



**XXVIII. ČESKO - SLOVENSKÁ KONFERENCE
O TROMBÓZE A HEMOSTÁZE &**

**XX. ČESKO - SLOVENSKÁ KONFERENCE
LABORATORNÍ HEMATOLOGIE**

SBORNÍK ABSTRAKT

14.-16. 9. 2022
Kongresové centrum Aldis
Hradec Králové

Pořadatel



Odborná garance



Česká společnost
pro trombózu a hemostázu



Slovenská spoločnosť
pro trombózu a hemostázu



Česká hematologická
společnost

Prezident konference

Prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.

Prezident konference za SSHT

Prof. MUDr. Ján Staško, CSc.

Čestný prezident konference

Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

Na přípravě konference se jako prezident za SSHT podílel

Prof. MUDr. Peter Kubisz, Dr.Sc., MPH.

Requiescat in pace!

DĚKUJEME ZA PODPORU!

GENERÁLNÍ PARTNER

Bayer s.r.o.
Octapharma CZ s.r.o.
ROCHE s.r.o.
Takeda Pharmaceuticals Czech Republic s.r.o.

PLATINOVÝ PARTNER

Novo Nordisk, s.r.o.
Swedish Orphan Biovitrum s.r.o.

ZLATÝ PARTNER

sanofi-aventis, s.r.o.

STŘÍBRNÝ PARTNER

CSL BEHRING s.r.o.
Siemens Healthcare, s.r.o.
Sysmex CZ s.r.o.
Terumo BCT
Viatris CZ, s.r.o.

BRONZOVÝ PARTNER

Abbott Laboratories, s.r.o.
AMGEN s.r.o.
Beckman Coulter ČR s.r.o.
BIOMEDICA ČS, s.r.o.
BioVendor – Laboratorní medicína a.s.
Diagnostica, s.r.o.
Grifols s.r.o.
MEDESA s.r.o.
MEDISTA, spol. s r.o.
Werfen Czech s.r.o.

OBSAH

Cirkulující extracelulární vezikuly a trombotické komplikace BCR/ABL1 negativních myeloproliferativních neoplázií v reálném životě

Aswad M.H. et al.8

Emicizumab, léčba hemofilie A – výzva pro laboratorní diagnostiku

Bradáčová P. et al.10

Naše zkušenosti s monitorováním ADAMTS13 u pacientů se získanou trombotickou trombocytopenickou purpurou

Buffa D. et al.11

Hity letošního jara a předjaří

Bulíková A. et al.13

Myeloproliferativní choroby z pohledu klinického, cytologického a histologického

Bělohávková P. et al.15

Průkaz heparinem indukované trombocytopenie/Kazuistika pacient s COVID-19

Husáková M. et al.16

Hyperhomocysteinémie jako možná příčina trombózy

Ješina P., Kožich V.17

Porovnání účinnosti enterosolventní versus non-enterosolventní formy kyseliny acetylsalicylové na inhibici funkce krevních destiček

Kessler P. et al.18

Průkaz fetálních erytrocytů pomocí průtokové cytometrie

Kmentová K. et al.20

Kaplicizumab v léčbě trombotické trombocytopenické purpury – analýza dat z databáze VILP

Lánská M. et al.21

Metodiky využívané v souvislosti s COVID-19 (Trombelastometrie, faktor XIII, aktivita anti-Xa UFH) a význam stanovení faktoru XIII u kriticky nemocných pacientů napojených na ECMO

Malíková I. et al.22

Myslíme na dysfibrinogénie?

