

Antifosfolipidový syndrom v roce 2009

A. Buliková, J. Zavřelová, M. Penka

Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc.

Souhrn: Antifosfolipidový syndrom představuje trombofilní dispozici charakterizovanou cévními okluzemi a/nebo těhotenskou morbiditou za přítomnosti antifosfolipidových protilátek. Tyto autoprotiilátky představují velkou a heterogenní skupinu cirkulujících imunoglobulinů, které jsou rozpoznávány jako protilátky antikardiolipinové, jako protilátky namířené proti β 2-glykoproteinu I nebo jako lupus antikoagulans. Doposud byla navržena řada diagnostických kritérií pro antifosfolipidový syndrom. V tomto přehledu jsme se zaměřili na dlouhý proces vývoje diagnostických metod a směry budoucího vědeckého výzkumu tohoto problému.

Klíčová slova: antifosfolipidový syndrom – diagnóza

Antiphospholipid syndrome in the year 2009

Summary: Antiphospholipid syndrome is a prothrombotic disorder characterized by vascular occlusions and/or pregnancy morbidity in the presence of antiphospholipid antibodies. These autoantibodies represent a large and heterogeneous family of circulating immunoglobulins usually identified as anticardiolipin antibodies and antibodies directed against β 2-glykoprotein I or as lupus anticoagulant. A number of criteria for diagnosis of antiphospholipid syndrome have been proposed. In this review, we focused on long-term process of diagnostic procedures development and future directions in scientific research in this field.

Key words: antiphospholipid syndrome – diagnosis

Přehled dosavadních klasifikačních doporučení u antifosfolipidového syndromu

Antifosfolipidový syndrom (APS) patří k nejčastějším získaným trombofilním dispozicím [1]. Jde o klinicko-laboratorní jednotku s výskytem antifosfolipidových protilátek a současně přítomných klinických projevů. Byl popsán Hughesem [2] v roce 1983, v laboratorní diagnostice upřesněn ve spolupráci s Harrisem v roce 1986 [3], ale v kontextu tehdejších poznatků, které připisovaly hlavní roli sérologické diagnostice, byl nazván syndromem antikardiolipinovým. Je tomu právě 20 let, co několik prací jednak shrnulo možné klinické projevy u nemocných s výskytem antifosfolipidových protilátek (APA), dalo do souvislosti výši titru protilátek a klinickou manifestací [4,5], přinášelo informaci o výskytu této nosologické jednotky i u nemocných bez systémového onemocnění [6,7] a použilo poprvé pojem primární antifosfolipidový syndrom (PAPS). Z tohoto pohledu je možné rok 2009 charakterizovat jako „malé výročí“, naplněné úsilím nejen o roz-

poznání patofyziologických mechanismů na cestě od průkazu autoprotiilátky ze skupiny antifosfolipidových ke klinickým projevům, ale zejména úsilí o nastavení jasných kritérií pro správnou diagnózu této klinicko-laboratorní jednotky.

Na základě svých vlastních zkušeností stanovili první předběžná kritéria APS u nemocných u systémového lupus erythematosus (SLE) autoři ze skupiny kolem Donata Alacróna-Segovii [8]. Tato kritéria jsou shrnuta v tab. 1. O rok později Piette et al [9] stanovili kritéria, za nichž lze vyloučit PAPS a je nutno uvažovat o rozvoji systémového onemocnění (tab. 2). Jejich systém se zdá užitečným i dnes při rutinní péči o nemocné s antifosfolipidovými protilátkami. První ucelené diagnostické schéma APS vzniklo z workshopu, který navazoval na 8. mezinárodní konferenci o antifosfolipidových protilátkách v Sapporu v roce 1998 [10]. Tato kritéria doznala širokého klinického uplatnění a jejich hodnocení bylo uplatněno v řadě klinických hodnocení, jejichž výsledky jsou v klinické praxi doposud široce využívány (tab. 3).

Poslední revize diagnostických kritérií navazovala na 11. mezinárodní kongres o antifosfolipidových protilátkách v Sydney v roce 2004 [11]. Přehled předkládá tab. 4. Doporučení

Tab. 1. Klasifikační kritéria APS podle Alacróna-Segovii et al [8].

Definitivní APS

- 2 a více klinických projevů:
 - rekurentní ztráta plodu
 - venózní trombóza
 - arteriální okluze
 - ulcerace dolních končetin
 - livedo reticularis
 - hemolytická anémie
 - trombocytopenie
- vysoká hladina APA (IgG nebo IgM > 5 SD)

Možný APS

- jedna klinická manifestace a vysoká hladina APA nebo
- 2 a více klinických manifestací a nízká hladina APA (IgG nebo IgM > 2, ≤ 5 SD)

SD – směrodatná odchylka,
APA – antifosfolipidové protilátky
(z kontextu původní publikace vyplývá, že jde o protilátky proti kardiolipinu – ACLA)

Tab. 2. Vylučovací kritéria primárního antifosfolipidového syndromu dle Pietta et al [9].

Klinická kritéria	Laboratorní kritéria
tvářový exantém, diskoidní exantém	trvalá proteinurie > 0,5 g/den z důvodu biopsicky ověřené imunokomplexové glomerulonefritidy
ulcerace v ústech a hltanu (ulcerace nosního septa či perforace jsou přípustné)	lymfopenie méně než $1,0 \times 10^9/l$
klinicky zjevná artritida	protilátky proti nativní DNA prokázané RIA nebo imunofluorescenčně
pleuritida bez přítomnosti plicní embolie či levostranného srdečního selhávání	protilátky proti extrahovatelnému jadernému antigenu
perikarditida bez přítomnosti infarktu myokardu či urémie	antinukleolární protilátky v titru více než 1 : 320
léčba medikamenty, o nichž je známo, že indukují tvorbu antifosfolipidových protilátek	nález LE buněk v serózním výpotku

Je doporučeno nejméně 5leté sledování pacientů.

Tab. 3. Klinická klasifikace APS podle Sapporo kritérií [10].

