoprotilátek s odlišným cílovým antigenem a různým klinickým významem. Jsou charakterizovány náchylností k trombózám v žilním, tepenném či mikrocirkulárním řečišti a k reprodukčním ztrátám. Ty z nich, které mají vztah k antifosfolipidovému syndromu (APS), jsou autoprotilátky, které jsou zaměřeny proti makromolekulárním látkám vázaným na negativně nabitě, obvykle fosfolipidové povrchy (Penka, 2011). Fosfolipidy jsou polární lipidy, které se částí formují do buněčné membrány (viz obr.č.2). Mohou ovlivňovat pochody na různých úrovních koagulační kaskády analogicky tomu, jak se na různých místech krevního srážení uplatňují fosfolipidové povrchy. V případě infekčních nemocí jsou protilátky obvykle ve třídě IgM. Protilátky, které se uplatňují v patogenetických mechanismech APS jsou převážně ve třídě IgG a IgM (mohou se vyskytovat i ve třídě IgA, které ovšem nejsou diagnostickými kritérii APS) a jsou namířeny proti negativně nabitým fosfolipidům (např. kardiolopinu, fosfatidyl serinu, fosfatidyl inositolu a kyselině fosfatidové), zatímco fosfatidyl cholin je neutrálně nabitý a fosfatidyl etanolamin dipolární. Vazba APA vyžaduje přítomnost proteinového kofaktoru. Nejčastějším kofaktorem je β_2 -glykoprotein I, dále pak trombomodulin, protein C, protein S, protrombin, faktory kontaktní fáze, tkáňový faktor, fosfolipáza A2, annexin V a řada jiných látek (Krejsek, 2004).



Obrázek 2 Molekula fosfolipidu – převzato od ALBERTS a kol. (1998)

1.2.1 Dělení APA dle metody detekce

- *lupus antikoagulans (LA)* – stanovení pomocí koagulačních testů, rozlišujeme dvě velké skupiny inhibitorů podle antigenního cíle, proti kterému je daná protilátka namířena:
 - protilátky proti β_2 -glykoproteinu I (anti β_2 -GP I) – protilátky typu IgA, tento typ protilátek lze prokázat u 60-90 % LA; epitopem může být doména I nebo IV molekuly β_2 -glykoproteinu I; průkaz možný u lidí i zvířat
 - protilátky proti protrombinu – tyto protilátky jsou prokazatelné u 50-90 % LA; epitopem může být fragment 1 nebo pretrombin; průkaz je možný jen u lidí
- *antikardiolipinové protilátky (ACLA)* – stanovení pomocí imunochemické metody (ELISA)
 - dle použitého antigenu rozlišujeme protilátky:
 - antikardiolipinové – v detekční soustavě použit kardiolipin
 - antifosfolipidové – v detekční soustavě použita směs fosfolipidů
 - anti β_2 -glykoproteinové I – jako antigen použit β_2 -glykoprotein I (Penka et al., 2001)



Obrázek 4 Antifosfolipidové protilátky – převzato z www.circ.ahajournals.org/content/112/3/e39

1.2.2 Diagnostika lupus antikoagulans (LA)

Laboratorní diagnostika APS je založena na průkazu APA. Testy musí být pozitivní minimálně dvakrát v odstupech šesti a více týdnů. Diagnostické testy lze jednoduše rozdělit podle způsobu detekce APA na koagulační testy (lupus antikoagulans) a stanovení antigenu ELISA metodou (protilátky proti kardiolipinům a protilátky proti β_2 -glykoproteinu I) (Hluší et al., 2003).

Koagulační vyšetření, tedy lupus antikoagulans, je mnohem komplikovanější než průkaz protilátek proti kardiolipinu a protilátek proti β_2 -glykoproteinu I. Vyšetření LA vyžaduje rychlé zpracování plazmy (do hodiny) na bezdestičkovou plazmu speciálními centrifugačními metodami a většinou je tak znemožněna diagnostika zasílaných vzorků do centrálních laboratoří. Plazma by měla být bezdestičková, protože trombocyty snižují APC-poměr (podíl hodnoty aPTT vyšetřované plazmy za a bez přítomnosti exogenního APC). Pokud plazma není zpracována do hodiny, výsledky mohou být zkresleny vyvázáním inhibitoru na destičky a jejich fosfolipidy a odstraněním tohoto komplexu při přípravě plazmy. Výsledky pak mohou být falešně negativní. Metodikou Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu je pak určen další postup – průkaz prodloužení testu závislého na fosfolipidech (používají se nejméně dva screeningové testy), nedochází k jeho zkrácení po přidání normální plazmy, test se koriguje přidávkou fosfolipidů a je také důležité odlišit jiné vlivy (zejména specifický inhibitor a heparin). Tento čtvrtý krok diagnostiky vyžaduje velmi úzkou spolupráci mezi odesílajícím lékařem a vyšetřující laboratoří (Buliková et al., 2006).

Tímto termínem označujeme imunoglobuliny třídy IgG, IgM či IgA, zasahující do hemokoagulace *in vivo*. Jedná se o zvláštní laboratorní fenomén, ne přímo detekovatelný, specifický analyt. Vyznačují se tím hlavně ty APA, které *in vitro* interferují s koagulačními testy závislými na fosfolipidech. Antifosfolipidové protilátky soutěží s koagulačními faktory o negativně nabitě fosfolipidy, které fungují jako katalytické povrchy. Dojde tak k prodloužení výsledných časů při koagulačních testech, jakými jsou aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT), kaolinový test (KCT), test s jedem Russelovy zmiže (dRVVT) a reptilázový test. Lupus antikoagulans se tedy *in vitro* chová jako inhibitor koagulace, ale není zaměřen proti konkrétnímu koagulačnímu faktoru (Hirmerová, 2010).

Stanovení LA je velmi komplikované, protože neexistuje 100% citlivý screeningový test. Laboratorní diagnostika k identifikaci lupus antikoagulans dle Penka et al. (2011):

1. Screeningové testy – průkaz patologie testů závislých na fosfolipidech
2. Korekční testy (tzv. směsné testy) – průkaz inhibitoru (vyloučení defektu faktoru, ovlivnění heparinem apod.)
3. Konfirmační testy – průkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru

Screeningové testy

Screeningové testy jsou založeny na principu závislosti na fosfolipidech a citlivosti na lupus antikoagulans. Nejčastěji používanými screeningovými testy jsou APTT, dRVVT s jedním Russellovy zmije, který za přítomnosti Ca^{2+} a fosfolipidů aktivuje přímo faktor X, kaolinový čas, jehož použití je vhodné u těhotných žen a reptilázový test. Prokazuje se jimi prodloužený koagulační čas v přítomnosti inhibitoru typu LA. Z důvodu nízké citlivosti testů je nutné provedení minimálně dvou screeningových testů pro zjištění prodloužení času koagulace. Pokud se po přidání normální plazmy a fosfolipidů nezkrátí čas, test musí být korigován. Je potřeba odlišit působení dalších faktorů, jako specifický inhibitor nebo heparin.

Vyhodnocení těchto testů se provádí pomocí naměřeného koagulačního času v sekundách a poměru ($R = \text{Ratio}$), který udává čas testované plazmy/čas kontrolní normální plazmy (Penka et al., 2009).