Matýšková M., Zavřelová J.24

IVD-R legislativa v hematologické laboratoři

Mikešová M.25

Cytologie – diferenciální diagnostika pancytopenií

Mikulenková D.27

Diagnostika a manažment vrozeného deficitu faktoru XIII

Plameňová I. et al.28

Potransfuzní reakce v klinické praxi

Procházková R.29

Impedanční agregometrie

Pulcer M. et al.31

**Hematologický analyzátor
Beckman Coulter DxH 560**

Pulcer M. et al.32

**Koagulační analyzátor Sysmex
CN-6000 – první zkušenosti v ČR**

Recová L. et al.33

**Průtoková cytometrie jako nástroj
ke screeningu leukocytů**

Říhová L. et al.34

**Kazuistika pacienta s imunitní
trombotickou trombocytopenií
vyvolanou vakcinací proti
onemocnění Covid-19 (VITT)**

Sadílek P. et al.36

**Fragmenty protrombinu 1+2 včera,
dnes a zítra**

Sadílek P. et al.37

**Deset let s přímými
antikoagulancii**

Šigutová P.38

**Vrozená dysfibrinogenémie:
pokroky vo výskume, diagnostike
a manažmente liečby**

Šimurda T. et al.40

**Léčba pacientů se získanou
hemofilií A, zkušenosti
z brněnského centra**

Smejkal P. et al.41

**Syndróm lepidých doštičiek
u pacientok so spontánnym
abortom**

Sokol J. et al.43

**Sticky platelet syndrome (SPS)
– kde sme a kam smerujeme
v roku 2022?**

Staško J. et al.44

**Hemocytometrické prognostické
skóre COVID-19 jako snadno
dostupný marker k predikci středně
těžkého a těžkého průběhu
COVID-19 v klinické praxi**

Vrbacký F. et al.45

**Poliekové abnormality
fibrinogénu**

Wild A., Ondrejčková A.47

Laboratorní diagnostika HIT

Zavřelová J. et al.48

**miRNA a hyperagregabilita
trombocytov pri syndróme
lepivých doštičiek**

Žolková J. et al.50

**Genetická variabilita u pacientov
s von Willebrandovou chorobou**

Žolková J. et al.51

POSTEROVÁ SEKCE
**Genetická variabilita génov
pre GPVI, MRVI1 a PEAR1
u pacientov s hyperagregabilitou
trombocytov a tepnovými
oklúziám**

Brunclíková M et al.54

Získaný inhibitor faktoru XI

Fenclová T. et al.56

Solubilný endotelový receptor pre proteín C a tromboembolizmus

Ivanková J. et al.57

Syndróm lepiivých trombocytov a tehotenské komplikácie v NCHT KHaT JLF UK a UN Martin v rokoch 2004–2022

Lisá L. et al.58

Vrodený deficit FXIII – laboratórna diagnostika

Mešová P. et al.59

Funkčný test stanovenia HIT prietokovou cytometriou

Naháľková I. et al.61

Srovnání indukované agregace trombocytů stanovené systémem Atellica COAG 360 a agregometrem Apact 4004

Pilnáčková M. et al.63

Analýza multimérov VWF systémem Hydrasys 2 scan

Škorňová I. et al.64

Vplyv výsledkov monitoringu zmien hemostázy na sekundárnu**antikoagulačnú tromboprofylaxiu v tehotnosti**

Stančiaková L. et al.66

Rotačná trombelastometria v sekundárnej tromboprofylaxii v tehotnosti

Stančiaková L. et al.68

Deficit antitrombínu III – kazuistika

Stančiaková L. et al.70

Prínos rotačnej trombelastometrie v perioperačnom manažmente pacientov s vrodenou koagulopatiou

Steranková M. et al.71

Distribučná šírka monocytov – včasný marker sepsy

Urdžíková I. et al.72

Porovnání počtu nezralých granulocytů stanovených pomocí hematologického analyzátoru Sysmex XN, dále pomocí digitální morfologie Sysmex DI-60 s mikroskopickým vyšetřením

Vytisková S. et al.73

**SBORNÍK
ABSTRAKT**

CIRKULUJÍCÍ EXTRACELULÁRNÍ VEZIKULY A TROMBOTICKÉ KOMPLIKACE BCR/ABL1 NEGATIVNÍCH MYELOPROLIFERATIVNÍCH NEOPLÁZIÍ V REÁLNÉM ŽIVOTĚ

Aswad M.H.^{1,2}, Kissová J.^{1,2}, Ovesná P.³, Penka M.^{1,2}

¹ Oddělení klinické hematologie FN Brno; ² Lékařská fakulta Masarykovy University Brno; ³ Institut Biostatistiky a analýz, Masarykovy University Brno

Úvod: Trombóza je častou komplikací BCR/ABL1 negativních myeloproliferativních neoplázií (MPN), která významně ovlivňuje mortalitu pacientů. Je příčinou úmrtí u téměř 30 % pacientů s pravou polycytémií (PV) nebo esenciální trombocytemií (ET), a přibližně u 14 % pacientů s primární myelofibrózou (PMF).