Klinická kritéria	Příznaky
trombózy	– jedna a více arteriální a/nebo venózní trombóza – trombóza malých cév v jakékoli tkáni či orgánu prokázaná jasně klinicky, dopplerem nebo histopatologicky (v tomto případě bez známek zánětu cévy)
poruchy těhotenství	– 3 a více nevysvětlitelných následných samovolných potratů před 10. týdnem gestace s vyloučením anatomických, genetických nebo hormonálních příčin – jedno nebo více nevysvětlitelných odúmrtí morfologicky normálního plodu v 10. a vyšším týdnu gravidity s tím, že morfologie plodu byla dokumentována ultrasonograficky nebo přímým vyšetřením plodu – jedno nebo více předčasných narození morfologicky zdravého novorozence ve 34. týdnu či dříve spojeném s těžkou preeklampií nebo těžkou insuficiencí placenty
Laboratorní kritéria	Nálezy
ACLA	– IgG a/nebo IgM izotypu jsou přítomny ve středním nebo vysokém titru, prokázány 2- a vícekrát v odstupu 6 a více týdnů, jsou vyšetřeny standardizovaným typem ELISA pro průkaz na $\beta 2$ -glykoproteinu I závislých ACLA protilátek
lupus antikoagulans	– prokázán 2- a vícekrát v odstupu 6 a více týdnů – detekce je provedena dle doporučení SSC Subcommittee pro lupus antikoagulans/fosfolipidově závislé protilátky v následujících krocích: – průkaz prodloužení fosfolipidově závislého screeningového testu – nedochází ke korekci normální plazmou chudou na destičky – zkrácení nebo korekce testu po přidání nadbytku fosfolipidů – vyloučení jiných poruch krevního srážení (především inhibitor FVIII a heparin)

Jistá diagnóza APS je v případě naplnění jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria. Kategorie „možného“ nebo „pravděpodobného“ APS nebyly na tomto sympoziu definitivně ustanoveny.

upřesňuje, za jakých okolností může být diagnóza klinické manifestace potvrzena. Mezinárodní konsenzus navíc určuje časové rozhraní mezi klinickou manifestací a průkazem autoprotilátek připouštějící kauzální souvislost, a tudíž diagnózu APS – je to nejméně 12 týdnů (umožňující opakovaný průkaz protilátek) a nejvíce 5 let. Je také doporučeno rozlišovat případy, u nichž je zjištěn další rizikový faktor klinické manifestace, a ty, u nichž takováto příčina nalezena nebyla. Přídavné rizikové faktory shrnuje tab. 5.

Experti se navíc shodli v názoru, že je účelné rozlišovat mezi nemocnými skupiny, podle nichž byla stanovena laboratorní diagnóza antifosfolipidového syndromu. Kombinovaný průkaz různých antifosfolipidových protilátek má totiž vyšší asociaci s trombotickými komplikacemi. Klasifikaci upřesňuje tab. 6. Naopak rozlišení primárního a sekundárního antifosfolipidového syndromu nepřináší pro klasifikaci žádnou výhodu.

Toto poměrně striktní vymezení diagnostických kritérií má své důvody. Některé publikace totiž uvádí, že poměrně nízký počet nemocných dlouhodobě léčených antikoagulační léčbou z indikace APS ve skutečnosti má jasně potvrzenou definitivní diagnózu syndromu, a mohou proto být takto léčeni neoprávněně [12].

Pro diagnózu APS revidovaný mezinárodní konsenzus [11] nedoporučuje hodnotit jako projev trombotické manifestace, a tudíž použít jako nezávislé klinické kritérium pro klinickou manifestaci antifosfolipidového syndromu následující stavy, bez ohledu na jejich častý výskyt v přítomnosti antifosfolipidových protilátek:

- s APA asociovanou chorobu srdečních chlopní – echokardiografická detekce postižení mitrální a/nebo aortální chlopně regurgitací a/nebo stenózou; definované postižení chlopně – ztlustění > 3 mm, lokalizace ztlustění v proximální nebo střední části, nepravidelné nodulace na síňové straně mitrální chlopně a na vaskulární straně

aortální chlopně, případně histopatologický nálezn Libmanovy-Sacksovy endokarditidy u pacientů se SLE (vyloučení anamnézy revmatické horečky, infekční endokarditidy)

- s APA asociovaným livedo reticularis – rozlišují se 4 typy – jemné (< 10 mm) pravidelné livedo regularis, velké (≥ 10 mm) pravidelné livedo regularis, jemné nepravidelné livedo racemosa a velké livedo racemosa (vyloučení zánětlivých cévních změn)
- s APA asociovaná nefropatie – trombotická mikroangiopatie zahrnující arterioly a glomerulární kapiláry a/nebo fibrózní intimální hyperplazie s tromby s nebo bez rekanalizace, fibrózní a/nebo fibrocytární okluze arterií a arteriol, fokální kortikální atrofie, příp. tubulární tyroidizace (tj. morfologie napodobující strukturu štítné žlázy) – velké zóny atrofických glomerulů s eozinofilním obsahem (současně vyloučena vaskulitida, trombotická trombocytopenická purpura, hemolyticko-uremický syndrom, maligní hypertenze)
- s APA asociovaná trombocytopenie – počet trombocytů < 100 × 10⁹/l nejméně 2krát v odstupu 12 a více týdnů (vyloučení trombotické trombocytopenie purpury, diseminované intravaskulární koagulace a heparinem indukované trombocytopenie), je doporučována subklasifikace na stavy provázející systémový lupus erythematosus a pacienty bez této diagnózy.

Laboratorní diagnostika antifosfolipidového syndromu

Sérologická diagnostika

Ačkoli od prvního popisu antifosfolipidových protilátek Harrisem včetně doporučených metod detekce v roce 1983 [13] byla stále snaha o standardizaci vyšetření [14–18], není možné ani dnes označit detekci APA za spolehlivou. V oblasti sérologické diagnostiky přineslo zavedení diagnostických schémat [6,10,11] jistý pokrok; byla zavedena detekce protilátek proti β₂-glykoproteinu I (antiβ₂-GPI) jako standardní vyšetření a taktéž upřesněn

Tab. 4. Revidovaná kritéria antifosfolipidového syndromu (Sydney 2004) [11].

Klinická kritéria

trombózy tromboza	– jedna či více klinických manifestací arteriální nebo venózní trombózy, případně trombózy malé cévy v 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 – 3 a více nevysvětlitelných následných spontánních potratů před 10. týdnem těhotenství po vyloučení anatomických či hormonálních abnormit matky a po vyloučení chromozomálních abnormit rodičů

Laboratorní kritéria

LA	– je prokázán v plazmě 2- a vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů – je detekován podle doporučení Mezinárodní společnosti pro trombozu a hemostázu
ACLA	– je prokázán v séru či plazmě, IgG či IgM izotopu, ve středním a vysokém titru (tj. > 40 GPL či MPL nebo > 99. percentil), je prokázán 2- a vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů, je měřen standardizovaným typem ELISA metody
antiβ ₂ -GP I	– je prokázán v séru či plazmě, IgG či IgM izotopu (titr > 99. percentil), je prokázán 2- a vícekrát v časovém odstupu 12 a více týdnů standardizovaným typem ELISA podle doporučeného postupu

Pro diagnózu je nutné splnění nejméně jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria.