- *Aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT)*

Aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT) patří mezi základní koagulační testy monitorující vnitřní koagulační systém – faktory XII, XI, IX, VIII, prekalkrein (viz schéma č.1). Po přidání parciálního tromboplastinu (kefalinu) a Ca^{2+} (nejčastěji chlorid vápenatý) k vyšetřované plazmě dochází k aktivaci koagulačního systému vnitřní cestou. Pro urychlení aktivace je přidáván aktivátor (kaolin, křemičitany, polyfenoly). Výsledky aPTT se udávají v sekundách, kdy je měřen čas, za který dojde ke koagulaci a v jednotkách Ratio ($R = \text{čas testované plazmy} / \text{čas normálu}$). Prodloužen může být např. u vrozeného či získaného nedostatku faktorů vnitřní cesty, při léčbě heparinem a někdy také u novorozenců.

Mezi typy testů aPTT se řadí Kaolin Clotting Time (KCT) a Silica Clotting Time (SCT). Oba testy jsou na stejném principu, akorát místo kaolinu u KCT je použit oxid křemičitý (Penka et al., 2011).

- *Test s jedním Russellovy zmije (dRVVT)*

Slouží jako screeningový test v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu LA. Hadí jedy jsou směsí proteinů a peptidů mohou působit na všechny systémy hemostázy. Vysoká citlivost dRVVT testu k LA je dána sníženým obsahem fosfolipidů – v přítomnosti protilátek typu LA dochází k výraznému prodloužení dRVTT, který se nekoriguje ani po směsných testech s normální plazmou. K plazmě chudé na krevní destičky se přidá jed Russellovy zmije a dojde tak k přímé aktivaci faktoru X v přítomnosti Ca^{2+} . Aktivovaný faktor X za přítomnosti kefalinu štěpí protrombin na trombin, který dále aktivuje přeměnu

fibrinogenu na fibrin, čímž dojde ke vzniku fibrinové sraženiny. Lupus antikoagulans prodlužuje srážecí čas dRVVT (Pecka, 2010).

- *Protrombinový test (PT) – tromboplastinový test podle Quicka*

Protrombinový test patří mezi základní koagulační testy monitorující zevní koagulační systém (tj. FVII, FX, FII, ale i FV a fibrinogen (viz schéma č.1). Je sledován koagulační čas tvorby fibrinu po přidání tkáňového faktoru tromboplastinu Ca^{2+} k vyšetřované plazmě. Měří se čas v sekundách (průměr časů), za který dojde ke koagulaci, výsledek se pak vyjadřuje jako tzv. INR (mezinárodní normalizovaný poměr). Referenční meze od 0,8 do 1,2. Slouží jako základní koagulační test, který se užívá k monitorování terapie warfarinem či vitamínu K, nebo léčba jeho antagonisty či k vyšetření jaterních onemocnění. Prodloužen může být např. při nedostatku výše zmíněných faktorů a fibrinogenu, dále nedostatku vitamínu K, vyšších dávkách heparinu nebo u inhibitorů (Penka et al., 2011).

- *Kaolinový test (KCT)*

Kaolinový test je jedním z dalších screeningových testů pro stanovení přítomnosti LA v organismu. Jedná se o aPTT bez přidání aktivátoru. Je obzvláště citlivý na množství trombocytů v plazmě a je vhodný k použití zejména u těhotných žen. Při prodloužení koagulačního času se přistupuje ke korekci normální plazmou v poměru 1:1, kdy se provádí vyšetření ihned po smísení nebo po 1 a 2 hodinové inkubaci. Nedojde-li ke zkrácení, lze usuzovat na přítomnost LA v organismu.

- *Reptilázový test*

Reptiláza (jed hada *Bothrops atrox*) vykazuje aktivitu podobnou trombinu, tzn. trombinového testu. Reptilázový čas (RT) využívá reptilázu, což je hadí jed vykazující aktivitu podobnou trombinu, na rozdíl od trombinu však její působení není ovlivněno přítomností heparinu, a proto se používá k průkazu vlivu heparinu na prodloužené aPTT a TT (Penka et al. 2014).

Korekční testy (směsné testy)

V případě positivity screeningových testů (tedy poměr časů testované plazmy ku času normálu je větší jak 1,2), je nutné pomocí tzv. směsných testů prokázat přítomnost inhibitoru. Zahrnují APTT a dRVVT testy. Slouží k průkazu inhibitoru, vyloučení defektu faktoru nebo ovlivnění heparinem. Sleduje se korekce prodloužených časů normální plazmou. Směsné testy se provádějí se směsí pacientovy a normální plazmy v poměru 1:1 u testů, které byly ve screeningu prodlouženy (nejčastěji aPTT). Referenční meze směsných testů jsou dány poměrem časů do 1,2 (Bulíková et al., 2006).

Konfirmační testy

Pokud ve směsných testech nedojde ke korekci prodlouženého času, přistupuje se ke konfirmačním testům. Využívá se stanovení na základě aPTT a dRVVT testů. Tyto testy jsou založeny na zvýšené koncentraci fosfolipidů a slouží k průkazu fosfolipidové závislosti inhibitoru. Pokud je prokázán LA v předchozích testech, zvýší se koncentrace fosfolipidů, dojde k neutralizaci LA a ke zkrácení koagulačních časů.

Testy, které mohou být použity jsou destičkový neutralizační test – PNP, nebo také testy s hadími jedy – textarinový čas (PL – závislý test) a ekarinový čas (PL – nezávislý test), vyhodnocovaný jako poměr časů textarin/ekarin, tedy čas screen / čas confirm. Referenční meze jsou dány do 1,2 (popř. 1,3). Tyto testy se ale nedoporučují, protože nejsou žádné standardizované principy komerčních testů (Bulíková et al., 2006).

- *Destičkový neutralizační test (PNP)*

Test, který se používá v diagnostice LA jako konfirmační test. Principem testu je schopnost fosfolipidů krevních destiček neutralizovat inhibitory typu LA a tím zkrátit čas aPTT. Fosfolipidy destiček se získávají buď promýváním trombocytů s kalciovým ionoforem nebo opakovaným zmrazováním a rozmrazováním krevních destiček, čímž se na jejich povrchu exponují aniontové fosfolipidy. Pokud je přítomný LA, dojde ke korekci koagulačních časů (Pecka, 2010).

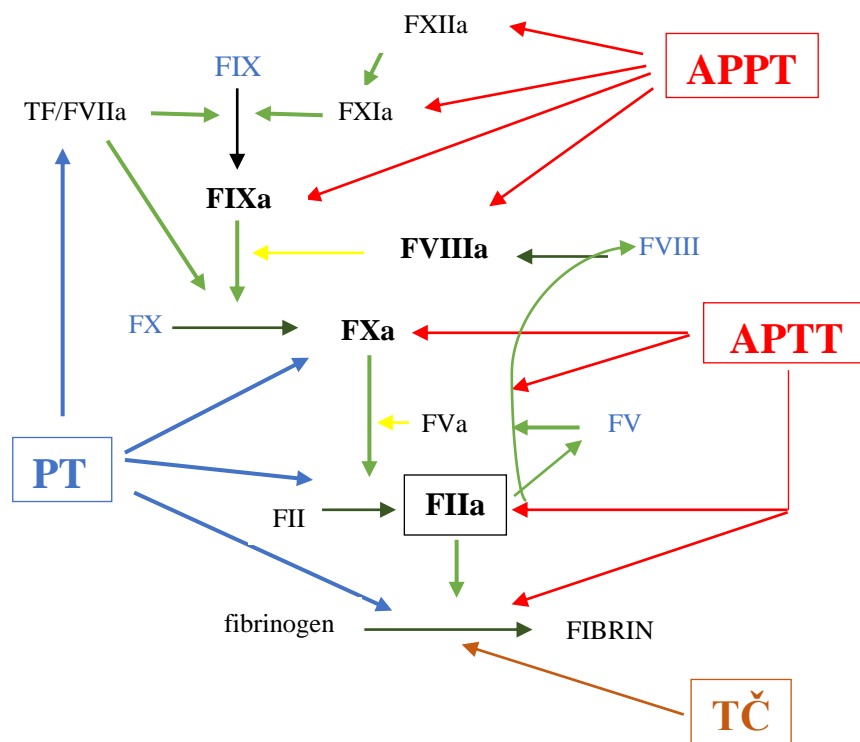


Schéma 1 Koagulační kaskáda – převzato a upraveno dle Penka et al. (2011)