Cirkulující extracelulární vezikuly (EV) jsou bezjaderné vezikuly, odvozené z buněk během buněčné aktivace nebo apoptózy, které mají prokoagulační vlastnosti. Dle dostupných studií jsou hladiny EV u pacientů s MPN zvýšené při srovnání se zdravými jedinci, lze tedy předpokládat prognostický význam EV ve vztahu k trombóze u těchto pacientů.

Cíl: Tato práce hodnotí klinický význam EV ve vztahu k trombotickým komplikacím u pacientů s MPN.

Pacienti a metody: V souboru 206 pacientů s MPN byla měřena prokoagulační aktivita EV funkčním testem Zymuphen ve 429 vzorcích a počet trombocytárních EV byl měřen průtokovou cytometrií v 558 vzorcích. Jako kontrolní skupina byla použita skupina 20 zdravých jedinců.

Výsledky: Během průměrné doby sledování 5 let (2–9 let) bylo zaznamenáno celkem 121 trombotických příhod u 72 pacientů. Ve vztahu k MPN (tj. během/po diagnóze) se jednalo o 68 trombotických příhod u 45 pacientů s incidencí 5.45 % pacient-roků. Pacienti s MPN měli významně vyšší hladiny prokoagulační aktivity a trombocytárních EV než kontrolní skupina ($P < 0.001$, $P = 0.005$). Hladiny trombocytárních EV byly významně zvýšené v přítomnosti mutace *JAK2V617F* ve srovnání s pacienty bez této mutace ($P = 0.022$).

Pacienti s trombotickou komplikací před diagnózou MPN, měli vyšší patologické hodnoty prokoagulační aktivity EV než pacienti bez trombózy ($P = 0.017$). Hladiny trombocytárních EV byly významně nižší u pacientů s tepennými trombotickými příhodami během sledování ve srovnání s pacienty bez těchto příhod ($P = 0.021$). Hladiny prokoagulační aktivity EV byly významně nižší u pacientů s žilní trombózou během sledování ve srovnání s ostatními pacienty ($P = 0.015$).

Pacienti na cytoredukční léčbě měli významně nižší hladiny trombocytárních EV ($P = 0.018$). Monoterapie anagrelidem byla spojena s nižší hladinou prokoagulační aktivity EV stejně jako trombocytárních EV při srovnání s pacienty bez této léčby (oba $P = 0.011$).

Závěr: Zvýšená hladina EV v souboru pacientů s BCR/ABL1 negativními MPN odpovídá protrombotickému stavu těchto pacientů a svědčí pro významnou roli EV v patogenezi trombotických komplikací. Léčba MPN velmi pravděpodobně redukuje uvolnění EV a jejich prokoagulační aktivitu.

Podpořen MZ ČR – RVO (FNBr; 65269705)

Literatura:

1. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*. 2013 Sep 26;122(13):2176–84.
2. Smith CJ, Thomas JW, Ruan G, et al. A population-based study of outcomes in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis in the United States from 2001 to 2015: Comparison with data from a Mayo Clinic single institutional series. *Am J Hematol*. 2021 Dec 1;96(12):E464-E468.
3. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018 Nov 23;7(1):1535750.
4. Kissova J, Ovesna P, Bulikova A, et al. Increasing procoagulant activity of circulating microparticles in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: a single-centre experience. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015 Jun;26(4):448–53.
5. Aswad MH, Kissova J, Ovesna P, et al. The Clinical Significance of Circulating Microparticles Concerning Thrombosis in BCR/ABL1-negative Myeloproliferative Neoplasms. *In Vivo*. 2021 Nov-Dec;35(6):3345–3353.