LA – lupus antikoagulans, ACLA – antikardiolipinové protilátky, antiβ₂-GP I – protilátky proti β₂-glykoproteinu I, GPL – fosfolipidové jednotky ve třídě IgG, MPL – fosfolipidové jednotky ve třídě IgM

Tab. 5. Přídavné rizikové faktory pro klinickou manifestaci APS dle mezinárodního konsenzu (Sydney 2004) [11].

věk	muži > 55 let, ženy > 65 let
rizikové faktory kardiovaskulární	– hypertenze – diabetes mellitus – zvýšení LDL- nebo snížení HDL-cholesterolu – kouření cigaret – rodinná anamnéza předčasného výskytu kardiovaskulárního onemocnění – body mass index ≥ 30 kg/m ² – mikroalbuminurie – průkaz glomerulární filtrace < 60 ml/min
vrozené trombofilie	– zejména Leidenská mutace FV
získané rizikové faktory trombózy	– hormonální kontraceptiva – nefrotický syndrom – maligní onemocnění – imobilizace – operace

Tab. 6. Podskupiny u antifosfolipidového syndromu dle laboratorních kritérií [10].

skupina I	je přítomno více než 1 laboratorní kritérium v jakékoli kombinaci
skupina IIa	izolovaný průkaz lupus antikoagulans
skupina IIb	izolovaná přítomnost antikardiolipinových protilátek
skupina IIc	izolovaná přítomnost protilátek proti β 2-glykoproteinu I

způsob stanovení včetně nastavení „cut-off“ limitů pro jednotlivé typy pozitivních nálezů [11].

Zejména poměrně vágní nastavení „středních nebo vyšších hladin“ ACLA ze Sapporo kritérií ustoupilo konkrétním hodnotám, byť bylo zavedeno

dvojí možné nastavení. Kolem nových kritérií ze Sydney se v posledních 2 letech rozproudila poměrně široká diskuze, která si klade za cíl vyjasnit váhu pozitivních nálezů ve vztahu ke klinickým projevům. Jedním z prvních, kdo tuto debatu zahájili, byli Swadzba et al

[19], kteří zjistili, že revidovaná kritéria jsou více senzitivní, ale méně specifická a nejvyšší riziko trombózy přináší kombinovaný nález lupus antikoagulans (LA) a anti β 2-GPI ve třídě IgG, resp. i LA a protilátky proti kardiolipinu (ACLA) ve třídě IgG. Navíc prokázali, že je-li za pozitivní výsledek ACLA považována hodnota přesahující 99. percentil (v jejich práci 26 GPL a 27 MPL), jde o hodnoty zřetelně nižší nežli arbitrálně stanovené hladiny > 40 GPL či MPL, čímž se toto kritérium opět stává méně specifické pro diagnózu APS. K podobným závěrům dospěla i Ame-

Tab. 7. Publikovaná doporučení pro testování lupus antikoagulans [28,29].**ISTH**

Kritéria: každý vzorek by měl splnit následující:

1. prodloužení nejméně 1 testu závislého na fosfolipidech
2. průkaz inhibiční aktivity vlivem působení plazmy pacienta na plazmu normální
3. průkaz, že inhibiční aktivita je závislá na fosfolipidech
4. LA musí být pečlivě rozlišeny od jiných koagulopatií s podobným laboratorním výsledkem, které se mohou vyskytnout v podobných situacích jako LA. K rozlišení může napomoci vyšetření specifických inhibitorů a posouzení klinické situace.

Doporučení:

1. Počet trombocytů v normální plazmě i plazmě pacienta musí být tak nízký, jak je to možné (< 10 G/L).
2. 2 a více testů musí být použito pro screening, nejméně 1 by měl být založen na nízké koncentraci fosfolipidů, testy by měly být založeny na různých principech (dRVVT, daPTT).
3. Je nutné předchozí nastavení specifity a senzitivity směsných testů před jejich rutinním použitím.
4. Použití konfirmačních testů je obligatorní; není možné prokázat přítomnost inhibitoru jen použitím více screeningových testů a jejich směsných studií.
5. Konfirmační test musí být založen na stejném principu jako test screeningový, který byl zjištěn jako abnormální.
6. Rutinní testy, jako je PT a aPTT, musí být současně provedeny k vyloučení jiné koagulopatie, TT je přínosný k vyloučení vlivu heparinu.
7. Vyšetření protilátek v solidní fázi (ACLA) by nemělo být považováno za konfirmaci LA.
8. Vyšetření aktivity faktorů je indikováno vždy, jakmile je podezření na přítomnost specifického inhibitoru; 2 a více ředění by měla být použita pro stanovení každého faktoru.
9. Termín lupus antikoagulans by měl být vyhrazen pro inhibitory, jejich patofyziologie je plně objasněna.

BCSH

Kritéria: Kritéria ISTH z roku 1995 zůstávají nezměněna.

Zahrnují:

1. prodloužení testu závislého na fosfolipidech
2. průkaz inhibitoru směsnými studii
3. konfirmaci fosfolipidové závislosti inhibitoru

Doporučení:

1. Je potřeba věnovat pozornost podmínkám preanalytické fáze.
2. Koagulační screening by měl být proveden k určení neočekávaného deficitu faktoru či antikoagulačního působení.
3. aPTT by mělo být použito jako test screeningový, musí být použito citlivé reagensie.
4. Je-li aPTT prodlouženo, je často přínosné provedení směsné studie a/nebo PNP.
5. Je nutné použít druhý screeningový test; preferenčně KCT nebo dRVVT spolu s korekcí.
6. Je-li výsledek tohoto testování nepřesvědčivý, je vhodné použít další test založený na jiném principu, tj. test s použitím jiného jedu či TTI.
7. Imunologické stanovení pro IgG a IgM ACLA (a/nebo anti- β 2-GPI protilátky) musí být taktéž provedeno.

aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový test, ACLA – antikardiolipinové protilátky, anti- β 2-GPI – protilátky proti β 2-glykoproteinu I, PT – protrombinový test, TT – trombinový test, dRVVT – ředěný test s jedním Russelovy zmijs, KCT – kaolinový test, LA – lupus antikoagulans, TTI – inhibitor tkáňového tromboplastinu, PNP – destičkový neutralizační test, ISTH – Mezinárodní společnost pro trombózu a hemostázu (International Society on Thrombosis and Haemostasis), BCSH – Britský výbor pro standardizaci v hematologii (British Committee for Standardization in Haematology)

lia Ruffatti [20]. Prokázala, že je-li pozitivita pouze v ACLA IgG, liší se při definování jedním či druhým způsobem 83,3% vzorků, je-li současná pozitivita s LA nebo s anti β 2-GPI IgG, pak se liší jen 26,1% vzorků a žádný rozdíl nebyl nalezen při stanovení hladin v případě, že byl současný průkaz všech 3 typů autoprotilátek. Navíc ale zdůraznila, že zatímco je jasná asociace mezi klinickou manifestací trombózy a titry ACLA > 40 GLP, zcela jiná je situace ve vztahu k poruchám gravidity, kde je klinická manifestace u hladin < 40 GPL běžná. Navrhuje užívat rozdílné nastavení cut-off pro predikci rizika trombózy a jiné pro těhotenskou morbiditu. Debata zkušených odborníků v této současné době pokračuje [21–24]. Názory jsou poměrně odlišné. Poměrně razantní změny navrhuje skupina kolem Moniky Galli [21], která doporučuje zrušit úplně vyšetřování ACLA a u anti- β 2-GPI protilátek vyšetřovat jen IgG třídu. Zdá se, že zrušení vyšetřování ACLA je řadou odborníků hodnoceno jako předčasné [22,23]. Při případném vyšetřování jen IgG třídy anti- β 2-GPI je třeba mít na paměti, že izotyp protilátky se může u některých nemocných v průběhu sledování měnit. Proto je spíše doporučeno vyšetřovat oba izotypy s tím, že protilátky ve třídě IgM je potřeba považovat za spojené s nižším rizikem rozvoje trombotických komplikací.

Sérologická diagnostika APS je špatně standardizována [25]. Nicméně při naplnění „minimálních požadavků“ daných Evropským fórem o antifosfolipidových protilátkách [26], při užívání tzv. Louisvillských kalibrátorů a Koikeho monoklonálních protilátek (HCA, EY2C9) jako kontrolního materiálu, je intra- i intermetodická variabilita příznivá [24]. V této souvislosti je nutné si uvědomit, že v současné době vyšetřuje antifosfolipidové protilátky i v našich podmínkách řada laboratoří. Ty jistě musí procházet systémem externí kontroly kvality, ale v naprosté většině případů klinik nemá mnoho informací o tom, jak je správnost

výsledků z té které laboratoře zajištěna a jaká kritéria ta která laboratoř používá pro „cut-off“ pozitivních a negativních nálezů. V tomto ohledu by měl být ze strany klinických lékařů vyvíjen tlak na to, aby spolu s výsledky nemocného dostávali od laboratoří také informaci o těchto skutečnostech.

Pokrok v sérologické diagnostice v poledních letech směřoval k vývoji metod, které detekují protilátky namířené proti I. doméně β 2-glykoproteinu I (resp. proti epitopu Gly40-arg43), které jsou spojeny s nejvyšším rizikem trombózy a zachycují ty imunoglobuliny, které vedou k fenoménu LA [27].

Diagnostika lupus antikoagulans

Taktéž průkaz LA je poměrně komplikovaný a již řadu let je dán poměrně detailní postup jeho stanovení dle schválení standardizačního výboru Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu (SSC ISTH) [28]. O něco novějším dokumentem je doporučení Britského výboru pro standardizaci v hematologii (BCSH) [29]. Nejdůležitější podmínky obou doporučení shrnuje tab. 7. I tato kritéria jsou v současné době podrobována poměrně rozsáhlé revizi [21]. Několik prací z posledních let analyzovalo, nakolik je diagnostika LA spolehlivá. Dle velké italské studie [30] se nezdá, že by ve specializovaných centrech byl častý průkaz falešně pozitivních výsledků. K preciznímu stanovení může napomoci porovnání s klinickým nálezem u nemocného a taktéž stanovení kompletního profilu APA.

Situace je ještě více komplikovaná, chceme-li provést diagnostiku LA za podmínek antitrombotické léčby. Při použití nefrakcionovaného heparinu nejméně 1/4 laboratoří poskytuje falešně pozitivní výsledky [31–33], a to bez ohledu na skutečnost, že komerčně dostupné reagentie obsahují antiheparinové substance (polybren nebo heparinázu). I když je použit heparin nízkomolekulární (LMWH), nelze s jistotou interferenci vyloučit [32,33]. Je zřejmé, že je potřeba revize původního SSC

ISTH doporučení. V současné době je iniciována práce na vytvoření nových doporučení [32]. Hlavním úkolem pro SSC ISTH v této oblasti je příprava referenčního materiálu pro diagnostiku LA, která je plánována do roku 2010 [32]. Situace je taktéž problematická za okolností nastavení perorální antikoagulační léčby dikumarolovými preparáty. Tuto situaci je navrhováno řešit nejméně 4 způsoby, i když je nutno říci, že žádná z nich není optimální. Jednak je možno vyšetřit LA za 2 týdny po vysazení vitamin K inhibitorů; i když je možnost recidivy v takto krátkém období nízká, nelze ji úplně vyloučit. Převedení na LMWH situaci kompletně neřeší, protože arteficiální ovlivnění tímto preparátem se 100% jistotou vyloučit nelze. Druhou možností je vyšetření na warfarinu s použitím směsi s normální plazmou stejného objemu. Za takovýchto podmínek mohou uniknout stanovení LA nízkého titru. Třetí možností je stanovení poměru časů testů dvou hadích jedů, z nichž první je a druhý není závislý na fosfolipidech – poměr času textarinového a ekarínového [34]. I když z vlastních zkušeností víme, že tento test je pro diagnostiku LA použitelný [35], ačkoli zřejmě poměrně náročná diagnostika a špatná možnost standardizace takového vyšetření vyloučila možnost tohoto testování z rutinní laboratorní praxe. Další možností je sériové vyšetření při vysokých a nízkých koncentracích fosfolipidů [36]. Fakt, který umožňuje tuto možnost použít, spočívá ve skutečnosti, že prodloužení koagulačního testu způsobené přítomností LA je zřetelně ovlivněno zvýšenou koncentrací fosfolipidů. Zkrácení koagulačního testu navozené fosfolipidy není závislé na prodloužení běžného koagulačního testu navozeného užíváním inhibitorů vitaminu K [35]. Všechny tyto závislosti je nutno dát do kontextu s potřebou opakovaného stanovení LA v časovém odstupu 12 týdnů. Navíc nelze pominout skutečnost, že LA je často diagnostikován u nemocných hospitalizovaných na JIP [37], i když pří-

Tab. 8. Klinická manifestace přítomnosti antifosfolipidových protilátek.

