

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Oddělení klinické hematologie

Jana Slívová, DiS.

Lupus antikoagulans a metody vyšetřování

Bakalářská práce

Praha 2014

Autor práce: **Jana Slívová, DiS.**

Vedoucí práce: **RNDr. Iva Bártů Ph.D.**

Oponent práce: **RNDr. Jana Neupauerová**

Datum obhajoby: **2014**

Bibliografický záznam

SLÍVOVÁ, Jana. *Lupus antikoagulans a metody vyšetřování*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Oddělení klinické hematologie ve FN Motol. 2014. 51 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Iva Bártů Ph.D.

Anotace

Tématem bakalářské práce je onemocnění lupus antikoagulans a jeho metody vyšetření. V teoretické části jsou popsány trombofilní stavy, které jsou rozděleny podle vrozených a získaných příčin. Uvedeny jsou také rozdíly mezi arteriálními a venózními trombózami. V další části práce je popsán antifosfolipidový syndrom, což je získaný stav spojený s trombózami a souvisí s výskytem antifosfolipidových protilátek. Těchto protilátek existuje široké spektrum. Vyšetření lupus antikoagulans zahrnuje screeningové, korekční a konfirmační testy, které jsou založeny na průkazu patologie testů závislých na fosfolipidech, na průkazu inhibitoru a fosfolipidové závislosti inhibitoru. K tomu slouží nejčastěji aktivovaný parciální tromboplastinový čas a test s hadím jedem Russellovy zmiije. V textu jsou jednotlivé testy podrobně popsány a jsou zde zahrnuty i nové pokyny a doporučení z roku 2012 v postupu testování lupus antikoagulans.

Praktická část popisuje principy analyzátorů pro stanovení koagulačních časů a průkazu lupus antikoagulans. Zahrnuje postupy měření včetně výsledků testů jednotlivých pacientů. Výsledky jsou statisticky vyhodnoceny. Vzorky byly poskytnuty a měřeny na Oddělení Klinické Hematologie ve fakultní nemocnici Motol v Praze.

Klíčová slova

Trombofilie, Antifosfolipidový syndrom, Lupus antikoagulans, aPTT test, dRVVT test, ACL TOP 700 CTS

Annotation

The bachelor's thesis deals with a disease called lupus anticoagulant and the methods of its examination. The theoretical part of this thesis describes the thrombophilic states divided according to either congenital or acquired causes. There are listed the differences between arterial and venous thrombosis. The next section describes the antiphospholipid syndrome. It is an obtained condition associated with thrombosis and the presence of antiphospholipid antibodies. There is a wide spectrum of these antibodies. The examination of lupus anticoagulant includes screening, mixing and confirmatory tests, which are based on the detection of pathology in tests dependent on phospholipids, confirmation of the identity of the inhibitor. For this purpose, the activated partial thromboplastin time test and the Russell's viper venom time test are used most often. In the thesis, various methods are described in detail and it also includes new guidelines and the recommendations from the 2012 testing process lupus anticoagulant.

The practical part describes the principles of analyzers of the determination of coagulation test and of the confirmation of lupus anticoagulant. This part includes measurement procedures and the test results of individual patients as well. The results are statistically evaluated. The samples were provided and measured at the Department of Clinical Hematology at the University Hospital in Motol in Prague.

Keywords

Thrombophilia, antiphospholipid syndrome, Lupus anticoagulant, aPTT test, dRVVT test, ACL TOP 700 CTS

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Ivy Bártů Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Jana Slívová, DiS.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Ivě Bártů Ph.D. za její trpělivost, ochotu, cenné rady a přátelský přístup během psaní této práce. Poděkovat bych chtěla také své rodině a přátelům za pomoc a podporu během mého studia.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	7
ÚVOD.....	9
1 TROMBOFILIE.....	10
1.1 KLINICKÁ KRITÉRIA TROMBOFILIE.....	10
1.2 VROZENÉ A ZÍSKANÉ FAKTORY.....	11
1.3 VENÓZNÍ A ARTERIÁLNÍ TROMBÓZY.....	12
1.4 PREVENCE, LÉČBA TROMBOFILNÍCH STAVŮ.....	13
2 ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM (APS).....	14
2.1 KATASTROFICKÝ ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM.....	15
2.2 ANTIFOSFOLIPIDOVÝ SYNDROM U DĚTÍ.....	15
2.3 PŘÍČINA A VÝVOJ ANTIFOSFOLIPIDOVÉHO SYNDROMU.....	15
2.4 DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA.....	17
2.4.1 Klinická kritéria.....	18
2.4.2 Laboratorní kritéria.....	18
2.5 PREVENCE, LÉČBA PACIENTŮ.....	20
3 LUPUS ANTIKOAGULANS (LA).....	22
3.1 STANOVENÍ LUPUS ANTIKOAGULANS.....	22
3.1.1 Screeningové testy.....	23
3.1.1.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT).....	24
3.1.1.2 Dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT).....	26
3.1.2 Korekční testy.....	27
3.1.3 Konfirmační testy.....	27
3.1.4 Nová doporučení.....	28
4 CÍL.....	30
5 MATERIÁL A METODIKA.....	31
5.1 PŘÍSTROJ ACL TOP 700 CTS.....	31
5.1.1 Reagencie pro ACL TOP 700 CTS.....	32
5.1.2 Zpracování vzorku.....	33
5.1.3 Postup.....	33
5.1.4 Naměřené hodnoty.....	35
5.2 PŘÍSTROJ SYSMEX CA 7000.....	36
5.2.1 Reagencie pro SYSMEX CA 7000.....	36
5.2.2 Postup.....	37
5.2.3 Naměřené hodnoty.....	38
6 VÝSLEDKY.....	39
7 DISKUZE.....	45
ZÁVĚR.....	47
REFERENČNÍ SEZNAM.....	48

SEZNAM ZKRATEK

ACLA	antikardiolipinové protilátky
anti β_2 -GPI	anti β_2 -glykoprotein I
APA	antifosfolipidové protilátky
APS	antifosfolipidový syndrom
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
β_2 -GPI	β_2 -glykoprotein I
BCSH	The British Committee for Standards in Haematology
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CaCl ₂	chlorid vápenatý
CAPS	katastrofický antifosfolipidový syndrom
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
dRVVT	dilute Russell's Viper Venom Time
dRVVT C	konfirmační test dilute Russell's Viper Venom Time
dRVVT S	screeningový test dilute Russell's Viper Venom Time
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPCR	endoteliální receptor pro protein C
F	faktor
FM	fibrinové monomery
HIV	human imunodeficiency virus
HK	vysokomolekulární kininogen
HNP	Hexagonal Phospholipid Neutralisation
IgM, IgG	imunoglobulin M, G
INR	mezinárodní normalizovaný poměr
ISTH	The International Society on Thrombosis and Haemostasis
KCT	Kaolin Clotting Time
KT	směsný test aPTT
LA	lupus antikoagulans
LA S	screeningový test aPTT
NKP	Normal Multi Control

PAI	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PC	protein C
PK	prekalikrein
PL	fosfolipid
pNA	p-nitroanilin
PNP	Platelet Neutralisation Procedure
PS	protein S
PT20210A	typ mutace protrombinu
PTT-LA	lyofilizovaná reagencie pro test aPTT
R	poměr koagulačních časů
RCOG	The Royal College of Obstetricians and Gynaecologist
SCT	Silica Clotting Time
SCT C	konfirmační test Silica Clotting Time
SCT S	screeningový test Silica Clotting Time
SLE	systemový lupus erythematodes
SSC	The Scientific and Standardization Committee
TEN	tromboembolická nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor zevní cesty tkáňového faktoru
TM	trombomodulin
tPA	tkáňový faktor plazminogenu
USB	flash disk
vWF	Von Willebrandův faktor

ÚVOD

Krevní trombus vzniká složitým procesem, na kterém se podílí jak krevní buňky, koagulační faktory, tak fibrinolytický systém. Tromboembolické onemocnění (TEN) vzniká, pokud je trombus zavlčen do úzkého místa v krevním řečišti a dochází k ucpání daného místa a následné embolii. Podle Evropského institutu pro zdraví a bezpečnost je druhou nejčastější komplikací v medicíně právě TEN. [1,8]

Stav spojený se zvýšenou tendencí k tvorbě trombóz se nazývá trombofilie. Trombofilie nese řadu komplikací, ať už se jedná o snížení kvality života, zhoršení pooperačního průběhu stavu pacienta nebo možnou smrt z důvodu embolie do plic. [8]

Žilní tromboembolismus, zahrnující nejčastěji hlubokou žilní trombózu a plicní embolii, představuje onemocnění, které souvisí s vysokou morbiditou a mortalitou ve vyspělých zemích Evropy a Severní Ameriky. Ze současných statistik vyplývá, že se žilní trombóza popisuje u zhruba 8 z 10 000 obyvatel za rok. Výskyt vrozené trombofilie se odhaduje okolo 40 nemocných na 100 000 obyvatel. [5, 10]

Jedna z forem získané trombofilie je antifosfolipidový syndrom (APS), který je spojen s výskytem trombóz a nálezem antifosfolipidových protilátek (APA) v séru pacienta. Statistické hodnoty o výskytu APA jsou různé vzhledem k tomu, že se používají odlišné metodiky stanovení. V určitých případech se přesto částečně shodují, například u mladých a zdravých jedinců, kdy se hodnoty antifosfolipidových protilátek vyskytují v 1 – 5 % populace. Prevalence stoupá s věkem spolu s přítomností chronických nemocí. [14]

Lupus antikoagulans (LA) zvyšuje riziko tvorby krevních sraženin v artériích nebo vénách. LA je zastoupeno u 1 – 2 % populace. Vyskytuje se jako získaný stav a někdy není možno objasnit příčinu vzniku lupus antikoagulans. [23] Metodika stanovení se odlišuje v jednotlivých laboratořích, ale princip metod zůstává stejný. Provádí se hematologické i imunologické vyšetření na průkaz LA.

Úspěšná diagnostika nejen APS, ale i trombofilií, by měla být založena na vzájemné spolupráci hematologů, imunologů, genetiků, biochemiků a revmatologů. [15]

1 Trombofilie

Slovo trombofilie je složeninou z latinského slova trombus – označuje krevní sraženinu a slova filie vyjadřující zvýšenou náchylnost k nějakému ději. Trombofilie je tedy zvýšená náchylnost k tvorbě krevních sraženin. [1]

Integrita cévního systému je zajišťována souhrou cévní stěny, krevních destiček a plazmatických bílkovin, zahrnující koagulační faktory a jejich inhibitory a fibrinolytický systém a jeho inhibitory. Tato souhra vede k aktivaci krevního srážení v místě cévního poranění, nezbytné k zabránění krevní ztráty. [2]

Ucelená koncepce vzniku cévní trombózy byla popsána až v roce 1856 německým patologem profesorem Rudolfem Virchowem a v zásadě platí dodnes. Definoval faktory trombózy, které se dnes popisují jako Virchowův trojúhelník. Tato triáda zahrnuje [3, 4]:

- poruchu cévního endotelu
- poruchu cirkulace krve, přesněji zpomalení krevního toku
- poruchu srážecích faktorů

1.1 Klinická kritéria trombofilie

Krvácivé stavy nebo zvýšený sklon ke vzniku krevních sraženin rozdělujeme podle toho, zda jsou vrozené nebo získané, venózní nebo arteriální. Klinická kritéria trombofilie nám umožňují rozlišení osob, které jsou vhodné k vyšetření vrozených trombofilních defektů. Přehled kritérií trombofilie více viz. Tabulka 1. [4]

Tabulka 1. Klinická definice trombofilie [4]

Trombóza v mladším věku	Žilní před 40. - 45. rokem věku Arteriální před 35. rokem věku
Trombózy	Arteriální i žilní, atypická lokalizace
Opakované trombózy	
Pozitivní rodinná anamnéza	
Porodnické komplikace	Opakované ztráty plodu Komplikace těhotenství