EMICIZUMAB, LÉČBA HEMOFILIE A – VÝZVA PRO LABORATORNÍ DIAGNOSTIKU

Bradáčová P.¹, Ullrychová J.¹, Procházková D.²

¹Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, Oddělení klinické hematologie

²Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, Oddělení dětské hematologie

Úvod: U vrozené hemofilie A je snižená tvorba FVIII. Projevuje se zvýšeným sklonem ke krvácení s tíží dle aktivity FVIII. U těžké hemofilie (FVIII < 1 %) dochází ke spontánnímu krvácení do kloubů. Léčba spočívá v celoživotním nitrožilním podávání koncentráту FVIII. Nový lék emicizumab je humanizovaná bispecifická monoklonální protilátka, která propojuje FIXa a FX, čímž přemostí chybějící FVI-IIa. Při průlomovém krvácení nebo operačním výkonu emicizumab nedostačuje a je nutné podat derivát FVIII. Monitoring hladiny emicizumabem se provádí modifikovanou koagulační metodou, v případech podání derivátu FVIII se aktivita FVIII monitoruje chromogenním stanovením s boviní komponentou.

Cíl: Při monitoringu pacienta s emicizumabem je třeba myslet na to, že APTT je falešně zkrácené a FVIII falešně vysoký, oba testy neodpovídají skutečnému stavu hemostázy pacienta.

Metody: U těžkého hemofilika s emicizumabem byly provedeny metody na stanovení emicizumabu, APTT a chromogenní stanovení FVIII v porovnání se stanovením FVIII koagulační metodou.

Výsledky: Kazuistika – 11 letý chlapec, narozen jako dvojče B, těžký hemofilik a kvadruplegik s mentální retardací. V 11 měsících věku byla zjištěna těžká hemofilie A, FVIII 0,3 %. Od 4 let pravidelná profylaxe 2–3x týdně derivátem FVIII. V 5 letech nastalo první kloubní krvácení a krvácení do GIT. V 10 letech chlapec odmítá aplikaci FVIII do portu, proto od 2/2022 zahájena léčba emicizumabem.

Závěr: Pro pacienty (i jejich rodiny) s těžkou hemofilií A přináší léčba emicizumabem zvýšení kvality jejich života. Monitoring léčby není úplně snadný, je třeba správný výběr laboratorních testů a jejich interpretace.

NAŠE ZKUŠENOSTI S MONITOROVÁNÍM ADAMTS13 U PACIENTŮ SE ZÍSKANOU TROMBOTICKOU TROMBOCYTOPENICKOU PURPUROU

Buffa D.¹, Kořístek Z.^{1,4}, Demel I.¹, Kovářová P.², Pulcer M.^{3,4}, Gumulec J.^{1,4}

¹Klinika hematookologie FN Ostrava

²Krevní centrum FN Ostrava

³Oddělení klinické hematologie Ústavu laboratorní medicíny FN Ostrava

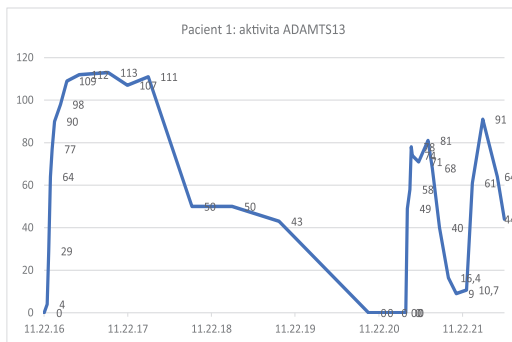
⁴Lékařská fakulta Ostravské univerzity

Úvod: Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) je vzácná život ohrožující trombotická mikroangiopatie (TMA). V patogenezi onemocnění se uplatňuje získaný nebo vrozený nedostatek metaloproteázy ADAMTS13. ADAMTS13 hraje klíčovou roli při štěpení velkých multimerů von Willebrandova faktoru (ULM vWF) uvolňovaných endotelovými buňkami do cirkulace. Při nedostatku ADAMTS13 nedochází ke štěpení vWF, v plazmě cirkulují obrovské multimery vWF, na které se v mikrocirkulaci navazují destičky. Tímto mechanismem dochází k uzavírání mikrocirkulace s rozvojem mikroangiopatické hemolytické anémie, konsumpční trombocytopenii a ischemii tkání. Po zavedení kaplacizumabu do léčby získané TTP (aTTP) se významně mění přístup k monitorování odpovědi na léčbu kombinací výměnné plazmaferézy s imunosupresivou a kaplacizumabem. Zásadní roli hraje monitorování dynamiky ADAMTS13.^{1,2}