Orgán	Projevy
tepny	trombóza aorty, axilární, karotid, jaterní, ileofemorální, mezenterická, pankreatická, popliteální, splenické či podklíčkové arterie apod.
žíly	hluboká žilní trombóza na dolních končetinách, trombóza adrenální, Budd-Chiariho syndrom, trombóza portální, mezenterická, trombóza v. cava inf. apod.
kardiální postižení	angina pectoris, infarkt myokardu, intrakardiální tromby, periferní embolizace, ateroskleróza, s APA asociovaná choroba srdečních chlopní
kožní postižení	s APA asociované livedo reticularis, superficiální tromboflebitida ⁺ , nekrotizující vaskulitida, livedoridní vaskulitida, kožní ulcerace, akrální ischemie, kožní infarkty, syndrom modrého prstu a akrocyanóza, superficiální gangréna, purpura, ekchymózy, podkožní nodulace
postižení endokrinních a reprodukčních orgánů	infarkty nadledvinek, Addisonova choroba, infarkty testikulární, infarkty nadvarlete, infarkty prostaty, nekróza pituitární, hypopituitarismus, některé případy Sheehenova syndromu
gastrointestinální postižení	infarkty jater, infarkty střeva, sleziny, perforace esofagu, ischemická kolitida, pankreatitida, infarkty žlučníků bez cholecystolitídy, ascites
neurologické komplikace	tranzitorní ischemická ataka, dokonaná cévní mozková příhoda chorea, křeče*, demence na podkladě mnohočetných infarktů (Sneddonův syndrom), transversální myelitida*, encefalopatie, pseudotumor cerebri, trombóza žilního splavu, mnohočetná mononeuritida, amaurosis fugax, postižení kognitivních funkcí*, syndrom napodobující sclerosis multiplex*, psychóza*
porodnické komplikace	ztráta plodu*, intrauterinní retardace plodu, HELLP syndrom, oligohydramnion, uteroplacentární insuficience, preeklampsie, primární sterilita*
plicní projevy	plicní embolie, plicní hypertenze, plicní arteriální trombóza či hemoragie, syndrom akutního respiračního selhání, alveolární hemoragie
ledvinné postižení	trombóza ledvinné žíly, tepny, infarkty ledviny, hypertenze, akutní ledvinné selhání, chronické ledvinné selhání, proteinurie, hematurie, nefrotický syndrom, trombotická mikroangiopatie, hypertenze
oční postižení	trombóza retinální arterie, žíly, amaurosis fugax, retinitis, vaskulární retinopatie, chordopatie, neuropatie n. opticus
hematologické změny	trombocytopenie*, trombocytopenie*, antitrombocytární protilátky*, hemolytická anémie*, senzibilizace erytrocytů v PAT a bromelinovém testu bez hemolýzy*, hemolyticko-uremický syndrom, trombotická trombocytopenická purpura
jiné	artralgie, avaskulární nekróza kostí*, perforace nosního septa

* není klinické kritérium antifosfolipidového syndromu, *předpokládá se minimálně spoluúčast jiného nežli trombotického mechanismu, HELLP – hemolysis, elevated liver enzyme, low platelet count, PAT – přímý antiglobulinový test

činy tohoto pozorování nejsou ve všech souvislostech vyjasněny.

I poslední mítink SSC ISTH ve Vídni v červenci roku 2008 se problematikou diagnózy LA intenzivně zabýval. V oblasti preanalytické přípravy byl řešen zejména vliv koncentrace citráty sodného (0,109 či 0,129 M) při odběru vzorků krve, podobně jako vliv zbytkových trombocytů či jejich části při preanalytickém zpracování vzorku [38]. Protože vliv koncentrace citráty byl zjištěn jen výjimečně, mítink k němu nezaujal žádné jasné stanovisko. Plazma používaná k detekci LA by měla být přísně bezdestičková, připravená nejlépe dvojitou centrifugací; alternativně lze použít filtraci plazmy s membránovými póry < 0,22 μm,

i když i o tomto způsobu bylo diskutováno a nelze vyloučit ovlivnění aktivity F VIII, von Willebrandova faktoru, fibrinogenu a F IX v takto připravených vzorcích. Je-li provedeno vyšetření v časovém odstupu, je nutné provést zmrazení vzorku tak rychle, jak je to jen možné v tekutém dusíku, a vzorky uchovávat při -80 °C. Před vyšetřením je třeba vzorky rozpustit ve vodní lázni do úplné homogenizace plazmy. Jako první stupeň detekce je doporučen screening nejméně 2 testy; nejčastěji je doporučováno použití 2 testů se sníženým obsahem fosfolipidů; jednak testu s jedním z Russelovy zmiže (dRVVT), který je asociován s nejvyšším rizikem trombotických komplikací, je vysoce senzitivní a přitom má rela-

tivně nízkou variabilitu. Jako druhý test je doporučován test na bázi aktivovaného parciálního tromboplastinového testu (aPTT), a to za předpokladu, že je proveden za přítomnosti siliky jako aktivátoru a nízkého obsahu fosfolipidů. Standardizační výbor nedoporučil kaolinový čas pro problematické chování při automatickém zpracování, aPTT s obsahem kyseliny elagové jako aktivátoru, neboť toto uspořádání je k přítomnosti LA necitlivé, a navíc nedoporučil rutinní užívání ředěného testu na bázi protrombinového času pro jeho variabilitu, podobně jako poměru času textarinu/ekarinu pro chybění komerčně dostupných reagentů. Tato doporučení znamenají jistý pokrok v názorech a zkušenostech