Koagulační kaskáda je tvořena dvěma vzájemně propojenými systémy. Vnější systém je iniciován tkáňovým faktorem uvolňovaným z poškozené tkáně. Jedná se o směs fosfolipidů a fosfoproteidů, označovaných jako tkáňový faktor III (také tromboplastin). Tento faktor aktivuje faktor VII a ten následně (za přítomnosti Ca^{2+}) aktivuje faktor X, který již aktivuje protrombin. Vnitřní systém je stimulován poškozením endotelu a obnažením kolagenu cévy. Aktivace je započata kontaktem kolagenu cév s faktorem XII. Aktivovaný faktor XII poté štěpí faktor IX, který následně s pomocí faktoru VIII a destičkového faktoru 3 aktivuje faktor X. Další fáze koagulace je již společná s vnější cestou, kdy faktor X katalyzuje za účasti destičkových fosfolipidů, Ca^{2+} a faktoru Va přeměnu protrombinu na trombin. Trombin štěpí fibrinogen na monomery fibrinu, které polymerizují a vytvářejí síť fibrinových vláken, která spolu se zachycenými buňkami uzavře poraněnou cévu tzv. definitivním trombem (Trojan et al., 2003).

1.2.3 Doporučení

Doporučení pro diagnostiku a vyšetření APS z roku 2000 byly aktualizovány a nahrazeny novými postupy Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu (ISTH). Doporučení poté byla několikrát přezkoumána hematology z Royal College of Obstetricians and Gynaecologist (RCOG) a British Committee for Standards in Haematology (BCSH).

Co se týče odběru krve, odebírá se do 0,109 mol / l citrátu sodného. Je potřebná dvojitá centrifugace při 3000 g po dobu 15 minut, při teplotě 15-22°C, aby nedošlo ke kontaminaci fosfolipidů uvolněných z krevních destiček. Tímto postupem se získá plazma s počtem trombocytů $< 10 \times 10^9 / l$. V dřívějších postupech se prováděla ultracentrifugace (> 5000 g). Tento postup již britský výbor nedoporučuje, protože může dojít ke vzniku mikrovezikulů (Keeling et al., 2012).

Samotný jeden test dostatečně citlivý na LA nebyl dosud objeven. Proto se doporučuje provádět dva testy s různými principy, které umožňují odhalit slabě

pozitivní výskyt lupus antikoagulans a zlepšit specificitu metody u pacientů s pozitivním výskytem LA pouze v jednom testu. Jedním z doporučených testů je dRVVT a druhým aPTT, u něhož se použije činidlo s prokázanou citlivostí na LA. Jestliže je LA pozitivní pouze v jednom ze screeningových testů, provádí se směsné testy. Ty jsou kritériem pro LA a zlepšují specificitu metody. V těchto testech je důležitý ředící faktor, který způsobí, že slabě pozitivní vzorky se jeví jako negativní. Všechny vzorky, u nichž se neví příčina trombofilních stavů a koagulační čas byl prodloužen, by měly být brány jako pozitivní. Podmínkou je, aby při screeningovém a konfirmačním testu byla použita nezředěná plazma a oba vyšly pozitivně (Keeling et al., 2012).

Vyskytují se rozdíly v citlivosti a specifitě mezi reagensii. Cut-off hodnoty pro LA pozitivitu by měly být specifické pro daná činidla a typ koagulometru. Většinou jsou hodnoty uváděny přímo od výrobce v příbalových letácích, ale doporučuje se vlastní validace. Každá laboratoř má standardní odchylky, které se pohybují kolem 97,5 percentilu pro normální rozložení dat. ISTH doporučuje 99 percentil cut-off, u kterého by se zlepšila specificita, ale snížila citlivost. K docílení tohoto percentilu je zapotřebí velké množství normálních vzorků a komerčně vyrobené soupravy se zmrazenou plazmou chudou na krevní destičky. Doporučuje se testování minimálně 120 až 200 vzorků při zavádění metody. Pokud už jsou cut-off hodnoty stanovené, mohou být ověřeny v menším počtu vzorků normálních jedinců 20 až 60.

Pro všechny testy by výsledky měly být vyjádřeny jako poměr pacientova plazma/normální plazma. Výsledky screeningových testů nasvědčují pro přítomnost LA, pokud jsou koagulační časy prodlouženy nad místní „cut-off“ hodnoty. Výsledky směsných testů nasvědčují pro přítomnost LA, pokud jsou koagulační časy prodloužené nad místní „cut-off“ hodnoty, nebo když Rösnerův index (R_i) je větší, než místní „cut-off“. Výsledky konfirmačních testů potvrdí LA, pokud je % korekce vyšší než místní hodnoty „cut-off“.

Stanovování lupus antikoagulans by se nemělo provádět u pacientů léčených antagonisty vitamínu K, protože se u nich vyskytuje pozitivní nález LA, ale jejich mezinárodní normalizovaný poměr je v terapeutickém rozsahu. Dále by se neměli testovat pacienti, kteří dostávají terapeutickou dávku nefrakcionovaného heparinu, z důvodu falešných výsledků. Nízká dávka podkožního nefrakcionovaného heparinu a nízkomolekulární heparin mají minimální vliv na dRVVT a většina komerčně vyráběných reagensii obsahuje již heparin neutralizující činidla na pokrytí profylaktické dávky (Keeling et al., 2012).

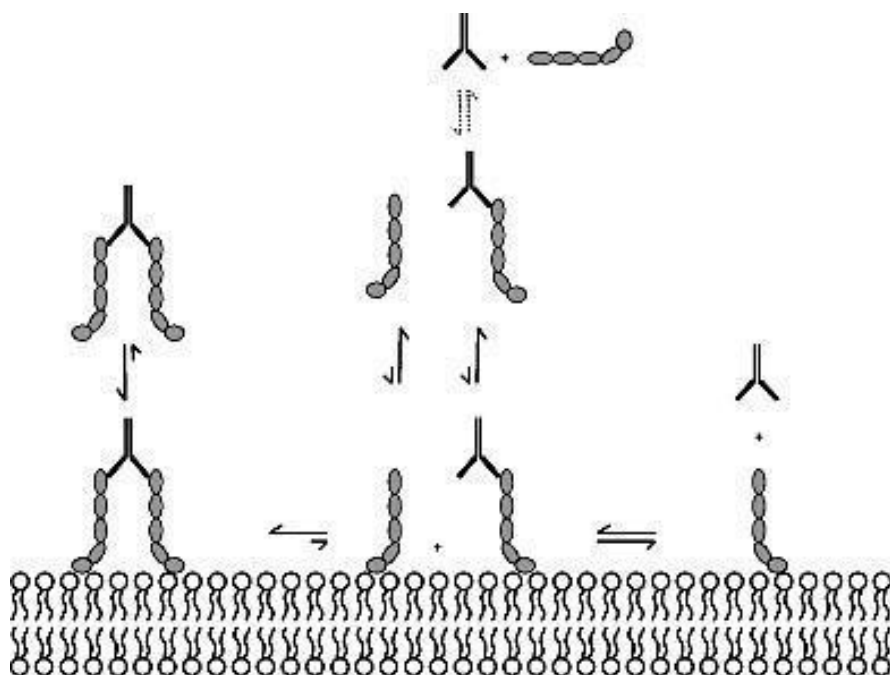
1.2.4 Diagnostika antikardiolipinů a protilátek proti β_2 -GP I

Protilátky proti kardiolipinům – antikardiolipinové protilátky (ACLA) patří do třídy IgG nebo IgM. Kardiolipin je mitochondriální fosfolipid z hovězího srdce (Roubey, 1994).