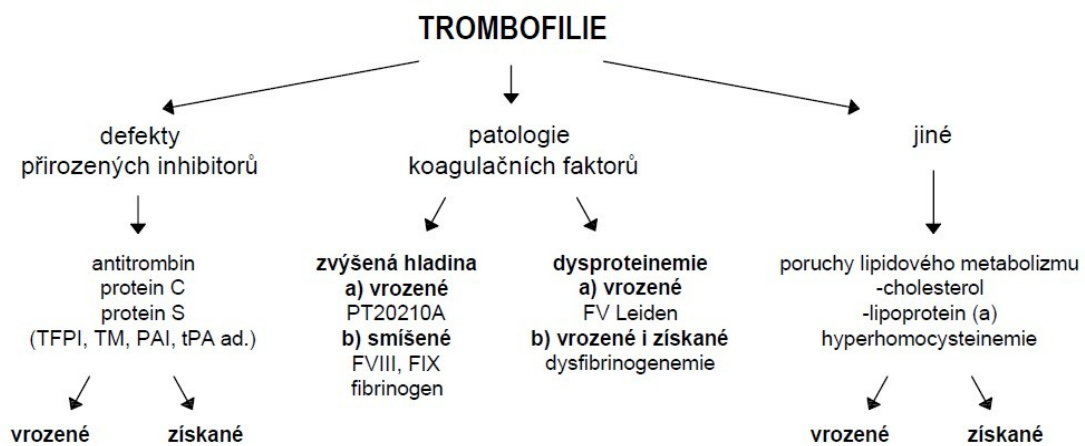
Trombóza jako symptom může komplikovat celou řadu chorob. Mezi obecné rizikové faktory trombózy můžeme zařadit zejména věk nad 45 let (40 – 50 let), obezitu,

chirurgický zákrok, úraz, imobilizaci, dlouhé cesty a další. Každý tento faktor zvyšuje riziko trombózy o 4 – 18 %. [4]

1.2 Vrozené a získané faktory

Bylo zjištěno, že na rozdíl od krvácivých stavů, ke klinické manifestaci trombózy je nezbytná přítomnost více rizikových faktorů současně. Velmi často nalézáme v rodinách s vysokým výskytem tromboembolických nemocí (TEN) kombinace jak vrozených (jsou popsány četné rodiny se současným výskytem defektu AT, PC nebo PS a FV Leiden), tak získaných faktorů. [5]

Schéma rozdělení vrozené a získané trombofilie znázorňuje Obrázek 1.:



Obrázek 1. Trombofilie (TFPI – inhibitor zevní cesty tkáňového faktoru, TM – trombomodulin, PAI – inhibitor aktivátoru plazminogenu, tPA – tkáňový faktor plazminogenu, PT20210A – mutace protrombinu 20210A, F – faktor) [4]

Mezi **vrozené příčiny** zařazujeme, například [2, 4, 5, 9]:

- bodová mutace genu pro faktor V (FV), tzv. Leidenská mutace
- mutace genu pro protrombin (G 20210A), neboli faktor II (FII)
- genový polymorfismus pro inhibitory aktivátoru plazminogenu I (PAI-I)
- geneticky daná dysfunkce endoteliálního receptoru pro protein C (EPCR)
- další deficity nebo dysfunkce koagulačních faktorů (př. FXII, FXIII,...) nebo jejich inhibitorů (př. deficit antitrombinu III, inhibitoru tkáňového faktoru,...)

Mezi genetické vlivy se řadí další mutace, které mají vliv na nadměrnou produkci koagulačních faktorů nebo naopak deficit inhibitorů koagulace, rezistence koagulačních faktorů vůči jejich inhibitorů. [2, 4, 5, 9]

U **získaných faktorů** trombofilie se nejčastěji uvádějí tyto příčiny [5, 8, 9, 10]:

- imobilizace a to nejen na lůžku, ale také při dlouhých cestách letadlem do zahraničí.
- u potravin s vysokým obsahem cholesterolu je předpoklad vzniku aterosklerózy.
- výskyt je ovlivněn věkem, kdy se tromby mohou vyskytovat častěji u osob nad 45 let.
- pohlaví, kdy jsou postiženy zejména ženy. U těhotných žen dochází ke změnám v hemokoagulační rovnováze. Aktivita krevního srážení je zvýšená z důvodu prevence vykrvácení při porodu. Riziko trombofilii se zvyšuje i při komplikovaných porodech nebo u pacientek v menopauze při použití estrogenů v hormonální substituční léčbě. [2, 10]
- šokové stavy, dehydratace, infekce nebo různé úrazy, fraktury či popáleniny.

Velké riziko pro vznik trombů jsou také nádory, zejména solidní nádor. Maligní buňky uvolňují tromboplastické substance do oběhu, v důsledku aktivace fibrinolýzy se zvýšenou expresí urokinázového typu aktivátoru plazminogenu nebo jeho receptoru s následkem sekundárních změn koagulace. [9]

Mohou přispět také různá cévní poškození nebo stavy poškozující cévní stěnu, např. varixy. V žilách dolních končetin se nachází chlopně, které spolu s kosterním svalstvem usnadňují návrat žilní krve do srdce. U pacienta, který je imobilní je funkce svalstva oslabena, funkce chlopní je snížena a dochází k hromadění krve v dolních končetinách, čímž se zvyšuje riziko vzniku krevní sraženiny. [8, 9, 10]

1.3 Venózní a arteriální trombózy

Trombózy se vyskytují jak v žilách, tak v tepnách, přičemž mají rozdílnou příčinu vzniku poškození. Pro manifestaci trombóz je důležité, aby působilo více rizikových faktorů (vrozených i získaných) současně, na rozdíl od krvácivých stavů.

U **venózní formy** dochází k poruše cirkulace krve, kdy se zpomaluje krevní odtok a koagulace, která postihuje koagulační faktory. Na vzniku žilní trombózy mají účinek některé podněty, jako jsou operace, gravidita, dlouhodobá imobilizace, hormonální antikoncepce, dehydratace či nádorové bujení. Svůj podíl má také věk nad 45 let, traumata, obezita a křečové žíly. Změny způsobené krevní sraženinou můžeme pozorovat také na kůži. V místě trombu je kůže tmavšího zabarvení, na rozdíl od tepenné formy, kdy je povrch kůže světlejší a místo je bolestivější. [2, 6]

Při **arteriální trombóze** je rozrušena cévní stěna (endotel) a nadměrná aktivita trombocytů. Jako rizikové faktory se uvádějí vysoký krevní tlak, kouření nebo poruchy lipidového metabolismu. [2, 6]

Faktorů, které mohou vést ke tvorbě krevních sraženin, je mnoho a kromě výše uvedených, k tvorbě trombóz mohou vést i látky, které se nepodílí přímo na hemokoagulaci, např. lipidy, homocystein, červené i bílé krvinky. Bylo potvrzeno, že u osob s krevní skupinou A, B nebo AB je až dvakrát větší riziko venózních trombóz než u osob s krevní skupinou 0. [4, 6]

Přítomnost tzv. trombofilního defektu však neznamena, že nositel prodělá trombózu. Navíc je řada rodin s těžkými trombotickými projevy, u kterých dosud žádný defekt nebyl nalezen. [4]

1.4 Prevence, léčba trombofilních stavů

Vrozená trombofilie dosud není léčitelná, proto se zejména zaměřuje na prevenci tvorby trombů. Profylaxe spočívá v podávání antikoagulační léčby nízkomolekulárního heparinu. U hluboké žilní trombózy nebo plicní embolie se používá perorálního antikoagulancia – Warfarin. [2, 4]

2 Antifosfolipidový syndrom (APS)

Na začátku 80. let 20. století byl poprvé popsán antifosfolipidový syndrom. Jedná se o nezánnětlivé autoimunitní onemocnění s nejvyšší incidencí, jehož diagnostika je složitá a klinické projevy jsou velmi variabilní. APS je klinicko-laboratorní jednotkou, u níž mají antifosfolipidové protilátky úlohu ve vývoji trombofilních stavů. [12, 15]

Tento syndrom může být **primární**, tedy při vyloučení jiného onemocnění, které může indukovat tvorbu protilátek, nebo **sekundární**, nejčastěji v rámci systémového onemocnění pojiva, jako je systémový lupus erythematoses (SLE), revmatoidní artritida, systémová sklerodermie, smíšená choroba pojiva nebo Sjögrenův syndrom postihující slinné, slzné buňky a další žlázy. APS může provázet autoimunní trombocytopenickou purpuru, autoimunní tyreoiditu či inzulin-dependentní diabetes mellitus. Souvisí s různými nádory (leukemie, lymfomy, myeloproliferativní onemocnění,...) a nebo s infekčním onemocněním (syfilis, tuberkulóza, HIV, cytomegalovirus,...). Také na základě některých léků by se mohl projevit antifosfolipidový syndrom. Do skupiny rizikových medikamentů se zařazují betablokátoary, hydralaziny, α interferony, estrogeny a další. Syndrom se vyskytuje třeba i u jaterní cirhózy, terminálního stavu selhávání ledvin, nespecifických střevních zánětů a u řady jiných postižení. [12, 13, 15]

Pro diagnózu je důležitý projev získaných trombofilních stavů spojených s opakovaným výskytem lupus antikoagulans (LA) a antikardiolipidových protilátek (ACLA), které se zařazují mezi antifosfolipidové protilátky (APA). Syndrom je provázen výskytem samovolných potratů. [15]

APA jsou heterogenní skupiny autoprotílátek nebo aloprotílátek, které reagují s různým cílovým antigenem a mají odlišný klinický význam. Ovlivňují pochody na různých úrovních koagulační kaskády v místech krevního srážení. [15]

K přesnému určení, detekci a hodnocení antifosfolipidového syndromu je nutné propojení poznatků z molekulární genetiky, imunologie, biochemie, hematologie a revmatologie. [15]

2.1 Katastrofický antifosfolipidový syndrom

Katastrofický antifosfolipidový syndrom (CAPS), neboli Ashersonův syndrom, má relativně malou frekvenci výskytu, kolem 1 % [17]. Představuje ale velice vážnou formu antifosfolipidového syndromu s četnými cévními uzávěry, což může vést k život ohrožujícímu stavu. Pro diagnostiku CAPS je nutné, aby byly postiženy nejméně tři orgány, systémy nebo tkáně během jednoho týdne, a zároveň histopatologické potvrzení malých nebo větších cévních okluzí s laboratorním průkazem přítomnosti APA. Pacienty se závažnou multiorgánovou ischemií nebo infarktem, často provází mikrovaskulární trombózy. U osob s CAPS hrozí masivní žilní tromboembolie, respirační selhání, porucha funkce ledvin, abnormální funkce jater, cévní mozkové příhody, poruchy nadledvin. [13, 14] Zhruba u 25 % případů s CAPS dojde k rozvoji diseminované intravaskulární koagulaci (DIC). [14]

Jako urychlující faktory k rozvoji katastrofického antifosfolipidového syndromu se uvádí infekce, léky (hlavně diuretika, antikoncepce), chirurgické zákroky a ukončení předchozí antikoagulační léčby. CAPS se velice problematicky léčí, protože selhávají běžně používaná schémata léčby pro antifosfolipidový syndrom a trombofilní stavy. [13,14]

2.2 Antifosfolipidový syndrom u dětí

Antifosfolipidový syndrom nacházíme také u dětí, které mají klinické příznaky stejné jako u dospělých. Avšak byly popsány určité odchylky mezi dětmi s primárním a sekundárním APS. U těchto dvou skupin se projevíly jiné symptomy. Pacienti s primárním APS byli mladší a měli vyšší výskyt tepenných krevních sraženin než děti se sekundárním syndromem. U postižených se sekundárním APS se objevovala vyšší frekvence žilních trombóz s dalšími hematologickými a kožními manifestacemi. [13]

2.3 Příčina a vývoj antifosfolipidového syndromu

V roce 1983 byly detekovány antikardiolipinové protilátky (ACLA) namířené proti záporně nabitým fosfolipidům. Kardiolipin (= disfosfatidylglycerol) byl primární antigen v testovacím činidlu, které sloužilo k diagnostice syfilis. Pokročilá studia vedla

k identifikaci nového syndromu – antifosfolipidového. Během několika let se přišlo na to, že ACLA jsou vlastně namířeny proti proteinům vázaných na fosfolipidy, zejména β_2 -glykoprotein I, a že se nevážou přímo na kardiolipin. Tato informace se stala velice důležitou k pochopení mechanismu působení antifosfolipidového syndromu a k odlišení pozitivních a souvisejících falešně pozitivních výsledků. [13, 14, 17]

V patogenezi trombotických projevů v rámci APS se nejspíše podílí více mechanismů, vedoucích k výslednému prokoagulačnímu a prozánětlivému účinku. [14]

Patologicky významné protilátky jsou takové, které mají vysokou afinitu k β_2 -glykoprotein I. Ten vytváří komplexy s APA, čímž dojde k navázání na fosfolipidový povrch buňky. Vzniklá vazba zabraňuje navázání koagulačních faktorů na stejný fosfolipidový povrch. [14] Proběhne konformační změna, dimerizace molekuly β_2 -GPI a spojení s autoprotiátkou. Výsledkem je vznik trimolekulárního komplexu (dimer β_2 -GPI a autoprotiátka) na povrchu fosfolipidů. To se projeví různými hemostatickými reakcemi a interakcemi s buněčnými receptory. [14]