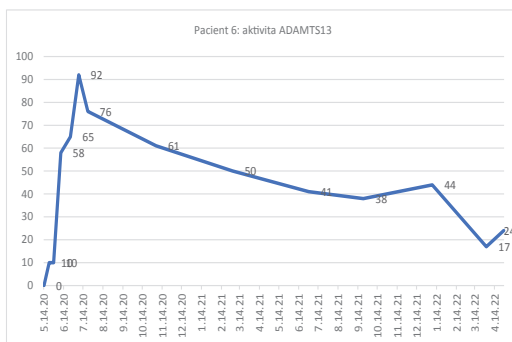
Cíl: Cílem sdělení je prezentace zkušeností s monitorováním ADAMTS13 u pacientů s aTTP.

Metodika: V období od roku 2016 do roku 2022 bylo na KHO FNO léčeno celkem 7 pacientů s nově diagnostikovanou aTTP (6 žen, 1 muž). Všichni pacienti byli během akutní ataky aTTP léčeni kombinací výměnné plazmaferézy s kortikosteroidy a/nebo rituximabem, jedna pacientka navíc kaplacizumabem. V případě ADAMTS13 relapsu byla podávána monoterapie kortikosteroidy. V rámci laboratorního monitorování jsme sledovali krevní obraz včetně počtu schistocytů, koagulační testy, laktátdehydrogenázu, bilirubin, haptoglobin, hemopexin, ADAMTS13 (aktivita, ve vybraných situacích antigen) a titr protilátek anti-ADAMTS13.

Výsledky: Po iniciační léčbě dosáhli všichni pacienti klinické remise. Kompletní ADAMTS13 odpovědi dosáhli v intervalu od 26 do 174 dnů od zahájení léčby (průměrně za 66 dnů). Dosažení parciální ADAMTS13 remise je hodnotitelné jen u dvou pacientů (21. a 22. den od zahájení léčby). U jedné pacientky došlo po 4 letech ke klinickému relapsu, kterému předcházela postupný pokles aktivity ADAMTS13. Po dalším roce stejná pacientka vyvinula bez jasného provokačního momentu ADAMTS13 relaps ustupující po léčbě kortikosteroidy (viz graf číslo 1).



Graf číslo 1



Graf číslo 2

Jiná pacientka vyvinula ADAMTS13 relaps bez jasného provokačního momentu po dvou letech od první ataky aTTP (viz graf číslo 2). V žádném z těchto dvou případů se neobjevily ani klinické ani laboratorní projevy TMA.

Závěr: Při sledování pacientů s aTTP se neobejdeme bez pravidelného monitorování aktivity ADAMTS13. Asymptomatický ADAMTS13 relaps, tzn. pokles aktivity pod 20 % může predikovat hrozící klinický relaps. Na zvažení je v těchto případech preemptivní imunosupresivní léčba.

Literatura:

1. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, Coppo P, Geldziler B, Iorio A et al. ISTH Guidelines for Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Journal of Thrombosis and Haemostasis; n/a(n/a). doi: 10.1111/jth.15010
2. Cuker A, Cataland SR, Coppo P, de la Rubia J, Friedman KD, George JN et al. Redefining outcomes in immune TTP: an international working group consensus report. Blood 2021; 137(14): 1855–1861. e-pub ahead of print 2021/02/03; doi: 10.1182/blood.2020009150

HITY LETOŠNÍHO JARA A PŘEDJAŘÍ

**Bulíková A.^{1,2}, Kamelander J.¹, Smejkal P.^{1,3}, Zavřelová J.^{1,3}, Říhová L.¹,
Kissová J.^{1,2}, Romanová G.¹, Penka M.^{1,2}**

¹Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno

²Interní hematologická a onkologická klinika, Lékařská fakulta
Masarykovy University v Brně