Protilátky proti β_2 -glykoproteinu I (anti β_2 -GP I) také patří do třídy IgG nebo IgM. Hlavním cílovým antigenem je β_2 -glykoprotein I (apolipoprotein), který rozpoznává antifosfolipidové protilátky (Rand, 2007). Váže se na negativně nabitě povrchy a na receptory na povrchu buněk. Nejvíce jsou propojeny s trombózou (Keeling et al., 2012). Tento protein se skládá z 326 aminokyselin a obsahuje 5 homologních domén. Čtyři domény jsou identické a každá se skládá z 60 aminokyselin s vysokým obsahem tryptofanu, prolinu a cysteinu. Zatímco pátá doména je nejdůležitější součástí celé molekuly, protože obsahuje sekvenci označovanou KNKEKK, která je zodpovědná za vazbu na fosfolipid. Dojde k odhalení antigenního neoepitopu. Protilátky proti tomuto epitopu označujeme jako antifosfolipidové protilátky (Agar et al., 2010).

Testy používané k detekci APA jsou chemiluminiscenční testy ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), užívající se pro protilátky proti kardiolipinu (antikardiolipiny) a protilátky proti β_2 -glykoproteinu I (Miyakis et al., 2006). Principem je tzv. sendvičová technika. Tyto testy zahrnují pokrytí destičky ELISA buď β_2 -glykoproteinem I, nebo aniontovým fosfolipidovým kardiolipinem, přidání séra pacienta v předem určeném ředění (1:50) a následnou aplikací sekundární značené protilátky, která umožňuje kvantitaci navázaných isotypů IgG nebo IgM (Lakos et al., 2012). Používají se dva typy mikrotitračních destiček, vysoce citlivé (ozářené) destičky a destičky s nízkou citlivostí. Antikardiolipinová ELISA detekuje přítomnost protilátek, které se přímo vážou na kardiolipin a další aniontové fosfolipidy. Detekuje také autoprottilátky, které se vážou na β_2 -GP I, který byl potažen na povrchu aniontového fosfolipidu (Passam et al., 2004). Antikardiolipinová ELISA je teoreticky méně specifická než anti- β_2 -GP I ELISA v diagnostice APS, protože první detekuje nespecifické protilátky, které jsou přítomny v plazmě jednotlivce v důsledku různých infekcí (Hunt et al., 1992). Jeden z přístupů k obcházení problému rozlišování mezi APS-relevantními autoprottilátkami a nespecifickými protilátkami souvisejícími s infekcí, je doporučení k opakovanému testování APA nejméně 12 týdnů od doby, co se pacient projevil jako pozitivní. Antifosfolipidovému syndromu příbuzné autoprottilátky zůstávají pravděpodobně trvale pozitivní. Ačkoli autoprottilátky detekované anti- β_2 -GP I ELISA a testy LA, pravděpodobně méně detekují autoprottilátky související s APS než ACLA ELISA (Myakis et al., 2006). Tento test je poměrně jednoduchý a používá jej řada laboratoří. Tato diagnostika se špatně standardizuje, má nízkou specificitu, nejasnosti v určování „cut off“ rozhraní a heterogenitu výsledků mezi různými komerčně dodávanými laboratorními diagnostickými sety. Proto je nutné výsledky klinicky hodnotit a provádět opakovaná vyšetření, jak doporučují mezinárodní diagnostická kritéria (Penka et al., 2006).

U pacientů, kteří mají zvýšenou hladinu ACLA, může nastat chybná diagnóza APS, protože mohou mít např. syfilis, lymfskou boreliózu apod. Riziko trombotických komplikací u těchto infekcí není spojeno se zvýšenými ACLA (Rand, 2003).



Obrázek 5 Tvorba komplexů APA/β₂-GP I a jejich vazba na fosfolipidový povrch – převzato od Hirmerová (2010)

Vytvořený trimolekulární komplex má vysokou afinitu k fosfolipidovému povrchu, touto vazbou zabraňuje navázání koagulačních faktorů na stejný povrch; tím dochází k inhibici koagulace, tedy k fenoménu „lupus antikoagulans“.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

2.1.1 Analyzátor

Všechna vyšetření byla provedena na přístroji, tzv. koagulometru: ACL Top 750

- Výrobce: Instrumentation laboratory
- Výrobní číslo: 050503510R
- Rok výroby: 2008

ACL Top 750 je automatický analyzátor používající se k analýze vyšetřované plazmy. Diagnostika jsou od firmy Instrumentation laboratory (IL, Italy, Milano).

2.1.2 Spotřební materiál

- Kyveta ACL Futura
- Rinse Solution
- Kontrolní plazma – normál
- Firemní diagnostika (viz níže)
- Destilovaná voda

Kalibrace se provádí změřením plazmy (normál) při každém stanovení. Výsledek je vyhodnocován oproti naměřenému aktuálnímu času kalibrační plazmy.

Kontrola kvality je prováděna 1x při každé skupině stanovení pomocí standardní plazmy. Povolené rozmezí je ± 2 SD.

2.2 PREANALYTICKÁ FÁZE

2.2.1 Odběr vzorku

Nutný odběr vzorku před zahájením jakékoli antitrombotické léčby nebo v dostatečném odstupu po jejím přerušení.

Vyšetřujeme vzorek krve odebraný do silikonovaných skleněných zkumavek s jedním dílem 0,109 mol/l citrátu sodného a 9 díly odebrané venózní krve.

Vzhledem k závislosti výsledků koagulačních testů na poměru Ca^{2+} iontů a Ca^{2+} chelatačního roztoku, je třeba u pacientů s vysokým ($> 0,6$) respektive s nízkým ($< 0,25$) hematokritem provést optimalizaci množství citrátu sodného v odběrovce dle vzorce:

$$\text{ml citrátu sodného} = \frac{(100 - \text{Hct})}{(595 - \text{Hct})} * \text{ml odebrané krve}$$

Vzorek musí být řádně označený štítkem s kompletní identifikací pacienta, tj. příjmení, jméno, rodné číslo pacienta.

2.2.2 Zpracování vzorků – centrifugace

Po naplnění zkumavku důkladně, ale jemně promícháme. Centrifugujeme při 3000 ot./min po dobu 7 minut při 25 °C, nebo při 7200, respektive 8000 ot./min po dobu 2 minut. Centrifugujeme dvakrát, abychom zajistili minimální přítomnost trombocytů ve vyšetřované plazmě (plazma chudá na destičky < 10 G/l), protože nesprávně zpracovaný materiál může výrazně zvýšit procento falešně negativních výsledků.

2.2.3 Uchování vzorků

Oddělenou plazmu zpracujeme nejpozději do dvou hodin od separace nebo napipetujeme po aliquotech a zamrazíme při -20 °C. Rozmrazování a opětovné zamrazování vzorků se nedoporučuje. Zamražení vzorků je vhodné provést co nejrychleji, ideální je zamražení v tekutém dusíku při -80 °C.

Před vyšetřením je vzorky třeba rozpustit ve vodní lázni při 37 °C po dobu 5 minut do úplné homogenizace plazmy.