β_2 -glykoprotein I, neboli apolipoprotein H, je člen skupiny komplementu. β_2 -GPI in vitro snižuje adhezi destiček na cévní stěnu v krevním toku. Ovlivňuje vzájemné interakce mezi Von Willebrandovým faktorem (vWF) a krevními destičkami. Působí na vazbu A2 domén vWF, čímž narušuje jejich vazebnou vlastnost na glykoproteinový komplex trombocytů. Může zvyšovat fibrinolytickou aktivitu jako kofaktor tkáňového aktivátoru plasminogenu. [13]

Mezi další antigenní látky významné pro stanovení antifosfolipidových protilátek, zařazujeme protein C; protein S; trombomodulin; protrombin; koagulační faktor V; fosfolipáza A2; annexin A2, A5; vysoko/nízkomolekulární kininogeny a tkáňový faktor. Annexin A5 (annexin V) je endogenní antikoagulační protein, tvořící ochrannou vrstvu na placentě či cévním endotelu. Když dojde k narušení placenty, vyplaví se annexin V, a díky tomu těhotné prodělávají opakované potraty. [5, 14]

Hlavními cílovými buňkami APA jsou endoteliální buňky, monocyty a trombocyty. Dochází pravděpodobně k vazbě komplexu APA/ β_2 -GPI na receptor či receptory na povrchu těchto buněk. Tím dojde k aktivaci celé řady dějů, např.: zvýšená exprese adhezních molekul a prozánětlivých cytokinů, porucha fibrinolýzy,

pravděpodobně jako projev dysfunkce endotelu, zvýšená adheze leukocytů k endotelu a další. [14]

U zdravých osob paměťové B buňky vytvářejí APA. Prováděla se studie u pacientů s mononukleózou a zjistilo se, že u 10 – 60 % buněk imunoglobulinu M (IgM) se uvolňují antikardiolipinové protilátky, jež jsou vyjádřeny CD27 (marker paměťových buněk B). [13]

Za většinu zvýšených hodnot APA zodpovídají infekce, např. syfilis či Lymeská borelióza. Protilátky byly popsány i u pacientů s planými neštovicemi, u kterých se vyskytly krevní sraženiny. Tvorba antifosfolipidových protilátek může souviset s hepatitidou typu C, s infekcí cytomegalovirem a dalšími. [12, 13]

APS se projevuje i krvácením, jehož příčinou jsou získané trombocytopenie, trombocytopenie, získané inhibitory proti specifickým koagulačním faktorům, jako je faktor VIII a získaný von Willebrandův syndrom. [12, 13]

Také familiární výskyt zvýšených hladin protilátek vede k názoru, že i genetika hraje roli v jejich vývoji. Prováděla se studie s 84 pacienty s APS, kde více než 35 % z nich mělo, alespoň jednoho příbuzného s nejméně jedním klinickým projevem antifosfolipidového syndromu, jako jsou trombózy nebo opakovaná ztráta plodu. [13]

2.4 Diagnostická kritéria

Potvrzení, zda se jedná o APS nebo ne, není jednoduché. Z tohoto důvodu byla vydána diagnostická kritéria, která byla potvrzena a upravena na 11. mezinárodním kongresu o antifosfolipidových protilátkách v Sydney v roce 2004. Vycházejí z prvního uceleného diagnostického schématu z mezinárodního kongresu, pořádaném v Sapporu v roce 1998. Konsenzus určuje nejen za jakých okolností je diagnóza potvrzena, ale také, jaké je časové rozhraní mezi klinickou manifestací a průkazem APA. Kritéria z laboratorního hlediska musí být ověřena nejméně po šesti týdnech od prvního průkazu protilátek a maximálně musí být provedeny do 5 let. Pro klinickou část je potřeba znát i vrozené, získané faktory trombofilie (Leidenská mutace FV, nefrotický syndrom, operace, maligní onemocnění), kardiovaskulární rizikové faktory (hypertenze, diabetes mellitus, kouření, obezita) a věk (u mužů nad 55 let a u žen nad 65 let je větší riziko APS). [5, 15]

2.4.1 Klinická kritéria

Ke klinickým kritériím řadíme **trombózy** (více viz. kap. 1.1 Klinická kritéria trombofilie), které byly histopatologicky prokázány a ve stěně cévy se nenacházejí známky zánětu. **Problémy v těhotenství**, které rozdělujeme do tří skupin, podle toho o jakou poruchu se jedná [5, 15]:

- a) Nevysvětlitelné příčiny úmrtí jinak zdravého plodu během 10 týdnů a po této době. Provedena byla příslušná vyšetření – přímé vyšetření plodu a ultrasonografické zhodnocení morfologie plodu.
- b) Jeden nebo více předčasných porodů novorozence s normální morfologií do 34. týdne těhotenství, u jehož matky se vyskytla eklampsie, preeklampsie a nebo placentární insuficience.
- c) Případně se objevily více než tři následné spontánní potraty před 10. týdnem těhotenství. Vyloučily se jakékoliv anatomické, hormonální odchylky matky a nebyly diagnostikovány chromozomální abnormality u obou z rodičů.

Zhruba u 16 – 38 % žen jsou prokázány APA v těhotenství a přibližně u poloviny z nich dochází k potratům již během 1. trimestru. Nejvíce žen s těmito protilátkami přichází o plod v 2. trimestru a některé porodí už mrtvé dítě. [13]

2.4.2 Laboratorní kritéria

Antifosfolipidový syndrom by nemohl být prokázán bez příslušného laboratorního vyšetření. K laboratorním kritériím patří průkaz [5, 12, 15, 16, 18]:

- a) **lupus antikoagulans (LA)** – musí být vícekrát prokázány v plazmě s časovým odstupem 6 týdnů. Detekce LA se řídí doporučením ISTH (The International Society on Thrombosis and Haemostasis). Provádí se screeningové, korekční a konfirmační testy.
- b) **antikardiolipinových protilátek (ACLA)** – ve středním nebo vysokém titru protilátek se nacházejí IgG nebo IgM izotypy, které jsou prokázány vícekrát s šestitýdenním odstupem v séru nebo plazmě. Používá se standardní ELISA metoda pro β_2 -glykoprotein I dependentní antikardiolipinové protilátky.

c) **anti β_2 -glykoprotein I** (anti β_2 -GPI) – stanovení v séru či plazmě. IgG nebo IgM izotypy vyšetřeny ELISA metodou.

Podle expertů na syndrom APS je účelné rozlišovat mezi jednotlivými skupinami, podle nichž byla stanovena laboratorní diagnóza APS. Kombinovaný průkaz antifosfolipidových protilátek vede k vyšší asociaci s trombotickými komplikacemi. [15]

Následující tabulka znázorňuje skupiny, podle kterých se popisuje APS. Řídí se laboratorními nálezy:

Tabulka 2. Podskupiny u antifosfolipidového syndromu [5, 15]

Skupina	Popis
I	Je přítomno více než jedno laboratorní kritérium v jakékoli kombinaci.
II a	Izolovaný průkaz lupus antikoagulans.
II b	Izolovaná přítomnost antikardiolipinových protilátek.
II c	Izolovaná přítomnost protilátek proti β_2 -glykoprotein I.

K objasnění, zda se jedná o antifosfolipidový syndrom, je potřeba přítomnost alespoň jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria. Přísné vymezení kritérií a faktorů APS je velice důležité. Některé publikace uvádějí, že jen poměrně nízký počet nemocných dlouhodobě léčených antikoagulační léčbou z indikace APS, má ve skutečnosti jasně potvrzenou definitivní diagnózu syndromu. Zbytek pacientů proto může být léčen na APS neoprávněně. [12, 14]

Některé klinické příznaky provázejí APS poměrně často (lze je pozorovat u více než 10 % pacientů s APS), avšak nezískaly váhu klasifikačních kritérií. Patří sem např. trombocytopenie, livedo reticularis, abnormality srdečních chlopní či hemolytická anémie. [14]

Většina pacientů se zvýšenými antifosfolipidovými protilátkami, nemají diagnostikovaný APS. U těchto pacientů se mohou vyskytnout různé infekce, které vyvolávají tvorbu APA protilátek vázajících se na fosfolipidy. U některých jedinců se objevují po užívání léků (zejména chlorpromazin nebo prokainamid) a nebo jsou protilátky zvýšeny i u zdravých osob bez medikace. [13, 14]

U testovaných pacientů bez klinické manifestace SLE (systémový lupus erythematoses) s průkazem antifosfolipidových protilátek, hrozí riziko nesprávné diagnózy, a tedy nevhodný léčebný postup. [13, 14]

2.5 Prevence, léčba pacientů

Prevence a léčba je u řady pacientů problematická, zejména z důvodu klinických projevů. U některých mohou být zvýšené APA, avšak neprodělají tromboembolickou příhodu. Nacházíme velké spektrum protilátek, např. ACLA, anti β_2 -GPI, antiprotrombin, LA, atd. Antifosfolipidové protilátky se mohou různě projevovat. Léčebný postup rozdělujeme na primární a sekundární.[12, 14, 15]

Primární léčba spočívá zejména v prevenci trombofilních stavů a vyvarování se rizikových faktorů způsobujících tvorbu krevních sraženin, jako jsou kouření, hormonální antikoncepce nebo strava s vysokým obsahem cholesterolu. [12, 14, 15]

Preventivní opatření se zavádějí také u pacientů, u kterých se vyskytuje antifosfolipidový syndrom v rodinné anamnéze, u jedinců prodávající trombotické příhody na základě traumatu, chirurgických zákroků, těhotenství nebo u osob užívající estrogény. Kyselina acetylsalicylová se používá jako standardní preventivní léčebný postup nemocných s negativními APA z důvodu, aby se zabránilo recidiv ischemických příhod. [12, 14, 15]

K sekundární antikoagulační terapii se přistupuje v případě pacientů s laboratorními abnormalitami a rodinnou anamnézou pro APS nebo SLE, popř. pro ty, jež mají vysoké riziko vzniku krevních sraženin. Prováděná studia prokázala, že u pacientů s APS a trombózami, by měla být nasazena dlouhodobá léčba warfarinem. Udržována na terapeutické dávce, aby mezinárodní normalizovaný poměr byl $INR = 2,0 - 3,0$. Léčebné postupy je nutné nastavit individuálně a zvážit tíži tromboembolického stavu a přítomnost rizikových faktorů nebo vlivů vedoucích ke krvácení. [12, 13, 15]

Léčba APS a první žilní trombózy je shodná v podávání perorálních antikoagulancií tak, aby cílové INR bylo kolem $2,0 - 3,0$. Pro arteriální trombózy a APS je doporučené cílové INR nad $3,0$. Ve většině případů nemocných s APA a tepennými krevními sraženinami je nejvhodnějším lékem kyselina acetylsalicylová. [12, 13, 15, 19]

Těhotným ženám s APS se doporučuje podávání kombinace aspirinu a nízkomolekulárního heparinu, protože kdyby se použil nefrakcionovaný heparin, protilátky lupus antikoagulans (LA) by mohly ovlivnit výsledky měření hladin heparinu pomocí aktivovaného parciálního tromboplastinového času (aPTT). Až v 54 % je tento postup účinnější než u samotného podávání aspirinu, což se provádělo v dřívějších letech. Využívaly se i další léčebné přípravky, jako prednison, ale v kombinaci s heparinem se zvyšovalo riziko osteopenie (řidnutí kostní tkáně) a zlomenin obratlů. [12, 13, 15]

U katastrofického antifosfolipidového syndromu obvykle není dostačující konvenční antikoagulační terapie. Z důvodu vysoké úmrtnosti je potřeba nasadit agresivní léčbu. Ta spočívá v nasazení antikoagulačních imunosupresiv, jako jsou glukokortikoidy, intravenózní imunosupresiva, cyklofosfamid a další. I plazmaferéza může být užitečný doplněk. [13]

Profylaxe u sekundárního APS a trombofilních stavů se neliší. Ideální doba antikoagulační léčby není přesně daná, protože záleží na stavu pacienta a jeho laboratorních hodnotách. [15]

3 Lupus antikoagulans (LA)

Lupus antikoagulans se řadí do skupiny antifosfolipidových protilátek (APA). Je to skupina imunoglobulinů namířena proti složkám fosfolipidů protrombinového komplexu koagulační kaskády. Protilátky jsou tvořeny, buď imunoglobuliny IgG, IgM a nebo vzájemnou kombinací těchto dvou tříd. Nejčastěji se vyskytující u trombóz jsou LA typu IgG. Samotné IgM se objevují velice vzácně. [23]