při srovnání s doporučeními z předchozích let a jsou jistou známkou potřeby revize i způsobu diagnostiky LA [21]. Je-li prováděno testování přítomnosti LA za antikoagulační léčby dikumarolovými preparáty, je nejčastěji používaným řešením diluce vzorku nemocného stejným objemem normální plazmy, která však musí mít tytéž vlastnosti, jaké jsou podmínkou preanalytického zpracování vzorku pacienta (tj. bezdestičková, s normálním obsahem koagulačních faktorů). Vyšetřování tímto způsobem by nemělo proběhnout u nemocných, u nichž je antikoagulační léčba nastavena mimo spolehlivě ovlivnitelné rozmezí, zahrnující hodnoty INR < 1,5 a > 3,0. V této době byla publikována zpráva o tom, jak různé laboratoře naplňují publikovaná doporučení pro testování lupus antikoagulans inhibitorů [40]. Většina laboratoří akceptuje doporučení použití bezdestičkové plazmy, použití 2 a více screeningových testů a nepoužívání sérologických metod ke confirmaci LA. Nicméně akceptace doporučení často selhává v detekci deficitu faktorů či přítomnosti jejich inhibitorů jako příčiny abnormality bazálních testů koagulace. Zejména fakt, že většina laboratoří neprovádí testování aktivity faktorů vnitřního systému, i když je prokázána korekce ve směsných studiích, je informací k zamyšlení. Krok diagnostiky LA, který zahrnuje právě směsné testování, se zdá být jedním z nejproblematictějších [41]. Podobně jako u jiných laboratorních nálezů se zdá být nejdůležitějším nastavení vlastních „cut-off“ v posouzení pozitivních a negativních nálezů.

Není úplně jasné, zda lze rozlišovat „silné“ a „slabé“ inhibitory, resp. zda má klinický význam nějakým způsobem LA kvantifikovat. Předpokládá se, že by toto mohlo být užitečné pro stratifikaci pacientů dle rizika. K určení titru LA lze použít monoklonální protilátky namířené proti antiβ2-GPI protilátkám s LA aktivitou nebo plazmy s purifikovaným IgG od pacientů testovaných pozitivně na LA [42]. Jiní jako „silné“

Tab. 9. Klinické spektrum manifestací antifosfolipidových protilátek [44].

- asymptomatická přítomnost antifosfolipidových protilátek
- antifosfolipidový syndrom s cévní manifestací
- katastrofický antifosfolipidový syndrom
- antifosfolipidový syndrom s výlučně gestační manifestací
- asymptomatická* pozitivita antifosfolipidových protilátek s netrombogenní manifestací

*bez manifestace trombózy nebo poruch těhotenství dle Sapporo kritérií

inhibitory označují ty inhibitory s LA aktivitou, které jsou detekovány více než jedním způsobem (např. pozitivita dRVVT a současně PTT-LA) [19].

Klinické projevy působení antifosfolipidových protilátek

Klinická manifestace antifosfolipidového syndromu je pestrá. Kterýkoli orgán, systém či tkáň mohou být v zásadě postiženy (přehled v tab. 8). Jak se v poslední době rozvíjejí poznatky u možném působení antifosfolipidových protilátek na tkáň, dochází k akumulaci důkazů o tom, že řada symptomů a projevů, jež jsou s výskytem APA asociovány, mají svůj původ v přímém ovlivnění buňky cestou buněčných receptorů, případně nepřímo zásahem do imunitních reakcí, a nejsou výsledkem cévní okluze.

Jaké jsou podmínky řešení nemocného s průkazem tohoto autoimunitního procesu od podrobného klinického vyšetření přes využití metod zobrazovacích až po relativně detailní laboratorní stanovení řady parametrů, které mají přinést ucelený pohled nejen na rozsah postižení navozeného APA, ale i k zjištění eventuální příčiny rozvoje protilátek, jsme již v tomto časopise referovali dříve [43]. Široké klinické spektrum manifestace antifosfolipidových protilátek lze rozdělit do několika poměrně ucelených oblastí (tab. 9) [44]. Riziko trombózy, ať již častější žilní nebo méně časté arteriální, je udáváno poměrně různě, obvykle v závislosti na tom, jaký typ antifosfolipidové protilátky, resp. jejich kombinací, byl analyzován [45]. Nejvyšší riziko komplikací se zdá být spo-

jeno s kombinovaným výskytem LA a ACLA IgG a/nebo antiβ2-GPI IgG [19,20,45]. Při predikci rizika je vždy nutné vzít v úvahu okolnosti, za nichž se APA manifestují (tab. 5) [11]. Teoreticky jsou k dispozici testy, které ještě více riziko trombózy upřesňují, nicméně v našich podmínkách není řada z nich součástí rutinní diagnostiky. Na čem se literatura poměrně shoduje, je fakt, že v případě APS antitrombotická léčba nejčastěji dikumarolovými preparáty selhává častěji i při účinném nastavení, nežli je tomu u jiných trombotických dispozic [46–48].

Co lze očekávat u APS v nejbližší budoucnosti?

Přes nesporný pokrok k poznání patofyziologie působení antifosfolipidových protilátek v posledních letech, při kterém lze očekávat teoreticky příznivý dopad do léčebného využití, zůstává v této problematice mnoho otázek a problémů k řešení.

První oblastí je diagnostika různých typů antifosfolipidových protilátek, jejich standardizace a klinický význam jejich průkazu. Bez ohledu na potřebu aktualizace běžně doporučených postupů pro stanovení lupus antikoagulans, protilátek proti kardioproteinu I, jejich tříd, standardizace, určení cut-off či použití referenčních materiálů, bez ohledu na nutnost určení významu zpřesněné diagnostiky nasměrování APA vůči konkrétním cílovým epitopům [27], otevírá se téměř „pole neorané“ v oblasti tzv. specifických protilátek proti fosfolipidům. I když tyto nejsou v tuto chvíli zavzaty

Tab. 10. Projekty Evropského fóra k tématu antifosfolipidové protilátky [52].