2.3 POUŽITÉ LABORATORNÍ METODY

2.3.1 aPTT

Aktivovaný parciální tromboplastinový test se provádí tak, že se k testovanému vzorku přidá diagnostikum obsahující plazmatický aktivátor a fosfolipidy. Tato směs se inkubuje po dobu 3 minut při 37 °C pro dosažení optimální aktivace. Přidá se chlorid vápenatý a změří se čas sražení.

Diagnostikum

Neotevřené lahvičky skladujeme při teplotě +2 až +8 °C. Nezamrazujeme. Po otevření je diagnostikum stabilní 30 dní, pokud je skladováno při teplotě +2 až +8 °C, je uchováváno v originální lahvičce a je zabráněno kontaminaci. Používáme reagentie vždy ze souprav stejných šarží.

- Rutinní testy jako je aPTT a PT (protrombinový test) provádíme k vyloučení jiné koagulopatie.
- aPTT by měl být použit jako test screeningový, musí být použito citlivé reagentie.

2.3.2 aPTT – LA

Slouží jako screeningový test v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu lupus antikoagulans. Odečítá se koagulační čas normální kontrolní a vyšetřované plazmy z koagulometru. Vypočítá se poměr R (ratio), kdy fyziologické hodnoty $R = 0,90-1,20$. Prodloužení času aPTT-LA nemusí být vždy způsobeno přítomností protilátky typu LA. Tyto důvody je nutné v rámci diagnostiky LA vyloučit (přítomnost heparinu, deficit koagulačních faktorů, přítomnost specifického inhibitoru, dysfibrinogenémie).

2.3.3 dRVVT

Test s jedním Russelovy zmijsy slouží jako screeningový test v rámci laboratorní diagnostiky protilátek typu LA. Odečítá se koagulační čas normální kontrolní a vyšetřované plazmy z koagulometru. Koagulometr automaticky vypočítá poměr R, kdy fyziologické hodnoty $R = 0,80-1,20$.

Diagnostikum: Lac Screen

Screeningová reagencie určená pro klinické zhodnocení detekce lupus antikoagulans. Set obsahuje 10 lahvíček (2 ml lyofilizátu), reagencii rozpustíme v objemu vody uvedeném na lahvíčce (2 ml redestilované vody). Reagencie je stabilní po rozpuštění 24 hodin při 20-25 °C nebo jeden měsíc při -20 °C, pokud je uchovávána v původním balení a je zabráněno kontaminaci. Může být zamražena pouze jednou. Při rozpouštění intenzivně mícháme reagencii až do vytvoření homogenní suspenze.

2.3.4 Konfirmační test (s hexagonální strukturou fosfolipidů)

Ke stanovení protilátek v plazmě typu lupus antikoagulans se používá test s hexagonálními fosfolipidy. Vyšetřovaná plazma je inkubována při 37 °C s hexagonální strukturou a bez hexagonální struktury fosfatidyletanolaminu. V další fázi je stanoven aPTT za použití reagencie citlivé k LA. Jsou-li ve vyšetřované plazmě přítomny protilátky typu LA, dojde k jejich neutralizaci hexagonální strukturou, to způsobí zkrácení koagulačního času.

Diagnostikum: Lac Confirm

Konfirmační reagencie určená pro klinické zhodnocení detekce LA. Set obsahuje 10 lahvíček (5 ml lyofilizátu), reagencii rozpustíme v objemu vody uvedeném na lahvíčce (2 ml redestilované vody). Reagencie je stabilní po rozpuštění 24 hodin při 20-25 °C nebo jeden měsíc při -20 °C, pokud je uchována v původním balení a je zabráněno kontaminaci. Může být zamražena pouze jednou. Při rozpouštění mícháme intenzivně reagencii až do vytvoření homogenní suspenze.

2.3.5 PNP

Destičkový neutralizační test slouží k průkazu charakteru inhibitoru proti fosfolipidům. Reagencii rozpustíme ve 3 ml destilované vody (objem uvedený na lahvičce). Při rozpuštění mícháme intenzivně až do vytvoření homogenní suspenze. Stabilita po rozpuštění je 4 hodiny při 2-4 °C nebo jeden měsíc při -20 °C, pokud je uchována v původním balení a je zabráněno kontaminaci. Reagencie může být zamrazena pouze jednou. Vhodná metoda pro vzorky s hraničními hodnotami u ostatních testů – zjistíme přítomnost fosfolipidů na destičkách.

Konečné výsledky jsou vydávány jako poměr ratio LAC screen/LAC confirm, PNP:

- Poměr vyšší než 2,0 LA jsou silně přítomny
- Poměr mezi 1,5-2,0 LA jsou průměrně přítomné
- Poměr mezi 1,2-1,5 LA jsou slabě přítomny

Jestliže je poměr < 1,2 a koagulační testy IL testů LAC screen, LAC confirm a PNP jsou přesto prodlouženy, je třeba provést směsné testy na přítomnost deficitu nebo inhibitorů faktorů II,V a X. Jestliže jsou směsné testy prodlouženy, znamená to, že ve vzorku jsou přítomny jiná antikoagulancia než LA.

2.3.6 Normální hodnoty

Lupus	negativní/pozitivní
LAC screen	24 – 36,2 s
LAC screen ratio	1 – 1,2 R
LAC confirm	33,5 – 180 s
LAC confirm ratio	1 – 1,2 R
PNP	negativní
PNP ratio	1 – 1,2 R

Výsledky mimo stanovená rozmezí vykazují patologii.

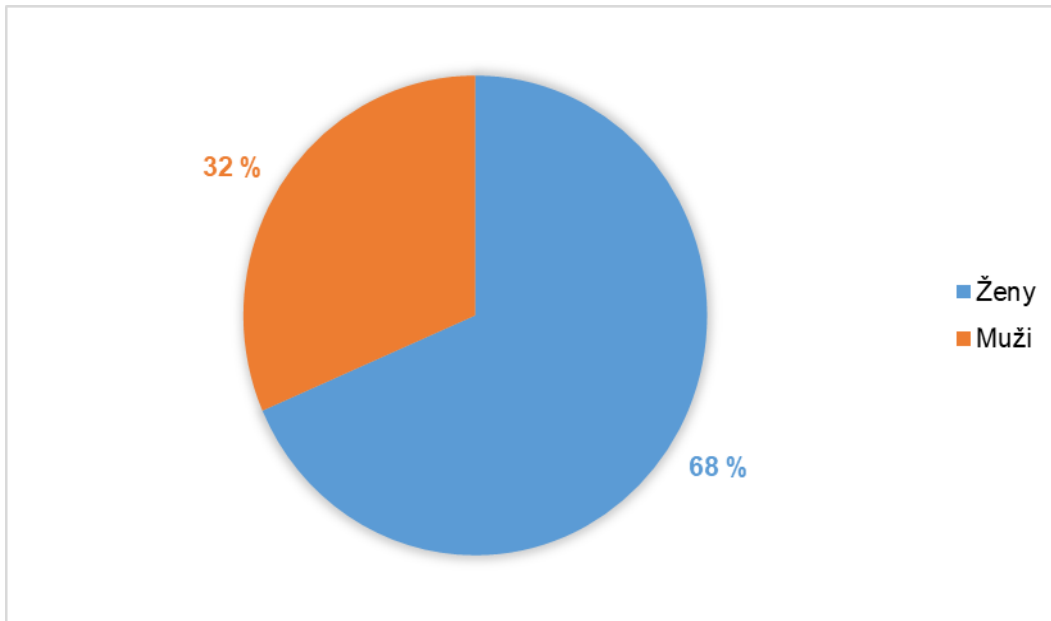
3 VÝSLEDKY

Byla provedena vyšetření na přítomnost lupoidních antikoagulancí, kardiolipinových protilátek a protilátek proti β_2 -glykoproteinu I (antifosfolipidových protilátek) u 800 pacientů. Hodnoty vyšetřených pacientů na přítomnost těchto antifosfolipidových protilátek jsou vyneseny do grafů.