LA je považováno za nejvýznamnější laboratorní prediktor trombotických komplikací. Podporuje vznik krevních sraženin jak v arteriích, tak vénách. In vitro ovlivňuje fosfolipid dependentní koagulační reakce tím, že prodlužuje jejich srážecí čas. Jako antigen se při stanovení LA využívá β_2 -glykoprotein I nebo protrombin. Reakcí s LA mohou být inaktivovány inhibitory krevního srážení, jako jsou např. protein C, protein S, trombomodulin, antitrombin III, atd. [14, 20]

Zvýšené hodnoty LA jsou získaným stavem. Nejčastěji se nachází v souvislosti s autoimunitním onemocněním systémového lupus erythematoses. Střední až vyšší hodnota titru antikardiolipinové protilátky znamená riziko pro arteriální trombózy. Z toho vyplývá, že samotné určení přítomnosti jednotlivých protilátek, dostatečně nevyovídá o riziku protrombotického stavu. [14, 15]

U pacienta se kromě trombofilního stavu může objevit také krvácení způsobené důsledkem trombocytopenie nebo trombocytopenie. [15]

3.1 Stanovení lupus antikoagulans

Diagnostické testy lze jednoduše rozdělit podle způsobu detekce antifosfolipidových protilátek na koagulační testy (lupus antikoagulans) a imunologické testy stanovující antigen ELISA metodou (protilátky proti kardiolipinům a proti β_2 -glykoproteinu I. [16]

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je neizotopová, nekompetitivní metoda pro stanovení antigenů a detekci protilátek. V přebytku je na pevnou fázi navázána protilátka, kterou stanovujeme potřebné antigeny. Pokud sledujeme protilátky ze séra pacienta, je na pevnou fázi v přebytku navázán antigen. Principem je

tzv. sendvičová technika. Antigen v přebytku je navázán na pevnou fázi. Do roztoku se aplikují protilátky ze séra pacienta, které se na antigen přichytí. Po promytí se přidají enzymaticky značené protilátky proti lidskému imunoglobulinu a vznikne tak imunokomplex. Ten se odsaje ze směsi, promyje a přidá se substrát, který po inkubaci vytvoří barevný produkt. Změřená intenzita komplexu je přímo úměrná koncentraci protilátky v pacientově séru. [22]

Lupus antikoagulans jsou protilátky, které ovlivňují reakce krevního srážení na základě vzájemných interakcí s fosfolipidy. Mají schopnost prodlužovat koagulační čas. Neexistuje 100% citlivý screeningový test a jestliže dojde k prodloužení času při testech, je nutné vyloučit jiné možné příčiny. [4] Z toho důvodu se provádí další testy rozděleny do několika skupin (Tabulka 3.), u kterých byla vypracována minimální kritéria k identifikaci LA podle doporučení SSC ISTH (The Scientific and Standardization Committee (SSC), The International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) [5]:

Tabulka 3. Minimální kritéria k identifikaci lupus antikoagulans [5]

Typ testu	Princip
screeningový	Průkaz patologie testů závislých na fosfolipidech.
korekční	Průkaz inhibitoru.
konfirmační	Průkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru.
ostatní	Vyloučení jiných koagulopatií.

Pro koagulační testy jsou přísnější podmínky, a proto je stanovení složitější. Je potřeba urychleně zpracovat plazmu na bezdestičkovou. Provádí se většinou do hodiny speciálními centrifugačními metodami a filtry. Postup se řídí normami ISTH (The International Society on Thrombosis and Haemostasis). [5, 15]

3.1.1 Screeningové testy

Screeningové testy jsou založené na principu závislosti na fosfolipidech a citlivosti na lupus antikoagulans. Používají se nejméně dva screeningové testy pro zjištění prodloužení času koagulace. Jakmile se čas nezkrátí po přidání normální plazmy

a fosfolipidů, test se musí korigovat. Je důležité odlišit působení dalších faktorů, jako je specifický inhibitor nebo heparin. [5, 15]

Fosfolipidy jsou důležité pro proces krevního srážení. Primárně se nachází na povrchu krevních destiček a napomáhají aktivovat některé koagulační faktory. [23].

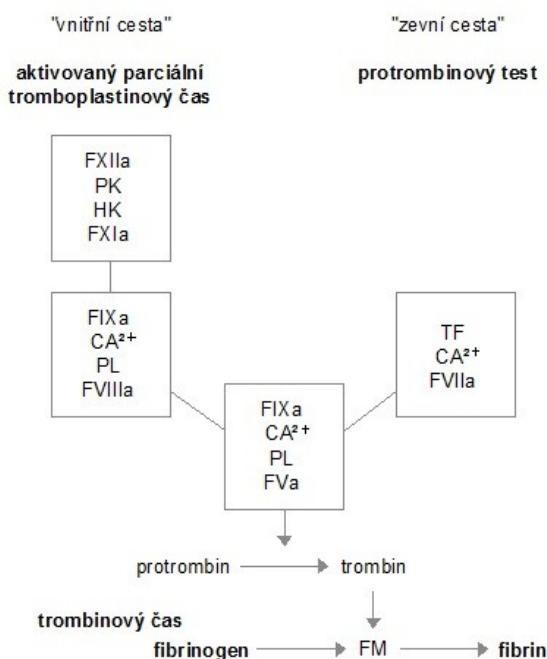
Vyhodnocování screeningových testů se provádí pomocí naměřeného koagulačního času v sekundách a poměru (R – Ratio), který udává čas testované plazmy / čas kontrolní normální plazmy. **Referenční meze** jsou, např. u reagensů firmy Werfen: $R_{SCT} \leq 1,16$ pro Silica Clotting Time a $R_{dRVVT} \leq 1,2$ pro test s jedním Russellovým zmijem. [30, 32, 33]

Pro ověření testů musí být vždy použita kontrolní pozitivní plazma od dárců s prokázanými antifosfolipidovými protilátkami a negativní plazma, která je chudá na krevní destičky. [24]

Mezi screeningová vyšetření řadíme zejména aPTT (aktivovaný parciální tromboplastinový čas) a dRVVT (dilute Russell's Viper Venom Time), popř. testy využívající jiné hadí jedy – textarinový test a nebo taipanový čas. U těhotných žen může být čas aPTT zkrácen v důsledku vysoké hladiny faktoru VIII během těhotenství a i dRVVT může být změněn z důvodu neznámých příčin. [4, 12, 24]

3.1.1.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT)

Aktivovaný parciální tromboplastinový čas se řadí mezi testy, které hodnotí stav vnitřního koagulačního systému (faktory XII, XI, IX, VIII, prekalkrein, vysokomolekulární kininogen). [4, 5] Níže uvedené schéma slouží k orientaci vyšetřovaných faktorů (Obrázek 2.) pomocí aPTT:



Obrázek 2. Základní koagulační testy (PK – prekalikrein, HK – vysokomolekulární kininogen, PL – fosfolipid, TF – tkáňový faktor, FM – fibrinové monomery) [5]

Antifosfolipidové protilátky prodlužují čas aPTT. Aktivace určité reagentie umožňuje specificky postihnout prodloužení, které způsobily lupus antikoagulans. [5, 27]

V praxi se deficit koagulačních faktorů odliší od cirkulujících antikoagulancií (LA nebo protilátek proti faktorům) provedením testu pomocí reagentií aPTT za přítomnosti normální plazmy. Je však zapotřebí udělat další testy, aby se LA odlišily od protilátek proti koagulačním faktorům a/nebo heparinu. PTT-LA je lyofilizovaná reagentie, která obsahuje kefalin z mozkové tkáně králíka a aktivátor z křemičitanových částic v pufovaném prostředí (glycin). [27]

K provedení testu aPTT jsou nutné aktivátory, jež obsahují negativně nabitě povrchy, jako jsou kaolin, křemičitany, polyfenoly nebo negativně nabitě sulfátové lipidy kombinované s kaolinem. Dodáním kefalínu (fosfolipidu) a Ca²⁺ aktivujeme koagulační systém vnitřní cestou. Do reakce je potřeba dodat syntetické fosfolipidy, které jsou izolovány ze zvířecích tkání (např. mozek králíka) nebo fosfolipidy

extrahovány z rostlin (např. sója). Nejčastěji se využívají směsi fosfolipidů, které obsahují optimální složení a zastoupení hlavně fosfatidylserinu. Typ a koncentrace fosfolipidů je pro provedení testu důležitější než jejich negativně nabitě povrchy. Reagenční profil však určuje spíše kombinace obou složek společně s iontovou silou pufovacího systému a stabilizátory. [26]

Mezi typy testů aPTT se zařazuje Silica Clotting Time (SCT), Kaolin Clotting Time (KCT). Jsou na stejném principu, akorát místo kaolinu u KCT je použit oxid křemičitý. SCT je velmi citlivý screeningový test na lupus antikoagulans. Silica Clotting Time bez fosfolipidů je vysoce variabilní v rámci každé skupiny pacientů. Nízká koncentrace fosfolipidů zvyšuje jeho citlivost. Je vhodný k použití zejména u těhotných žen, protože je obzvláště senzitivní na množství krevních destiček. [4, 30]

3.1.1.2 Dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT)

RVV je jed Russellovy zmiže, který obsahuje silný aktivátor faktoru X v přítomnosti fosfolipidů, protrombinu a Ca^{2+} . [28]

Hadí jedy jsou směsí biologicky aktivních proteinů a peptidů, které působí prakticky na všechny klíčové fyziologické systémy. Podle převažujícího účinku na organismus se dělí na neurotoxiny, kardiotoxiny, myotoxiny a látky ovlivňující krevní srážení či cévní stěnu (vazodilatace, látky zvyšující permeabilitu cévní stěny). Jedy mohou působit na všechny systémy hemostázy. Mohou mít vliv na funkci krevních destiček, vazbu vWF, působí na plazmatické faktory protrombinu, plazminogenu nebo inhibitory trombinu a řadu dalších. [5]

Protilátky LA jsou namířeny proti antifosfolipidovým složkám protrombinového komplexu. Tyto autoprottilátky vstupují do koagulačního děje na různých úrovních koagulačního procesu, reagují s prokoagulačními fosfolipidy a soutěží o místa na nich s faktory koagulace. Tím omezují vázání těchto faktorů do koagulačně aktivních komplexů a způsobují abnormální nálezy v testech. [29] Jed Russellovy zmiže přímo aktivuje faktor X, aktivovaný faktor X štěpí protrombin na trombin, který dále štěpí fibrinogen na fibrin, čímž dojde ke vzniku fibrinové sráženiny. Test není ovlivněn nedostatky faktorů XII, XI, IX nebo VIII. Lupus antikoagulans prodlužuje srážecí čas

dRVVT. Vymění-li se fosfolipid za destičkovou neutralizační reagensii, v přítomnosti LA se koagulační čas normalizuje. [28, 35]

3.1.2 Korekční testy

Korekční testy se provádí v případě, kdy vyjde pozitivita ve screeningových testech (tedy poměr času testované plazmy ku času normálu je větší jak 1,2). Zahrnují aPTT a dRVVT testy. Slouží k průkazu inhibitoru, vyloučení defektu faktoru nebo ovlivnění heparinem, atd. Sleduje se korekce prodloužených časů normální plazmou. LA je typickým ihned působícím inhibitorem a většinou není nutné použít inkubaci při 37 °C po dobu 2 hodin, jako je tomu potřeba u specifického inhibitoru. Testování se provádí se směsí pacientovy a normální plazmy v poměru 1 : 1, proto v některých literaturách můžeme najít korekční testy nazvané jako směsné. **Referenční meze** korekčních testů jsou dány poměrem časů do 1,3. [4, 5]

3.1.3 Konfirmační testy

Jestliže ani pomocí korekčních testů nedojde ke korekci prodloužených časů, přistupuje se ke konfirmačním testům. V některých literaturách se můžeme setkat také s pojmem neutralizační testy. Využívá se stanovení na základě aPTT a dRVVT testů. Ty slouží k průkazu fosfolipidové závislosti inhibitoru a jsou založené na přítomnosti zvýšené koncentrace fosfolipidů. Pokud je prokázán lupus antikoagulans v předchozích testech, zvýší se koncentrace fosfolipidů, dojde k neutralizaci LA a ke zkrácení koagulačních časů. [4, 5]

Fosfolipidy mohou být destičkového původu, které jsou využívány při PNP testech (Platelet Neutralisation Procedure) nebo při HNP testech (Hexagonal Phospholipid Neutralisation). [4]

Pozitivita konfirmačních testů potvrzuje přítomnost inhibitoru typu lupus antikoagulans. V těchto testech lze využít také testování s hadími jedy, jako je textarinový čas (závislý na fosfolipidech) a ekarinový čas (nezávislý na fosfolipidech, určený k vyloučení vlivu heparinu). Vyhodnocování je pak na základě poměru 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. [4, 5, 24]