Téma	Tým	Problém
etiologie – zánět	Borghi et al	výzkum mediátorů zánětu a signálních cest
vztah k SLE	Meroni et al	výzkum „SLE-related“ genů (IRF5, STS4) u PAPS
infekce	Shoenfeld et al	prevalence séropozitivity infekčních chorob
vitamin D	Shoenfeld et al	kdo potřebuje suplementaci a jaké dávky
komplement	Meroni et al	zapojení proinflamatorních cytokinů a komplementu
diagnostika	de Laat et al	verifikace úlohy protilátek proti I. doméně β 2GPI
ateroskleróza	Meissner et al	sérologické parametry APS ve vztahu k ateroskleróze
STEP projekt	Pengo et al	TEE detekce změn na chlopních u pacientů s PAPS a prokázanou mozkovou ischemií
avidita	Čučník et al	zda je vysoká avidita anti- β 2GPI protilátky nezávislým rizikovým faktorem
séronegativní APS	Velesini, Khamastha	vyšetření za pomoci tenkovrstevné chromatografie u nemocných s klinickými příznaky, ale negativní sérologií
CAPS registr	Cervera et al	registr pacientů s katastrofickou formou APS
infertilita	Carp et al	informační databáze prevalence APA u infertilních pacientek
přídavná rizika těhotenské morbidita	Carp et al	multicentrická počítačová databáze přídatných faktorů u těhotenských ztrát včetně karyotypizace embryí
specifické APA	Ulčová et al	vyšetření specifických protilátek proti fosfolipidům u těhotenských ztrát
selhání léčby	Ruffati et al	analýza případů těhotenské ztráty přes zavedenou adekvátní léčbu
děti matek s APS	Boffa et al	dlouhodobé klinické a imunologické sledování dětí, které se narodily matkám s APS
děti matek s APA	Motta et al	neurologické sledování dětí matek s APS
pediatrický SLE	Descloux et al	iniciální symptomy SLE u dětí, dlouhodobé sledování a vliv APA
Ped-APS registr	Avčin et al	prospektivní registr dětí s APS, předpoklad zavedení konsenzuálních diagnostických kritérií pro pediatrii
registry	Avčin et al	porovnání 3 existujících registrů pro APS

SLE – systémový lupus erythematosus, APA – antifosfolipidový syndrom, APS – antifosfolipidové protilátky, PAPS – primární antifosfolipidový syndrom, CAPS – katastrofický antifosfolipidový syndrom, β 2GPI – β 2 glykoprotein I, TEE – transezofageální echokardiografie

do kritérií APS, nelze říci, že zejména v oblasti netrombotických projevů tohoto syndromu nemají žádný význam [49].

V oblasti patofyziologie APS se předpokládá další rozvoj poznatků o procesech zánětu a jeho vlivu na klinické projevy přítomnosti APA. Již několik let je dobře známa úloha systému komplementu a jeho možné role při reprodukčních ztrátách včetně možnosti příznivého antikomplementárního účinku heparinu [50,51].

Do procesů prozánětlivého nastavení i buněčné části imunitní odpovědi u autoimunitních procesů může zasahovat vitamin D a jeho metabolisme [52]. Zdá se, že suplementace vitamínem D ve vyšších dávkách může pozitivně ovlivňovat autoimunitní choroby

spojené s odpovědí Th1 směřovaných lymfocytů (tab. 10).

Klinické studie se budou soustřeďovat na vztah k ateroskleróze, ke kardiogenně podmíněné cerebrální ischemii (projekt STEP), k problematice séronegativního APS, katastrofického APS, ke vztahu k infertilitě a případnému vlivu na děti matek s antifosfolipidovými protilátkami. Navíc je třeba hledat rozdíly v klinické manifestaci APA v dětském a dospělém věku [52] (tab. 10).

V oblasti léčby, resp. i profylaxe klinické manifestace v přítomnosti APA, je třeba hledat více průkazných důkazů pro nevyjasněné problémy. Ačkoli je nejčastěji doporučovanou profylaxí podání kyseliny acetylsalicylové v nízkých dávkách (75–100 mg denně), tzv.

APLASA study [53] neprokázala žádné výhody tohoto postupu. Mnohem častěji je dnes zmiňován vliv příznivého působení antimalarik, i když jejich léčebné využití bylo testováno častěji ve skupině nemocných se systémovým onemocněním [54,55]. V tuto chvíli bude nutno vyčkat, jak se zohlednění přídatných rizikových faktorů (tab. 5) podle revidovaného diagnostického konsenzu [11] odrazí na výsledcích „na míru šité“ profylaxe nemocných s nálezem APA, kteří doposud nemají klinické projevy. Je možné, že bude nutno brát v úvahu i řadu dalších faktorů, např. získanou rezistenci k proteinu C či hladinu von Willebrandova faktoru, jak na to ukazují některé velmi recentní práce [56]. Nové poznatky o patofyziologii vzniku tohoto autoimunitního

onemocnění, zejména v regulační roli T-lymfocytů, otevírají potenciální možnosti léčby, která by mohla být jednak specifická, jednak kurativní [57].