Tabulka 4 Hodnoty APA vyšetřovaných pacientů, kteří měli patologické aPTT s pozitivním LA (vlastní zpracování)

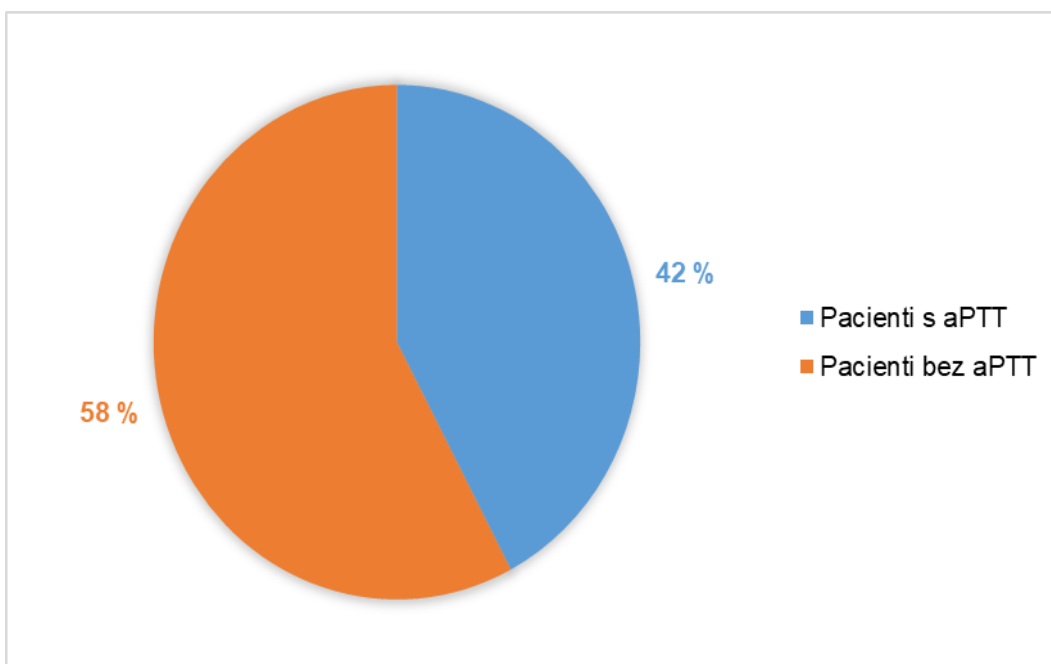
Číslo pacienta	Datum odběru	aPTT	LA	ACLA IgG	ACLA IgM	B2GI IgG	B2GI IgM	B2GI D1
022	18.10.2016	39,5	pozitiv.					
030	06.01.2016	36,4	pozitiv.					
032	25.04.2016	44,4	pozitiv.					
036	13.12.2016	52,6	pozitiv.	26,2	18,2	< 6,4	3,4	< 3,6
039	11.05.2016	39,2	pozitiv.					
047	29.04.2016	67,4	pozitiv.	< 2,6	4,2	< 6,4	< 1,1	< 3,6
065	15.07.2016	51,2	pozitiv.	< 2,6	2,5	< 6,4	< 1,1	< 3,6
070	13.06.2016	38,7	pozitiv.					
080	20.05.2016	46,9	pozitiv.					
087	19.10.2016	38,8	pozitiv.	3,7	2,9	9,0	< 1,1	< 3,6
087	14.09.2016	49,9	pozitiv.	< 2,6	111,8	< 6,4	8,2	< 3,6
091	27.12.2016	42,5	pozitiv.					
093	15.07.2016	56,8	pozitiv.	< 2,6	4,7	6,7	1,4	< 3,6
095	28.04.2016	37,3	pozitiv.					
098	14.12.2016	75,0	pozitiv.	199,2	90,8	479,0	157,2	308,0
099	07.09.2016	65,1	pozitiv.					
107	09.12.2016	43,8	pozitiv.	5,0	5,1	< 6,4	3,4	< 3,6
111	30.08.2016	37,6	pozitiv.					
112	27.06.2016	47,6	pozitiv.	< 2,6	2,7	< 6,4	< 1,1	< 3,6
136	07.09.2016	38,9	pozitiv.	7,7	1,6	6,5	< 1,1	< 3,6
137	22.09.2016	41,1	pozitiv.					
139	31.08.2016	36,6	pozitiv.	< 2,6	2,1	< 6,4	< 1,1	< 3,6
151	20.05.2016	44,5	pozitiv.	43,2	78,7	70,1	28,7	40,7
153	25.11.2016	52,1	pozitiv.					
154	23.06.2016	36,8	pozitiv.	5,9	7,3	< 6,4	6,1	< 3,6
154	30.11.2016	41,1	pozitiv.					
155	15.11.2016	44,3	pozitiv.	< 2,6	3,4	< 6,4	1,8	< 3,6
161	29.01.2016	89,8	pozitiv.					
175	30.11.2016	41,2	pozitiv.	5,0	2,9	8,3	< 1,1	< 3,6
177	06.06.2016	47,6	pozitiv.	8,1	8,6	< 6,4	5,2	< 3,6
179	17.03.2016	82,5	pozitiv.					
182	27.10.2016	42,9	pozitiv.					
186	08.12.2016	38,2	pozitiv.					

Tabulka č.4 ukazuje vyšetřované pacienty, kteří měli patologické aPTT (tzn. > 36), a zároveň měli pozitivní lupoidní protilátky.



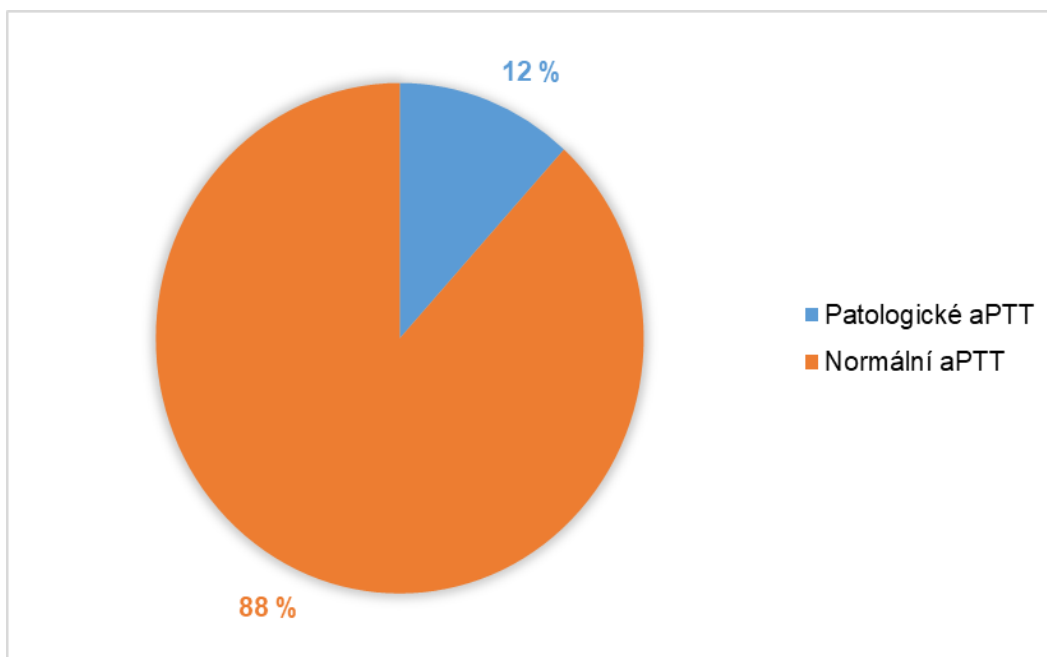
Obrázek 6 Rozdělení pacientů dle pohlaví (vlastní zpracování)

Na obrázku č.5 je v grafu znázorněno rozdělení vyšetřovaných pacientů na základě pohlaví. Z grafu plyne, že většina testovaných pacientů je ženského pohlaví.