Pokud je výsledek sporný, hodnoty časů jsou hraniční až slabě pozitivní, je nutné testy zopakovat za 1 týden. Samotné vyhodnocení APS s výskytem lupus antikoagulans je v rukou lékaře, který posoudí výsledky spolu se stavem pacienta. [24]

3.1.4 Nová doporučení

Doporučení v určení diagnózy a vyšetření APS z roku 2000 byly členy konsenzu pro hemostázu a trombózu zastupující British Committee for Standards in Haematology (BCSH) aktualizovány a nahrazeny novými postupy. Poté byly přezkoumány zhruba padesáti anglickými hematology z Royal College of Obstetricians and Gynaecologist (RCOG) a BCSH. Změny byly zhotoveny s ohledem na předchozí postupy. [25]

Krev se odebírá do 0,109 mol / l citrátu sodného. Je potřeba se vyhnout kontaminaci fosfolipidů uvolněných z trombocytů pomocí dvou centrifugací při 2000 g po dobu 15 minut a při teplotě 15 až 22 ° C. Díky tomu se získá plazma s počtem trombocytů $< 10 \times 10^9 / l$. V postupech prováděných dříve se doporučovalo zfiltrovat plazmu přes speciální 0,2 μm filtr nebo ultracentrifugaci ($> 5000 g$). Nový metodický postup britského výboru filtraci a ultracentrifugaci nedoporučují, protože může dojít ke vzniku mikrovezikulů. [25]

Samotný jeden test dostatečně citlivý na LA nebyl dosud objeven. Proto se doporučuje provádět dva testy na různých principech, které umožňují odhalit slabě pozitivní výskyt lupus antikoagulans a zlepšit specificitu metody u pacientů s pozitivním výskytem LA pouze v jednom testu. Jedním z doporučovaných 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 lupus antikoagulans a zlepšují specificitu metody. Avšak v těchto testech hraje roli 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. [24, 25]

Existují rozdíly v citlivosti a specifčnosti mezi reagensiemi. 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 normálním rozložení dat. ISTH doporučuje 99 percentil cut-off, u kterého by se zlepšila specifcita, 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 (od výrobce nebo na jiném analyzátoru), mohou být ověřeny v menším počtu vzorků normálních jedinců 20 až 60. [25]

Normální plazma by měla být testována s každou novou šarží vzorků a výsledek pacienta by měl být vyjádřen jako poměr k normální plazmě. Vnitřní kontrola kvality musí být prováděna u každé šarže testu používající LA – pozitivní a negativní plazmu. [25]

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 reagensí obsahuje již heparin neutralizující činidla na pokrytí profylaktické dávky. [25]

4 Cíl

Cílem mé bakalářské práce bylo stanovení lupus antikoagulans u pacientů s trombofilním stavem nebo u osob se zvýšenou hodnotou aPTT z neznámých příčin, pomocí diagnostických testů – aPTT Screen, Confirm a dRVVT Screen, Confirm. Pochopit principy vyhodnocování testů na LA a statisticky zpracovat naměřená data.

Vzhledem k tomu, že na Oddělení klinické hematologie zavádějí novou metodu (s použitím přístroje – ACL TOP 700 CTS) pro tyto testy, mým cílem bylo ji porovnat s původní metodou (na přístroji – SYSMEX CA 7000) a zjistit, zda splňuje požadavky podle nových doporučení.

5 Materiál a metodika

5.1 Přístroj ACL TOP 700 CTS

ACL TOP je nový, rychlý a plně automatický stolní analyzátor s přímým přístupem, navržený speciálně pro diagnostické klinické účely in vitro v hemostatických laboratořích pro zkoušky koagulace a enzymatického štěpení fibrinu při zjišťování a hodnocení trombózy. Umožňuje přímá měření zástavy krvácení a vypočítává příslušné parametry. Měření může provádět jak koagulační (turbidimetrická), chromogenní (absorbanční), tak imunologická. Součástí přístroje jsou také záložní zdroj USB, tiskárna a počítač, které slouží k co nejsnazší manipulaci při stanovení a interpretaci výsledků. [31]

Principem **koagulačních měření** je detekce sraženiny. Měří se čas potřebný k vytvoření sraženiny ve vzorku plazmy za pomoci měření optické hustoty. Tato metoda je založena na turbidimetrickém stanovení, kdy se měří průchod světla plazmou, ve které je fibrinogen přeměněn na fibrin. Světlo (671 nm) je absorbováno na vláknech fibrinu a prochází vzorkem na fotodetektor, který je umístěn pod úhlem 180° ke zdroji světla. Absorpce světla roste spolu s vytvářením fibrinové sraženiny, čímž se snižuje průchod světla vzorkem. Intenzita světla je měřena fotodetektozem. Odpovídající elektrický výstupní signál z fotodetektoru se následně mění podle intenzity detekovaného světla. Výstupní signál je zpracováván softwarem za pomoci řady algoritmů a je definován bod sražení. Příkladem těchto měření je test aPTT a dRVVT. [31]

U **chromogenního měření** se zjišťuje intenzita zabarvení (absorbance), která je monitorována při 405 nm pomocí kontinuálního uvolňování p-nitroanilínu (pNA) ze syntetického substrátu. Chromogenní kanály používají princip měření absorbance v kyvetě. Optické čidlo načítá světlo (405 nm), které prochází kyvetou. Světlo je absorbováno roztokem v kyvetě v přímém poměru ke koncentraci pNA. Množství světla, které projde až do fotodetektoru, se převádí na elektrický signál, který je úměrný aktivitě enzymu. [26, 31]

Princip **imunologického měření** se používá v systému pro přímě měření a záznam množství stanovované složky, tedy její koncentrace. Metoda je založena na tvorbě imunokomplexů ovlivňujících přenos světla. Imunologické zkoušky s ACL TOP používají 405 nm nebo 671 nm kanály v závislosti na zkoušce a složení reagentu. Optické čidlo načítá světlo (405 nm nebo 671 nm), které prochází květou. Absorbované světlo roztokem je přímo úměrné koncentraci imunokomplexů. Množství světla, které projde až do fotodetektoru, se převádí na elektrický signál, který je úměrný aktivitě stanovované látky. Chromogenní a imunologické měření se nevyužívá pro stanovení lupus antikoagulans. [22, 31]

5.1.1 Reagencie pro ACL TOP 700 CTS

Pro správné stanovení je výhodné, aby všechny použité reagencie byly od stejného výrobce. K testování vzorku je důležité použití [31]:

- nosného média – Rinse solution, který je připraven k použití.
- pomocných činidel k promytí přístroje – Cleaning solution (clean A) je připraven k použití, Cleaning agent (clean B) je neředěný a ředěný. Neředěný clean B se slije do lahviček a slouží k denní údržbě. Ředěný clean B se ředí v poměru 1 : 7 s destilovanou vodou do lahviček, které zůstávají v přístroji po celou dobu měření.
- Factor diluent se také přelije do lahvičky a zůstává v přístroji v průběhu celého měření.

Lupus antikogulans jsem diagnostikovala pomocí dvou metod SCT a dRVVT, k jednotlivým testům jsem použila následující reagencie [32, 33]:

- SCT Screen – 5 ml roztoku, obsahujícího koloidní silicu, pufr a konzervační látky. Má nízký obsah fosfolipidů.
- SCT Confirm – 5 ml roztoku s koloidní silicou, systetickými fosfolipidy, pufrém a konzervačními látkami.
- SCT CaCL₂ – 10 ml 0,025M CaCL₂ s polybrenem a konzervačními látkami.

- dRVV Screen – 2 ml lyofilizovaného roztoku s obsahem jedu Russellovy zmije, fosfolipidů, vápníku, polybrenu, pufru, stabilizátorů, barviv a konzervačních látek. Je to zjednodušená reagencie použita pro screeningový dRVVT test.
- dRVV Confirm – má stejné složení jako dRVV Screen s rozdílem přidání fosfolipidů. Používá se ke konfirmačnímu testu přítomnosti lupus antikoagulans.
- LA pozitivní kontrola – 1 ml lyofilizované lidské plazmy s pufrem, stabilizátory a konzervačními látkami. Pro přípravu byla použita lidská citrátová plazma od dárců s prokázanými antifosfolipidovými protilátkami.
- LA negativní kontrola – složení je stejné obdobné jako u LA pozitivní kontroly s rozdílem použití lidské citrátové plazmy chudé na destičky.
- Savo, destilovaná voda, injekční voda.

Kontroly obsahují materiál lidského původu, který byl v době poskytnutí shledán nereaktivní v testu na povrchový antigen viru hepatitidy B, v testu na protilátky proti viru hepatitidy C a v testu na protilátky proti viru HIV1/2. Veškerá příprava reagií se řídí doporučením ISTH. [32, 33]

5.1.2 Zpracování vzorku

Odběr vzorku se provádí do zkumavky s citrátem sodným, v poměru 9 : 1 (venózní krev : citrát). Krev se zcentrifuguje po dobu 10 minut při 3000 otáček. Odebere se svrchní vrstva plazmy a nechá se opět centrifugovat po dobu 10 minut při 3000 otáček. Poté se plazma skladuje při -80°C. Pro testování se vyberou příslušné zamražené vzorky, které se nechají vytemperovat v termostatu při teplotě 37 °C po dobu asi 15 minut. Před stanovením je potřeba vzorek mírně protřepat. [27, 35]

5.1.3 Postup

Nejdříve jsem spustila analyzátor a počítač, kde bylo potřeba vyplnit příslušné přihlašovací údaje. Nechala jsem přibližně 30 minut přístroj vytemperovat. Přístroj se po zapnutí sám zkontroluje – nastavení teploty („adjusting thermal“) a základní údržba („maintenance“). Validaci přístroje provádí firma Werfen Czech. [31]

Mezitím jsem si připravila všechny potřebné činidla a provedla se denní údržba (doplnění kyvet, rinse solution, cleaning agent, vylití odpadu, atd.). Podle schématu jsem do příslušných racků dala neředěný clean B a činidla [31]:

Tabulka 4. Umístění pomocných činidel v analyzátoru (D1, R2, R5, R6 – jednotlivé racky a zásuvky pro racky v přístroji) [31]

D1	R2	R5	R6
CLEAN B	CLEAN B		CLEAN B
Factor diluent	Clean B diluted	Clean B diluted	

Neředěný clean B slouží k údržbě – na dotykové obrazovce jsem vybrala „maintenance“, údržba: „Enhanced clean for all probes“ a po skončení údržby zmáčkla „OK“. Před vložením reagensů je nutné neředěný clean B vyndat. [31]

Pro dRVVT test jsem použila dRVV Screen. Je to lyofilizovaná reagencie, kterou jsem musela v lahvičce rozpustit ve 2 ml injekční vody a stabilizovat 15 minut při pokojové teplotě. Do lahvičky s dRVV Confirm jsem také napipetovala 2 ml injekční vody a opět nechala rozpustit při pokojové teplotě po dobu 15 minut. LA pozitivní kontrolu jsem připravila rozpuštěním v 1 ml injekční vody, nechala stát 15 minut při pokojové teplotě. To samé jsem provedla i s LA negativní kontrolou. Před vložením na příslušná místa v racku, jsem všechny reagencie opatrně promíchala a ujistila se, že jsou dobře rozpuštěny. [32]

Pro SCT test jsem použila SCT Confirm, který byl již v tekutém stavu od výrobce a nebylo třeba ho rozpouštět, jako u předešlých reagensů. Bylo potřeba ho promíchat zhruba 5 sekund na vortexu. Z SCT Confirm jsem odebrala 50 μ l a napipetovala do lahvičky s SCT Screen. Před vložením do analyzátoru jsem ho promíchala asi 5 sekund na vortexu. SCT CaCL₂ byl také připraven už od výrobce, a proto ho stačilo jen promíchat převrácením lahvičky. [33]

Reagencie dRVV Screen a dRVV Confirm jsem vložila do prostoru pro reagencie do dvou racků na pozici 1. Reagencie SCT Screen, SCT Confirm do dvou racků na pozici 2 a SCT CaCL₂ na pozici 3 jednoho z racků. Přístroj rozpoznal vložené reagencie a nebyla potřeba je zadávat ručně. [31, 32]

Vedoucí mé bakalářské práce vybrala vzorky pacientů (pozitivní, negativní), jež měly požadavek na stanovení lupus antikoagulans. Vzorky byly zmrazeny při -80 °C, proto je bylo nutné vložit do termostatu při 37 °C na 15 minut. [27, 35]