Literatura

1. Bick RL. Antiphospholipid thrombosis syndrome. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2001; 7: 241–258.
2. Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant. *BMJ* 1983; 287: 1088–1091.
3. Hughes GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13: 486–489.
4. Alacrón-Segovia D, Delezé M, Oria CV et al. Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. A prospective analysis of 500 consecutive patients. *Medicine* 1989; 68: 353–365.
5. Delezé M, Alacrón-Segovia D, Valdéz Macho E et al. Relationship between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in systemic lupus erythematosus patients and apparently healthy women. *J Rheumatol* 1989; 16: 768–772.
6. Alacrón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989; 16: 482–489.
7. Asherson RA, Khamashta M, Ordi-Ros J. The “primary” antiphospholipid syndrome. Major clinical and serological features. *Medicine* 1989; 68: 366–375.
8. Alacrón-Segovia D, Pérez-Vézquez ME, Villa AR et al. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Sem Arthr Rheumat* 1992; 21: 275–285.
9. Piette JCh, Wechsler B, Frances C et al. Exclusion criteria for primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1993; 20: 1802–1804.
10. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumat* 1999; 42: 1309–1311.
11. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295–306.
12. Dunn AS, Kaboli P, Halfdanarson T et al. Do patients followed in anticoagulation clinics for antiphospholipid syndrome meet criteria for the disorder? *Thromb Haemost* 2005; 94: 548–554.
13. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML et al. Anticardiolipin antibodies detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 55: 1211–1214.
14. Green D, Hougje C, Kazmier FJ et al. Report of the working party on acquired inhibitors of coagulation: Studies of the “Lupus anticoagulant”. *Thromb Haemost* 1983; 49: 144–146.
15. Harris EN, Gharavi AE, Petel SP et al. Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 215–222.
16. Harris EN. The second international anti-cardiolipin standardization workshop/the Kingston antiphospholipid study (KAPS) Group. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 476–484.
17. Barna LK, Triplett DA. A report of the first international workshop for lupus anticoagulant identification. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 557–567.
18. Exner T, Triplett DA, Taberner D et al. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. SSC Subcommittee for the Standardization of lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1991; 65: 320–322.
19. Swadzba J, Iwaniec T, Szczeklik A et al. Revised classification criteria for antiphospholipid syndrome and the thrombotic risk in patients with autoimmune disease. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1883–1889.
20. Ruffatti A, Olivieri S, Tonello M et al. Influence of different IgG anticardiolipin antibody cut-off values on antiphospholipid syndrome classification. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1693–1696.
21. Galli M, Reber G, de Moerloose P et al. Invitation to a debate on the serological criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 399–401.
22. Pengo V. A contribution to the debate on the laboratory criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1048–1049.
23. Swadzba J, Musial J. Letters to the Editor. More on: The debate on antiphospholipid syndrome classification criteria. *J Thromb Haemost*, accepted for publication on 19 December 2008.
24. Ruffatti A, Pengo V. Antiphospholipid syndrome classification criteria: comments to the Letter of Jakub Swadzba and Jacek Musial. *J Thromb Haemost*, accepted for publication on 19 December 2008.
25. Pengo V, Biasiolo A, Bison E et al. Italian Federation of Anticoagulation Clinics (FCSA). Antiphospholipid antibody ELISAs: survey on the performance of clinical laboratories assessed by using lyophilized affinity-purified IgG with anticardiolipin and anti-beta2-Glycoprotein I activity. *Thromb Res* 2007; 120: 127–133.
26. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G et al. Minimal requirements for antiphospholipid antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114: 553–558.
27. de Laat B, Derksen RHWM, Urbanus RT et al. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of β 2-glycoprotein I cause LAC and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* 2009; 105: 1540–1545.
28. Brandt JT, Triplett DA, Alving B et al. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185–1190.
29. Greaves M, Cohen H, Machin SJ et al. In behalf of the Haemostasis and Thrombosis Task Force of British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2000; 109: 704–715.
30. Pengo V, Biasiolo A, Gresele P et al. Survey of lupus anticoagulant diagnosis by central evaluation of positive plasma samples. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 925–930.
31. Tripodi A, Biasiolo A, Chantarangkul V et al. Lupus anticoagulant (LA) testing. Performance of clinical laboratories assessed by a national survey employing lyophilized affinity-purified immunoglobulin with LA activity. *Clin Chem* 2003; 49: 1608–1614.
32. Pengo V. A contribution to the debate on the laboratory criteria that define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1048–1049.
33. Tripodi A. More on: criteria to define the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1049–1050.
34. Triplett DA, Stocker KF, Unger GA et al. The textarin/ecarin ratio: confirmatory test for lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 1993; 70: 925–93.
35. Zavřelová J, Matýšková M, Buliková A. Textarinový čas v diagnostice lupus anticoagulans. *Sborník přednášek – Pracovní dny laboratorní hematologie. Hradec Králové* 1998: 61.
36. Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M et al. Laboratory diagnosis of lupus anticoagulants for patients on oral anticoagulant treatment. Performance of dilute Russell viper venom test and silica clotting time in comparison with Staclot LA. *Thromb Haemost* 2002; 88: 583–586.
37. Wenzel C, Stoiser B, Locker GJ et al. Frequent development of lupus anticoagulants in critically ill patients treated intensive care conditions. *Crit Care Med* 2002; 30: 763–770.

38. Pengo V. Lupus anticoagulat/phospholipid-dependent antibodies. SSC ISTH Vienna, Austria 3 July 2008; on line publication in ISTH SSC web pages.
39. Favaloro EJ. Preanalytical variables in coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18: 86–86.
40. Moffat KA, Ledford-Kraemer ME, Plumhoff EA et al. Are laboratories following published recommendations for lupus anticoagulant testing? *Thromb Haemost* 2009; 101: 178–184.
41. Chang S. More on: normal plasma mixing studies in the laboratory diagnosis of lupus anticoagulant. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1480–1481.
42. Tripodi A. Laboratory testing for Lupus anticoagulants: A review of issues affecting results. *Clin Chemistry* 2007; 53: 1629–1635.
43. Buliková A, Penka M. Antifosfolipidový syndrom – diagnostika a léčba. *Vnitř Lék* 2005; 51: 809–817.
44. Erkan D, Lockshin MD. Antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 242–248.
45. Giannakopoulos B, Passam F, Ioannou Y et al. How we diagnose the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2009; 113: 985–994.
46. Ames PRJ, Ciampa A, Margaglione M et al. Bleeding and re-thrombosis in primary antiphospholipid syndrome on oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 2005; 93: 694–699.
47. Wittkowsky AK, Downing J, Blackburn J et al. Warfarin-related outcomes in patients with antiphospholipid antibody syndrome managed in an anticoagulation clinic. *Thromb Haemost* 2006; 96: 137–141.
48. Kearon C, Julian JA, Kovacs MJ et al. Influence of thrombophilia on risk of recurrent venous thromboembolism while on warfarin: results from a randomized trial. *Blood* 2008; 112: 4432–4436.
49. Tebo AE, Jaskowski TD, Phansalkar AR et al. Diagnostic performance of phospholipid-specific assays for the evaluation of antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 870–875.
50. Girardi G, Berman J, Redecha P et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2003; 112: 1644.
51. Girardi G, Redecha P, Salmon JE. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med* 2004; 10: 1222–1226.
52. Rotar Z, Rozman B, deGroot PG et al. Sixth meeting of the European Forum on antiphospholipid antibodies. How to improve the understanding of the antiphospholipid syndrome? *Lupus* 2009; 18: 53–60.
53. Erkan D, Harrison MJ, Levy R et al. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumat* 2007; 56: 2382–2391.
54. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Pijoan JI et al. Effect of antimalarials on thrombosis and survival in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006; 15: 577–583.
55. Rand JH, Wu X-X, Quinn AS et al. Hydroxychloroquine directly reduces the binding of antiphospholipid antibody- β 2-glycoprotein I complexes to phospholipid bilayers. *Blood* 2008; 112: 1687–1695.
56. Neville C, Rauch J, Kassir J et al. Antiphospholipid antibodies predict imminent vascular events independently from other risk factors in a prospective cohort. *Thromb Haemost* 2009; 101: 100–107.
57. Atsumi T. New therapeutic targets for antiphospholipid syndrome. *Blood* 2007; 110: 4141.

MUDr. Alena Buliková, Ph.D.
www.fnbrno.cz
 e-mail: abulik@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 5. 2. 2009