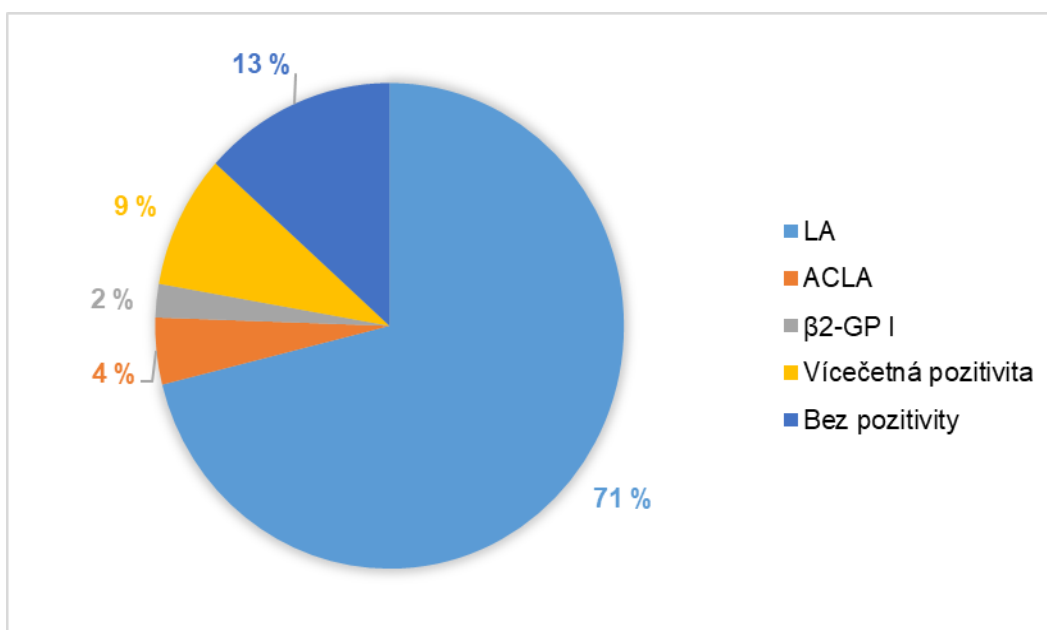
Obrázek 7 Rozdělení pacientů dle testu aPTT (vlastní zpracování)

Na obrázku č.6 je v grafu znázorněno rozdělení vyšetřovaných pacientů na základě testu aPTT. Z grafu je patrné, že v našem souboru bylo využito aPTT testu u 42 % pacientů.



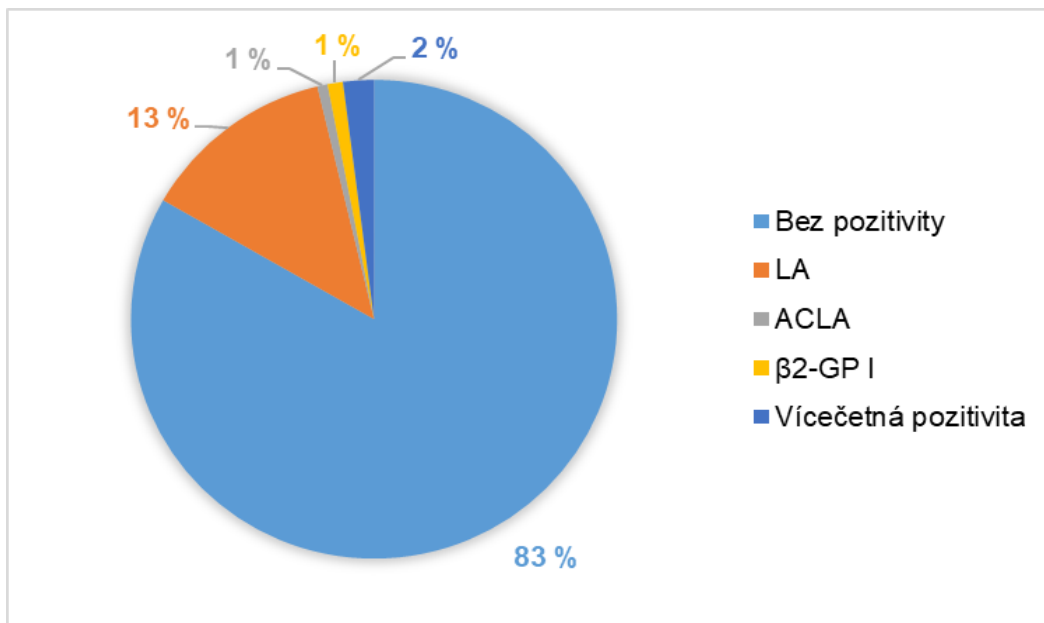
Obrázek 8 Rozdělení pacientů dle patologického a normálního aPTT (vlastní zpracování)

Na obrázku č.7 je v grafu znázorněno rozdělení pacientů na pacienty s patologickým a normálním aPTT. Z grafu je patrné, že aPTT screening nám zachytil 12 % pacientů s patologickým nálezem.



Obrázek 9 Rozdělení pacientů na základě positivity jednotlivých APA u patologického aPTT (vlastní zpracování)

Na obrázku č. 8 je v grafu znázorněn poměr pacientů s pozitivními LA, ACLA a β_2 -GP I k pacientům s vícenásobnou pozitivitou a bez positivity u patologického aPTT.



Obrázek 10 Rozdělení pacientů na základě positivity jednotlivých APA u normálního aPTT (vlastní zpracování)

Na obrázku č.9 je v grafu znázorněn poměr pacientů s pozitivními LA, ACLA a β₂-GP I k pacientům s vícenásobnou pozitivitou a bez pozitivity u normálního aPTT.

3.1 Diskuse

Antifosfolipidový syndrom je vzácné autoimunitní onemocnění projevující se opakovanými žilními a tepennými trombózami v jakékoli lokalizaci s různými manifestacemi. Z mé práce vyplývá, že APS více postihuje ženy. V tomto případě se jedná o poměr 548 žen (68 %) a 252 mužů (32 %) z celkového počtu 800 pacientů. Důvodem je odlišná citlivost regulačních T buněk k estrogenům u žen a u mužů (Cervera et al., 2009).

V diagnostice APS má nezastupitelnou úlohu aPTT test jako screeningový test pro výskyt protilátek, zejména lupoidního typu. V práci jsem hodnotila využitelnost aPTT pro výskyt protilátek jak typu LA, tak ACLA. Z grafu (obrázek č.5) plyne, že v našem souboru bylo 42 % vyšetřovaných pacientů podrobeno vyšetření aPTT a naopak 58 % pacientů nemělo aPTT vyšetřeno vůbec. Což svědčí o tom, že větší polovina pacientů byla vyšetřována na základě klinických symptomů APS.

Podrobněji jsem zkoumala skupinu pacientů bez klinických symptomů APS, kde byl použit aPTT jako screeningový test. V této skupině jsem patologii v aPTT našla u 12 % pacientů a zbylá většina (88 %) měla fyziologické hodnoty aPTT. Ve skupině pacientů s patologickým nálezem aPTT byl signifikantně vyšší výskyt protilátek LA (71 %), v malém zastoupení pak ACLA (4 %), β_2 -GP I (2 %) a 9 % pacientů s vícečetnou pozitivitou. Také se u testu aPTT objevili pacienti, kteří měli patologické aPTT, ale neměli pozitivní žádnou z APA. Těchto pacientů bylo 13 % a jedná se o pacienty, kteří mají prodloužené aPTT v důsledku krvácivé příčiny.