Rozmrazené testované plazmy jsem vložila na příslušné pozice v racku a umístila do prostoru pro vzorky v analyzátoru. Poté jsem na dotykové obrazovce popsala kontroly, jednotlivé vzorky podle jmen pacientů a podle toho, ve které pozici v racku jsou a navolila u každého z nich provedení příslušných metod – screeningový test dRVVT, SCT a konfirmační test dRVVT, SCT. Po proběhnutí testu se na obrazovce zobrazily výsledky kontrol a pacientů. Hodnoty kontrol jsem ověřila podle doporučení od výrobce a pak jsem všechny výsledky vytiskla. Vyndala jsem všechny reagentie, testované vzorky a program analyzátoru jsem ukončila. Na závěr se přístroj vypnul včetně počítače a tiskárny. [31, 32]

5.1.4 Naměřené hodnoty

Analyzátor ACL TOP 700 má ve svém systému nainstalovaný vzorec pro výpočet jednotlivých poměrů. Takže v celkových výsledcích jsou uvedeny časy pro dRVVT, SCT, Screen Ratio, Confirm Ratio a normalizovaný dRVVT a SCT poměr. K výpočtu jednotlivých poměrů (= ratio) slouží následující postupy [32, 33]:

$$\text{Screen Ratio} = \frac{\text{testovaná plazma v LAC Screen testu (s)}}{\text{střední hodnota normálního rozmezí testu LAC Screen (s)}}$$

$$\text{Confirm Ratio} = \frac{\text{testovaná plazma v LAC Confirm testu (s)}}{\text{střední hodnota normálního rozmezí testu LAC Confirm (s)}}$$

$$\text{Normalizovaný LAC poměr} = \frac{\text{Screen Ratio}}{\text{Confirm Ratio}}$$

Stejně výpočty se provedou i pro SCT test. U každé nové šarže reagentií pro testy dRVVT a SCT je důležité stanovení nového normálního rozmezí, dané příslušnou střední hodnotou v sekundách. Střední hodnota normálního rozmezí je použita jako konstantní jmenovatel pro výpočet jednotlivých poměrů (ratio). [32, 33]

5.2 Příklad SYSMEX CA 7000

SYSMEX CA 7000 je automatický analyzátor, který provádí vyšetření koagulační, chromogenní a imunologickou metodou. Principy jednotlivých měření jsou podobné jako v kapitole 5.1 Příklad ACL TOP 700 CTS. Součástí analyzátoru je pneumatická jednotka, sampler, napájecí jednotka, tiskárna a záložní zdroj. [37]

5.2.1 Reagencie pro SYSMEX CA 7000

Pro měření na přístroji SYSMEX jsou důležitá následující reagenty [27, 34, 35, 36]:

- CA Clean II – promývací roztok
- DVVtest – 2 ml lyofilizovaného přípravku, obsahuje směs hadího jedu Russellovy zmije, vápníku, fosfolipidů, inertních aditiv a konzervačních činidel.
- DVVconfirm – 1 ml lyofilizovaného přípravku, má stejné složení jako DVVtest.
- PTT-LA – 2 ml lyofilizovaná reagenty obsahující kefalín z mozkové tkáně králíka a aktivátor z křemičitanových částic v pufrovaném prostředí.
- CaCl₂ – 0,025 M
- NKP je Normal Multi Control – 1 ml lyofilizované lidské plazmy s pufrem, stabilizátory a konzervačními látkami.
- LATrol Normal Control – 1 ml lyofilizované lidské plazmy s pufrem, stabilizátory a konzervačními látkami. Pro přípravu byla použita lidská citrátová plazma od dárců s prokázanými antifosfolipidovými protilátkami.
- LATrol Abnormal Control – 0,5 ml lyofilizované lidské citrátové plazmy chudé na destičky s pufrem, stabilizátory a konzervačními látkami.
- Savo, destilovaná voda, injekční voda.

Pro odběr a zpracování vzorku pacienta platí stejná pravidla, jako pro zpracování plazmy v kapitole 5.1.1 Reagenty pro ACL TOP 700 CTS.

5.2.2 Postup

Přístroj zůstává stále v provozu. Pouze 1x za 24 hodin je nutné ho na krátkou dobu vypnout pro uvedení do původního nastavení. Z tohoto důvodu jsem analyzátor nezapínala ani nevypínala. [37]

Pro dRVVT test jsem použila DVVtest, který jsem připravila rozpuštěním ve 2 ml injekční vody. Bylo nutné reagentii stabilizovat 15 minut při pokojové teplotě. Roztok jsem přelila do kyvety – Technicon a umístila do analyzátoru do zásuvky R2 pozice 5. Do lahvičky s DVVconfirm jsem napipetovala 1 ml injekční vody, nechala rozpustit při pokojové teplotě po dobu 15 minut a obsah přelila do kyvety – Technicon a umístila do zásuvky F2 pozice 4 v přístroji. Normal Multi Control jsem rozpustila v 1 ml injekční vody. LA Normal Control jsem připravila napipetováním 1 ml injekční vody. Do LA Abnormal Control jsem napipetovala 0,5 ml injekční vody. Všechny kontroly jsem nechala stát při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Před vložením na příslušná místa v racku, jsem reagentie jemně promíchala. [35]

Veškeré reagentie včetně Sava, kontrol a vzorky pacientů se musely ručně zadávat do přístroje.

Jednotlivé zkumavky se vzorky jsem postupně naskládala do racku očíslovaném 1 – 10 a vložila do podavače vzorků. Analyzátor si přiřadí metody k číslu vzorku podle pracovního listu. Na dotykové obrazovce jsem zvolila „Work List“, „ID No. Entry“ – napsala identifikační číslo vzorku podle příslušné pozice v racku a navolila příslušné metody „DRVVT“ (screeningový test) a „DRVVCo“ (konfirmační test). Zmáčknutím „Enter“ se kurzor posune na další řádek. Tento postup jsem opakovala, podle toho, kolik jsem měla obsazených pozic v racku. Po zadání příslušných hodnot jsem spustila analýzu. [35, 36]

U testu aPPT jsem reagentii PTT-LA rozpustila ve 2 ml injekční vody, nechala stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě. Poté jsem lahvičku protřepala, přelila do kyvety – Technicon a vložila do zásuvky R5 na pozici 5. CaCl_2 byla již připravena k použití, a proto jsem ho umístila do zásuvky R2 na pozici 3. Normal Multi Control jsem rozpustila v 1 ml injekční vody. Nechala jsem kontrolu stát při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Po uplynutí doby jsem lahvičku promíchala a $\frac{3}{4}$ ml přelila do kyvetky –

Technicon, zbytek reagencie jsem přelila do plastové zkumavky. Kontrolu jsem umístila do zásuvky F na pozici 8. Zbývající dvě kontroly byly připraveny stejně jako pro test dRVVT. [36]

Pro změření vzorků a kontrol jsem postupovala stejně jako u metody dRVVT s rozdílem, že u zadávání metod jsem navolila „LA“ a „LA.KT“. [36]

Po ukončení obou měření jsem výsledky zkontrolovala a vytiskla.

5.2.3 Naměřené hodnoty

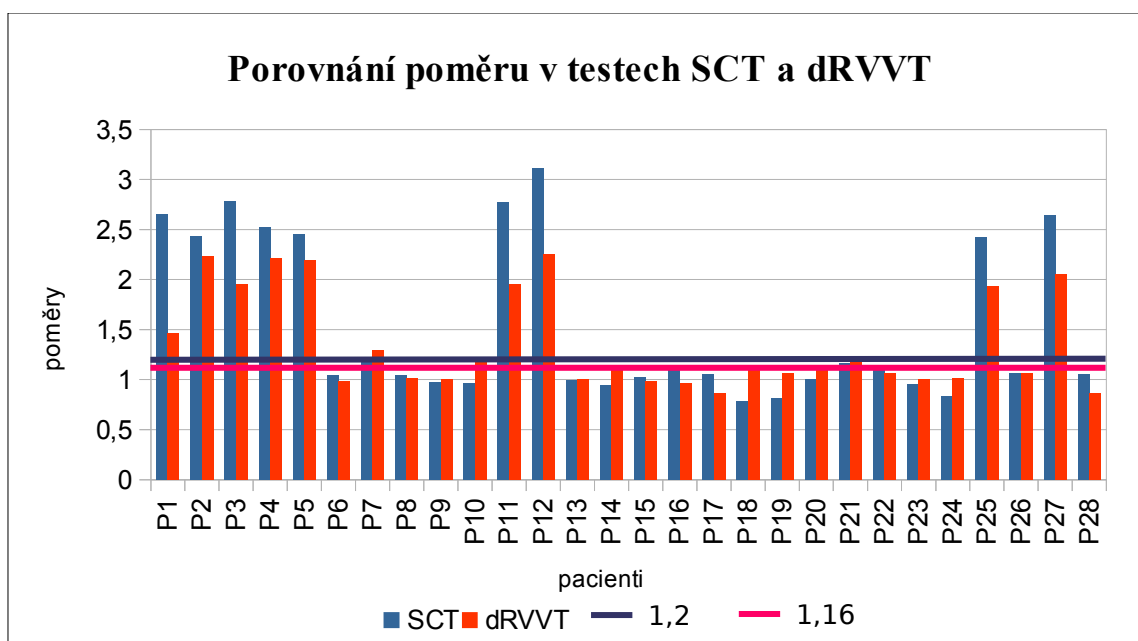
Analyzátor SYSMEX oproti ACL TOP nemá nainstalovaný program, který vypočítá poměry časů, proto se musí spočítat samostatně. Vzorce pro dané výpočty viz. Kapitola 5.1.4 Naměřené hodnoty. Pro dosazení do vzorce se použijí hodnoty naměřené na přístroji SYSMEX.

6 Výsledky

Na přístroji ACL TOP 700 CTS jsem změřila 28 vzorků pacientů s požadavkem na vyšetření lupus antikoagulans a 2 pacienty s hemofilií pro lepší orientaci ve srovnání rozdílných poměrů časů. Stejní pacienti byli změřeni i na přístroji SYSMEX CA 7000. Tabulka 5. udává SCT S – což je screeningový test, hodnoty jsou dány poměrem plazma pacienta / normální plazma u testu Silica Clotting Time, stejné poměry také pro dRVVT S (screeningový test pro metodu používající hadí jed). Konfirmační test a jeho poměr jsou v tabulce ve sloupci SCT C a dRVVT C. Zkratky pos, neg určují pozitivního, negativního pacienta. Z těchto hodnot jsem zhotovila graf (Graf 1.)

Tabulka 5. Přehled výsledků naměřených na přístroji ACL TOP 700 CTS

Pacienti	SCT C	SCT S	SCT	dRVVT C	dRVVT S	dRVVT	Hodnocení
P1	1,17	3,10	2,65	0,97	1,41	1,46	pos
P2	1,21	2,93	2,43	1,11	2,47	2,23	pos
P3	1,11	3,09	2,78	1,03	2,02	1,95	pos
P4	1,34	3,38	2,52	1,05	2,33	2,21	pos
P5	1,19	2,92	2,45	1,08	2,37	2,19	pos
P6	1,21	1,25	1,04	0,87	0,85	0,98	neg
P7	1,17	1,36	1,17	0,93	1,21	1,29	pos
P8	1,15	1,19	1,04	0,88	0,88	1,01	neg
P9	0,97	0,94	0,97	1,01	1,01	1,00	neg
P10	0,87	0,84	0,96	1,14	1,36	1,19	neg
P11	1,01	2,8	2,77	1,03	2,02	1,95	pos
P12	1,11	3,44	3,11	1,18	2,66	2,25	pos
P13	1,37	1,35	0,99	1,03	1,03	1,00	neg
P14	1,30	1,21	0,94	1,07	1,17	1,10	neg
P15	1,13	1,15	1,02	1,03	1,01	0,98	neg
P16	1,25	1,38	1,10	1,02	0,98	0,96	neg
P17	1,01	1,07	1,05	1,19	1,02	0,86	neg
P18	1,39	1,08	0,78	1,07	1,18	1,11	neg
P19	1,20	0,97	0,81	0,89	0,94	1,06	neg
P20	0,91	0,92	1,00	0,98	1,09	1,11	neg
P21	1,05	1,22	1,16	1,06	1,25	1,17	neg
P22	0,87	0,97	1,12	0,98	1,04	1,06	neg
P23	1,19	1,13	0,95	1,02	1,02	1,00	neg
P24	0,83	0,88	0,83	0,94	0,96	1,01	neg
P25	1,03	2,49	2,42	1,17	2,25	1,93	pos
P26	0,93	0,99	1,06	0,94	1,00	1,06	neg
P27	1,02	2,70	2,64	1,09	2,23	2,05	pos
P28	1,01	1,06	1,05	0,97	0,83	0,86	neg
hemofilik 1	4,52	3,56	0,79	1,03	1,19	1,16	
hemofilik 2	1,54	1,53	0,99	0,97	1,01	1,04	