Ve skupině pacientů s normálním aPTT byl záchyt protilátek pouze 17 %. Důvodem positivity je různá specifita aPTT testu a dRVVT, která je odlišná k jednotlivým typům protilátek, musí se tedy provést konfirmační testy.

4 ZÁVĚR

Aktivovaný parciální tromboplastinový test (aPTT) jako screeningový test má velký význam pro vyhledávání lupoidních protilátek díky tomu, že se používá jako běžné předoperační vyšetření před každým invazivním výkonem a jeho patologie je téměř v 90 % způsobena přítomností lupoidních protilátek. Takto nám může pomoci v identifikaci pacientů, kteří ještě neměli klinickou manifestaci APS.

Opačná situace je u pacientů, kteří měli fyziologický nálezu apTT testu, u kterých jsme zjistili protilátky v 17 % případů. Příčinou tohoto nálezu je různá specifita testů na přítomnost antifosfolipidových protilátek. Proto je nutné pacienty s podezřením na výskyt APS důkladně anamnesticky vyšetřit a otázky zaměřit na možnou klinickou manifestaci APS.

Protilátky proti kardiolipinům a β_2 -glykoproteinu I je vždy třeba vyšetřovat samostatně na základě klinické manifestace APS, zde využití screeningového testu není možné.

LITERATURA

1. ASHERSON RA, CERVERA R, DE GROOT PG et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus* 2003; 12: s. 530 – 534.
2. BULIKOVÁ A, MATÝŠKOVÁ M, ZAVŘELOVÁ J et al. Antiphospholipid antibodies in blood donors. *Haemostasis* 1998; Suppl 2: s. 460.
3. BULIKOVÁ A, PENKA M. Antifosfolipidový syndrom – diagnostika a léčba. *Vnitř Lék* 2005; 51(7&8): s. 809-17
4. BULIKOVÁ A, PENKA M. Antifosfolipidový syndrom. *Interní Med.* 2006; 5: s. 240–243
5. BULIKOVÁ A, MATÝŠKOVÁ M, PENKA M, ZAVŘELOVÁ J. Hematologie I. *Neonkologická hematologie*, 2001, Grada Publishing Praha, s. 201.
6. CARSONS S. Antiphospholipid syndrome, 2004.
[Http://www.emedicine.com/linkus.htm](http://www.emedicine.com/linkus.htm)
7. CERVERA R, BALASCH J. Autoimmunity and recurrent pregnancy losses. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2003; 39(3): s. 148-152.
8. CERVERA R, BOFFA MC, KHAMASHTA MA, HUGHES GR. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus* 2009;18: s. 889-893.
9. CERVERA R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb res.* 2017 Mar. 151 Suppl 1: s. 43-47
10. DOUBEK M, ADAM Z et al. *Hematologie: pomocník ke stážíím na hematologických pracovištích*. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8776-7
11. ERKAN D, LOCKSHIN MD. What is antiphospholipid syndrome? *Curr Rheumatol Rep* 2004; 6: s. 451–457.
12. GLEICHER N, WEINER R, VIETZKE M. The impact of abnormal autoimmune function on reproduction: Maternal and fetal consequences. *J Autoimmun.* 2006;27: s. 161-165
13. GÓMEZ-PUERTA JA, CERVERA R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2014, 48-49: s. 20-25.
14. HIRMEROVÁ J. Antifosfolipidový syndrom. *Postgraduální medicína*. 2010,1.
15. HLUŠÍ A, KRČOVÁ V. Antifosfolipidový syndrom. *Interní Med.* 2003, s. 434-436.
16. HUGHES GR. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342: s. 341–344.
17. HUNT JE, MCNEIL HP, MORGAN GJ, CRAMERI RM et al. A phospholipid-beta 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992, 1: s. 75–81.

18. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. KEELING D, MACKIE I, MOORE G et al. *British Journal of Haematology* 2012; 157, s. 47-58.
19. KREJSEK J, KOPECKÝ O. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: NUCLEUS HK, 2004, s. 595-596.
20. LAKOS G, FAVALORO EJ, HARRIS EN et al. International consensus guidelines on anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I testing: report from the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Arthritis Rheum* 2011.
21. LEVINE J.S., BRANCH D.W., RAUCH J.: The antiphospholipid syndrome. *J Engl J Med*. 2002; 346: s. 752-763
22. LOCKSHIN MD. Update on antiphospholipid syndrome. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2008. 66(3): s. 195-197.
23. MALÍČKOVÁ K, FUČÍKOVÁ T. Antifosfolipidový syndrom a antifosfolipidové protilátky. *Čas. Lék. Čes.* 2001;140(15): s. 465-468.
24. MIYAKIS S, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: s. 295–306.
25. MOHR CF, MOORE JE, NELSON RA, HILL JH. Studies on the relationship of treponemal antibody to probable biologic false positive serologic tests for syphilis. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis*. 1950 Sep 5;34(5): s. 405-9.
26. MOORE JE, MOHR CF. Biologically false positive serologic tests for syphilis; type, incidence, and cause. *J Am Med Assoc*. 1952 Oct 4;150(5): s. 467-73
27. NOCHY D, DAUGAS E, HUONG DLT et al. Kidney involvement in the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity* 2000; 15, s. 127–132.
28. PASSAM F AND KRILIS S. Laboratory tests for the antiphospholipid syndrome: current concepts. *Pathology* 2004; 36(2): s. 129–138.
29. PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
30. PETRI M. Epidemiology of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmunity* 2000; 15: s. 145–151.
31. PIETTE JC, WECHSLER B, FRANCES C et al. Exclusion criteria for primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1993; 20: s. 1802–1804.
32. RAND, J. H. The antiphospholipid syndrom. *The annual review of medicine*. 2003, 54, s. 409-418.
33. TROJAN S. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

34. VINCENT T, MACKWORTH-YOUNG C. The primary antiphospholipid syndrome. In Khamashta MA. Hughes Syndrome. London: *Springer Verlag* 2000: s. 111–126.
35. WILSON WA, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheumat* 1999; 42: s. 1309–1311.

Seznam obrázků

Obrázek 1 Vliv antifosfolipidových protilátek na vývoj a funkci placenty	18
Obrázek 2 Molekula fosfolipidu.....	20
Obrázek 3 Antifosfolipidové protilátky.....	21
Obrázek 4 Tvorba komplexů APA/ β_2 -GP I a jejich vazba na fosfolipidový povrch.....	29
Obrázek 5 Rozdělení pacientů dle pohlaví	35
Obrázek 6 Rozdělení pacientů dle testu aPTT	35
Obrázek 7 Rozdělení pacientů dle patologického a normálního aPTT.....	36
Obrázek 8 Rozdělení pacientů na základě positivity APA u patologického aPTT	36
Obrázek 9 Rozdělení pacientů na základě positivity APA u normálního aPTT.....	37

Seznam tabulek

Tabulka 1 Frekvence výskytu antifosfolipidových protilátek v běžné populaci.....	10
Tabulka 2 Onemocnění provázená výskytem antifosfolipidových protilátek.....	11
Tabulka 3 Přídatné rizikové faktory pro klinickou manifestaci APS podle mezinárodního konsenzu.....	14
Tabulka 4 Hodnoty APA vyšetřovaných pacientů, kteří měli patologické aPTT s pozitivním LA	34