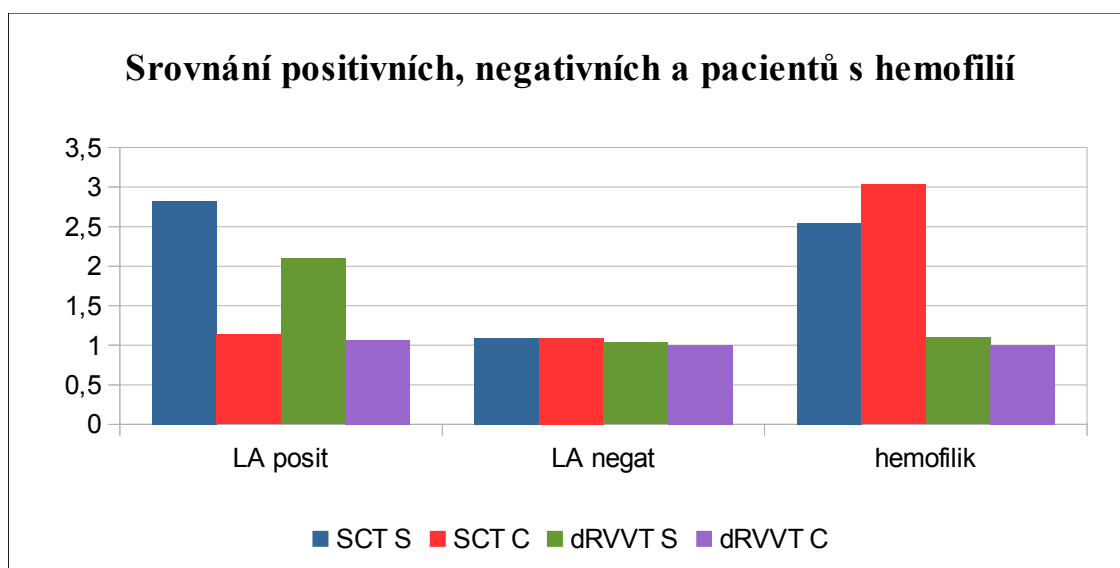


Graf 1. První graf je vyhotoven z výsledků 28 pacientů. Je zde vidět srovnání celkových poměrů (ratio SCT Screen / ratio SCT Confirm; ratio dRVVT Screen / ratio dRVVT Confirm) u testu SCT (modrá barva) a dRVVT (červená barva) na přístroji ACL TOP 700 CTS. Přímkou vyznačené v grafu slouží k orientaci pro hranici pozitivních a negativních hodnot. Z toho vyplývá, že všechny hodnoty nad tmavě modrou přímkou pro 1,20 u dRVVT jsou pozitivní. Pro test SCT jsou pozitivní hodnoty nad růžovou přímkou pro 1,16.

Druhý graf (Graf 2.) jsem zhotovila ze stejných hodnot napsaných v Tabulce 5. Spočítala jsem průměry všech pozitivních, negativních vzorků a dvou hemofiliků z průměrů testů SCT C, SCT S, dRVVT C, dRVVT S (viz. Tabulka 6.).

Tabulka 6. Průměrné hodnoty poměrů testů u negativních, pozitivních a pacientů s hemofilii

	SCT C	SCT S	dRVVT C	dRVVT S
průměr-pos	1,14	2,82	1,06	2,10
průměr-neg	1,09	1,09	1,01	1,03
průměr-hemofiliků	3,03	2,55	1,00	1,10



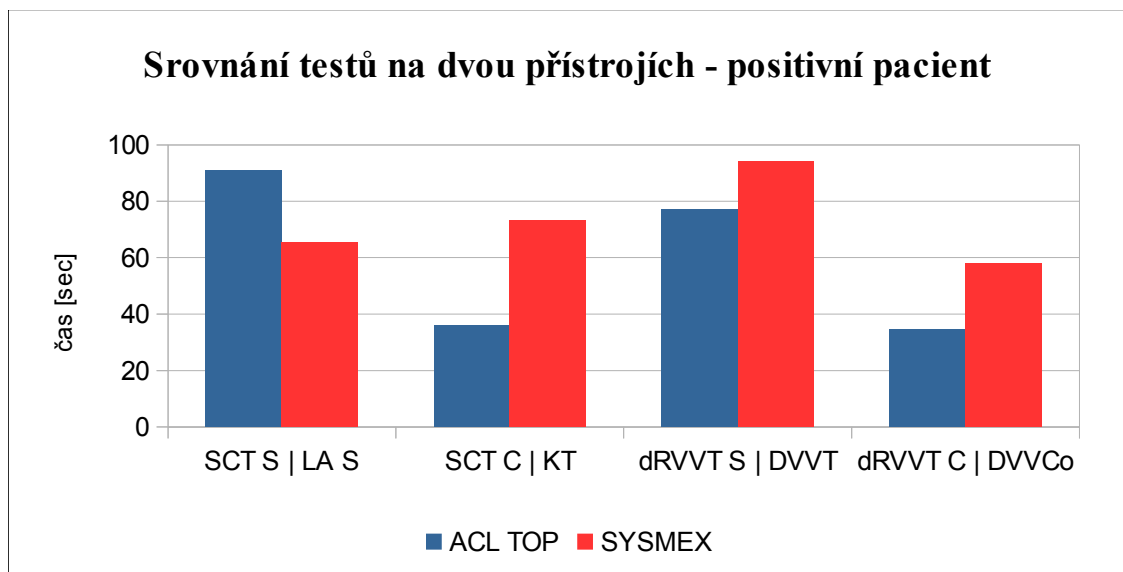
Graf 2. Druhý graf slouží pro přehlednost rozdílů mezi pozitivními, negativními výsledky a hemofiliky. Jednotlivé sloupce znázorňují průměry poměrů (čas pacienta / čas normálu) ve screeningových testech SCT S, dRVVT S a konfirmačních testech SCT C, dRVVT C.

U dalších grafů (Graf 3., 4.) jsem vzala jednoho pacienta pozitivního a jednoho negativního. Oba byli změřeni na analyzátoch ACL TOP 700 CTS a SYSMEX CA 7000. Srovnávala jsem jejich naměřené časy v testech dRVVT S, dRVVT C pro oba analyzátory; LA S (screeningový test aPTT), KT (směsný test aPTT) pro přístroj SYSMEX; SCT S, SCT C pro ACL TOP (viz. Tabulka 7.).

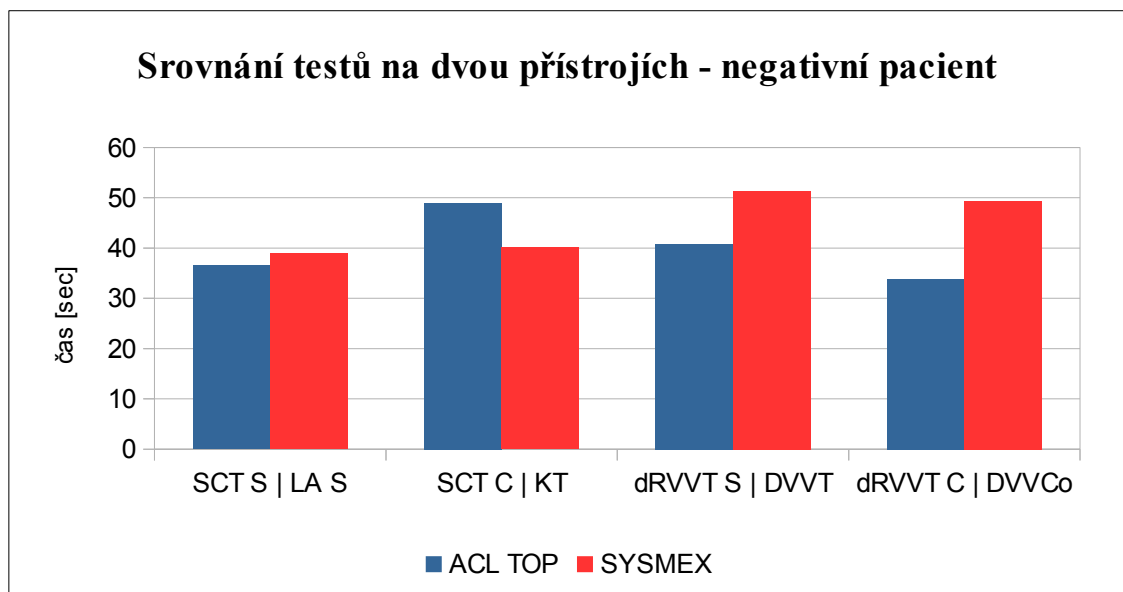
Tabulka 7. Hodnoty naměřené na přístroji SYSMEX a ACL TOP pro pozitivního a negativního pacienta.

Pozitivní pacient				
SYSMEX	LA S	KT	DVVT	DVVCo
	65,3	73,4	94,3	58,0
ACL TOP	SCT S	SCT C	dRVVT S	dRVVT C
	90,9	35,9	77,1	34,4

Negativní pacient				
SYSMEX	LA S	KT	DVVT	DVVCo
	38,9	40,1	51,4	49,3
ACL TOP	SCT S	SCT C	dRVVT S	dRVVT C
	36,5	49	40,8	33,8

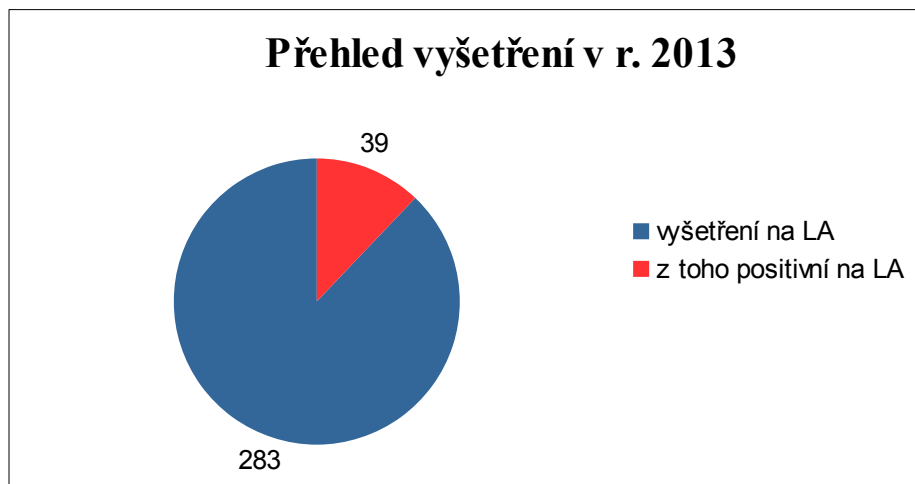


Graf 3. Srovnání časů všech testů pozitivního pacienta na obou přístrojích.



Graf 4. Srovnání časů všech testů negativního pacienta na obou přístrojích.

Za rok 2013 bylo na Oddělení klinické hematologie celkem změřeno kolem 100 000 pacientů, z toho bylo u 283 pacientů požadavek na vyšetření lupus antikoagulans. Pozitivních pacientů bylo 39, zbytek 244 negativní. Z těchto hodnot jsem vyhotovila graf (Graf 5.).



Graf 5. Všechna vyšetření lupus antikoagulans za rok 2013.

Abych porovnála měření na obou přístrojích ACL TOP a SYSMEX, vytvořila jsem t-test pro dRVVT (Tabulka 8). Je to statistická funkce umožňující porovnání dvou skupin. Soubor 1 je vytvořen z hodnot celkových poměrů dRVVT naměřených na přístroji ACL TOP. Soubor 2 je získán z hodnot dRVVT na přístroji SYSMEX.

Tabulka 8. T-test pro dRVVT

	soubor 1	soubor 2
Stř. hodnota	1,358214	1,237857
Rozptyl	0,2438	0,126292
Pozorování	28	28
Sm.odch.	0,493761	0,355375
T-test	0,300286886	
významnost	p > 0,05	

Z těchto výsledků vyplývá, že hodnota 0,300286886 představuje pravděpodobnost nulové hypotézy o shodě průměrů obou souborů (pravděpodobnost

chyby α), tzn. že mezi průměry souborů byl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0,05$).

Vytvořila jsem také t-test pro pozitivní a negativní pacienty, kdy pozitivní jsem označila jako 1 a negativní jako 2, abych skupiny mohla vyhodnotit. Soubor 1 představuje vzorky naměřené na přístroji ACL, soubor 2 hodnoty z přístroje SYSMEX (viz. Tabulka 9). Oba soubory odpovídají výsledkům celkových poměrů z dRVVT testu.

Tabulka 9. T-test pro pozitivní a negativní pacienty

	soubor 1	soubor 2
Stř. hodnota	1,642857	1,678571
Rozptyl	0,238095	0,22619
Pozorování	28	28
Sm.odch.	0,48795	0,475595
T-test	0,7825703217	
významnost	p > 0,05	

Hodnota 0,782570322 představuje pravděpodobnost nulové hypotézy o shodě průměrů. Mezi soubory nebyl zjištěn statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0,05$).

7 Diskuze

Svou práci jsem vypracovala na Oddělení klinické hematologie ve fakultní nemocnici Motol, kam byla zaslána řada vzorků s žádankou na stanovení lupus antikoagulans. Požadavek u pacientů na vyšetření lupus antikoagulans může být z různých příčin. Nejčastějšími důvody jsou prodloužené koagulační testy z neznámých příčin, pacienti s trombofilními stavy, konkrétně se získaným antifosfolipidovým syndromem.

V laboratoři klinické hematologie se zavádí nová metoda pro vyšetření LA na novém a plně automatizovaném stolním analyzátoru ACL TOP 700 CTS, který umožňuje stanovení koagulace. Tuto metodu jsem použila pro získání výsledků u zadaných pacientů. Pro srovnání jsem si také vyzkoušela měření na již zavedeném přístroji v provozu – SYSMEX CA 7000. Co se týče metodiky práce, je mnohem jednodušší měřit na novém přístroji ACL TOP 700 CTS. Promývací roztoky, kontroly a reagenty jsou v přístroji už nastavené a zadané, proto po vložení roztoků do přístroje, které si načte sám pomocí čárového kódu, stačí pouze odkliknout na dotykové obrazovce příslušná požadovaná měření. Oproti přístroji SYSMEX CA 7000, u kterého se promývací roztoky, kontroly, reagenty musí ručně zadávat každé zvlášť. Zde hrozí záměna reagenty z nepozornosti. U ACL TOP pokud se spotřebuje reagenty před doměřením pacientů, stačí ji pouze doplnit a v měření se může pokračovat. Stroj přeruší práci, aniž by spotřeboval patientský vzorek a pak si stále pamatuje zadanou metodu. Nevýhoda u SYSMEXu je, pokud dojde nějaká reagenty, v tomto případě se vzorek pacienta použije a poté se musí i všechny metody znovu zadat. Další výhodou přístroje ACL TOP je, že jsou všechny reagenty i kontroly od stejného výrobce, což může být zárukou správného a přesného měření.

Obě metody jsou založené na stejném principu, ale používají jiné reagenty a jiný postup testů. Svým měřením jsem zjistila, že výsledky, jestli pacient je negativní nebo pozitivní, vychází stejně, ale liší se v hodnotách výsledku – v čase testu nebo v poměru testu. Odlišnost hodnoty výsledku je dána použitím různých reagentů i fosfolipidy a hadími jedy. Jedná se totiž o reagenty vyrobené z biologického

materiálu a vždy mezi jednotlivými reagensii budou minimální rozdíly. Platí to nejen pro metody stanovení lupus antikoagulans na dvou přístrojích, při stejných reagensii a stejným postupem, ale také mezi jednotlivými laboratořemi. Existuje celá řada diagnostických testů, které se liší svou specificitou a senzitivitou. Z tohoto důvodu nejsou přesně dané hodnoty o frekvenci LA v populaci. Proto je také jednodušší zavádět novou metodu, pokud máme vše od jednoho výrobce a můžeme použít jejich hodnoty kontrol a cut-off pro referenční rozmezí. Pro testování lupus antikoagulans na analyzátoru ACL TOP stačí menší skupina normálních vzorků okolo 20 – 60, protože stanovené hodnoty cut-off jsou už dané z přístroje SYSMEX. [25]

Pro stanovení LA u obou dvou metod, platí použití screeningového a konfirmačního testu u dRVVT, ale aPTT se liší. U přístroje ACL TOP se provádí screeningový test, který je stejný i pro SYSMEX. Rozdíl se nachází u druhého testu, kdy u ACL TOP se provádí konfirmační, ale u SYSMEXu směsný test. Konfirmační test se u metody prováděné na SYSMEXu používá pouze v nejasných případech a velmi zřídka. Ve své práci jsem porovnávala naměřené časy všech testů u dRVVT u pozitivního a negativního pacienta na obou přístrojích. U testu aPTT by vycházely rozdíly z uvedených důvodů. Z výsledků jsem pak zhotovila grafy (více viz. Graf 3, 4), na kterých lze vidět, že se hodnoty neliší a rozdíly nejsou statisticky významné.

Dalším cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda metoda ACL TOP splňuje aktualizovaná doporučení uvedeny v kapitole 3.1.4 Nová doporučení. Postupy u screeningových a konfirmačních testů jsou dodrženy. Rozdíl je u směsných testů. Screeningové a konfirmační testy jsou natolik přesné, že se krok se směsnými testy může vynechat. Důvodem je nízká pozitivita u vzorků pacientů, kdy se ve směsných testech jeví jako negativní. Pokud se tedy provede screeningový test a aPTT vyjde negativně, ale dRVVT pozitivně, přistupuje se rovnou ke konfirmačnímu testu.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo naučit se stanovit lupus antikoagulans a porovnat nově zaváděnou metodu s metodou již rutinně používanou.

Ze všech 283 požadavků na vyšetření lupus antikoagulans za rok 2013, bylo pouze 39 pozitivních pacientů. Z těchto pacientů bylo k porovnání dvou metod vybráno 28 pacientů, z toho bylo 10 pozitivních a 18 negativních.

Výsledky z přístroje ACL TOP byly pomocí t-testu porovnány s výsledky z přístroje SYSMEX. Oba analyzátory dávají stejné výsledky a rozdíly v naměřených hodnotách v testech nejsou statisticky významné. U obou analyzátorů jsou uvedeny výhody a nevýhody metod pro stanovení LA.

Metoda, která se teprve zavádí, splňuje nová doporučení postupu stanovení z roku 2012 a z pohledu uživatele se zdá být lepší.

REFERENČNÍ SEZNAM

1. Trombofilní stavy. In: *Vitalion* [online]. 2014 [cit. 2014-03-29]. Dostupné z: <http://nemoci.vitalion.cz/trombofilni-stavy/>
2. KESSLER, Petr. Trombofilní stavy. *Interní medicína pro praxi*. 2006, č. 9, 374 – 379.
3. KVASNIČKA, Jan. *Trombofilie a trombotické stavy v klinické praxi*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2003, 299 s. ISBN 80-716-9993-4.
4. PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ, Eva. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 421 s., 30, 8, 23 s. obr. příl. ISBN 978-802-4734-590.
5. PENKA, Miroslav, BULIKOVÁ, Alena. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009, 240 s. ISBN 978-802-4722-993
6. Trombofilie. *Academy Spektrum zdraví* [online]. 2013 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://www.spektrumzdravi.cz/academy/trombofilie>
7. FRIEDMANN, Bedřich, VAŇÁSEK, Jaroslav. *Hematologie v praxi*. 1994. vyd. Praha: Galén, c1994, s. 368. ISBN 80-85824-05-1.
8. PORAZILOVÁ, Milena. *Prevence tromboembolické nemoci po ortopedických operacích* [online]. Brno, 2010 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/259066/lf_b/BP_M.Porazilova.txt. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita. Vedoucí práce Mgr. Jana Kadlíková.
9. PENKA, Miroslav. Postgraduální medicína. *Trombofilie a klinické závažnosti z hlediska diagnostiky* [online]. 2005 [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/trombofilie-a-klinicke-zavaznosti-z-hlediska-diagnostiky-165260>
10. ROSENDAAL, FR. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk, and interaction. *Semin Hematol*, 1997, 34, p. 171-187
11. KRŠKA, Zdeněk. *Tromboembolická nemoc v chirurgii*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998, 166 s. Trendy soudobé chirurgie, sv. 2. ISBN 80-858-2475-2.
12. FOJTÍK, Z. Antifosfolipidový syndrom. *Vnitřní lékařství*, 2006, č. 52, s. 718-725
13. KAUSHANSKY, Kenneth, WILLIAMS, William J. *Williams hematology*. 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical, c2010, xxiii, 2439 p. ISBN 9780071621519.
14. HIRMEROVÁ, Jana. Postgraduální medicína. *Antifosfolipidový syndrom* [online]. 2010 [cit. 2014-03-10]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/antifosfolipidovy-syndrom-448924>
15. BULÍKOVÁ, Alena, PENKA, Miroslav. Antifosfolipidový syndrom. *Interní medicína*, 2006, č. 5, s. 240-243.

16. HLUŠÍ, A., KRČOVÁ, V. Antifosfolipidový syndrom. *Interní medicína pro praxi*, 2003, č. 9, s. 434-436
17. ESPINOSA, G., CERVERA, R. Antihospholipid syndrome. *Arthritis Research & Therapy*, 2008, 10, s. 230–238
18. DEVREESE, Katrien, HOYLAERTS, Marc F. Laboratory diagnosis of the antiphospholipid syndrome: a plethora of obstacles to overcome. *European Journal of Haematology*. 2009, č. 83, s. 1 - 16.
19. RUIZ-IRASTORZA, G., KHAMASHTA MA. The treatment of antiphospholipid syndrome: a harmonic contrast. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007, č. 21, s. 1079-1092.
20. FIELD, S. L., HOGG, P. J., DALY, E. B., DAI, Y .P., MURRAY, B., OWENS, D., CHESTERMAN, C. Lupus Anticoagulants Form Immune Komplex With Prothrombin and Phospholipid That Can Augment Trombin Production in Flow. *Blood*, 1999, č. 10, s. 3421-3431
21. ČECHOVÁ, M. *Získané hyperkoagulační stavy se zaměřením na lupus antikoagulans* [online]. České Budějovice, 2008 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z: <https://wstag.jcu.cz/portal/prohlizeni/index.jsp>. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích.
22. ČERMÁKOVÁ, Marta. *Klinická biochemie - 2.díl*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2005, 2 sv. (120, 164 s.). ISBN 80-7013-424-02.
23. Lupus antikoagulans. *Lab Test Online* [online]. 2009 [cit. 2014-04-06]. Dostupné z: <http://www.labtestsonline.cz/tests/LupusAnticoagulant.html?tab=2>
24. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009, č. 7, 1737 - 1740. DOI: 10.1111/j.15387836.2009.03555.X.
25. KEELING, David, MACKIE, Ian, MOORE, Gary, W., GREER, Ian, A., GREAVES, Michael. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *British Journal of Haematology*. 2012, vol. 157, issue 1, s. 47-58. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09037.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2012.09037.x>
26. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie hemostázy*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 2004, 237 s. ISBN 80-866-8203-X.
27. *Diagnostica Stago S. A. S.: Reagencie APTT citlivá k lupus antikoagulans*: REF 00599. Francie, 2012.
28. Dilute Russell's Viper Venom Time [DRVVT]. In: *Practical-Haemostasis.com: A practical guide to laboratory haemostasis* [online]. 2012 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <http://practical-haemostasis.com/Thrombophilia%20Tests/APS/drvvt.html>
29. DRVVT screening směsi P+N 1:1. *IK+EM* [online]. 2011 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: http://www.ikem.cz/plm_lp/_LP_12289-L0000006.htm

30. Silica Clotting Time [SCT]. *Practical-Haemostasis.com: A practical guide to laboratory haemostasis* [online]. 2012 [cit. 2014-04-12]. Dostupné z: <http://practical-haemostasis.com/Thrombophilia%20Tests/APS/sct.html>
31. *ACL TOP 700 CTS: Standardní operační postup - technický č. IISOPT_1OKH_393/2013-1*. FN Motol - Oddělení klinické hematologie, Praha, 2013.
32. *Werfen Czech: LAC Screen 0020008000, LAC Confirm0020008200*. Praha, 2008.
33. *Werfen Czech: Silica Clotting Time 0020004800*. Praha, 2008.
34. *Diagnostica a. s.: DVVT test: REF 810/825, REF 815/815L*. Praha, 2011.
35. *Lupus antikoagulans DRVV test: Standardní operační postup – metodický č. IISOPM_1OKH_333/2011-02*. FN Motol - Oddělení klinické hematologie, Praha, 2012.
36. *Lupus antikoagulans LA-APTT test: Standardní operační postup – metodický č. IISOPM_1OKH_333/2011-02*. FN Motol - Oddělení klinické hematologie, Praha, 2012.
37. *Koagulační analyzátor SYSMEX CA 7000 - 1: Standardní operační postup – technický č. IISOPT_1OKH_380/2011-02*. FN Motol - Oddělení klinické hematologie, Praha, 2012.