³Katedra laboratorních metod, Lékařská fakulta Masarykovy University
v Brně

Úvod: Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je vzácnou komplikací léčby heparinem, ať již v jeho nefrakcionované formě (UFH), tak vzácněji u nízko-molekulárních heparinů (LMWH). Vzhledem k tomu, že UFH se ve FN Brno používá velmi vzácně, setkávali jsme se s touto diagnózou málo často, přibližně jednou ročně. V průběhu pandemie Covid-19 se zdálo, že je popisovaných případů více, nicméně meta-analýza ukázala, že jde spíše o častější používání antitrombotické profylaxe hepariny nežli o skutečnou vyšší incidenci těchto případů (1). Taktéž problematika s adenovirovými vakcínami asociované trombocytopenie (VIT) zvýšila vzhledem k podobné patofyziologii a diagnostice zájem hemostazeologů o tento typ trombocytopenie často asociované s trombózou.

Metodika: Od února do května 2022 jsme diagnostikovali u šesti nemocných heparinem indukovanou trombocytopenii, resp. u dvou z nich byla při negativitě funkčních testů diagnóza stanovena jako vysoce suspektní vzhledem k rychlé restituci počtu trombocytů při změně léčby z LMWH na pentasacharid. Šlo o 5 mužů a 1 ženu ve věku 75 až 40 let. Všichni nemocní měli pozitivní screeningový test (Stick expert HIT, Stago), pozitivní protilátky proti PF4-heparinu ELISA (Zymutest HIA IgG, IgA, IgM, Hyphen BioMed), 4 pacienti měli pozitivní test agregace trombocytů (jeden z pacientů s pozitivitou jen v nízké koncentraci heparinu byl ověřen SRA provedenou na ÚHKT), funkční test průtokovou cytometrií (HITAlert kit, IQ Products) byl pozitivní u poloviny nemocných (jednou negativní u pacienta s pozitivní SRA). T4 skóre bylo u řady těchto nemocných problematické, což v některých případech zapříčinilo odložený termín finální diagnózy.

Výsledky: U pěti z popisovaných případů vedlo převedení léčby z LMWH na pentasacharid k promptnímu nárůstu počtu trombocytů do 48 hodin. U jednoho z nemocných, který měl všechna laboratorní stanovení jasně pozitivní, byla situace zřetelně komplikovanější, a přes léčbu IVIG, převedení na argatroban a další komplikace, se normálního počtu trombocytů podařilo docílit až několik týdnů po diagnóze. U většiny těchto pacientů se jiná etiologie trombocytopenie nežli HIT zdála pravděpodobnější, neboť tyto nemocní byli často hospitalizováni z jiných příčin než trombocytopenie či nová trombotická komplikace spojená s trombocytopenií. Jasná

asociace s adenovirovou vakcinací proti Covid-19 nebyla u žádného z našich nemocných prokázána.

Závěr: T4 skóre je dlouho uznávaným parametrem k určení nemocných se suspektní diagnózou HIT. Nicméně dle našich nových zkušeností se zdá, že u jedinců s jinak nevysvětlitelnou trombocytopenií by měla být tato diagnóza zvažována, byť není diagnostické skóre jednoznačně naplněno. Roli může hrát nejen možná vakcinace proti Covid-19 u adenovirových typů vakcíny, ale i tzv. autoimunitní heparin-indukovaná trombocytopenie (2), která může provázet jiné autoimunitní či imunodeficientní stavy. Průkaz HIT nevedl v některých případech k ovlivnění osudu nemocného (dva nemocní zemřeli z důvodů základního onemocnění), ale změna počtu trombocytů po záměně preparátu vedla k umožnění náležité léčby pentasacharidem.

Literatura:

1. Uaprasert N, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv* 2021; 5: 4521–34
2. Greinnacher A, et al. Autoimmune heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2017; 15 (11): 2099. Epub 2017 Sep 28

Podpořeno MZ-ČR RVO (FNBr; 65269705).

MYELOPROLIFERATIVNÍ CHOROBY Z POHLEDU KLINICKÉHO, CYTOLOGICKÉHO A HISTOLOGICKÉHO

Bělohávková P.¹, Fátorová I.¹, Kamarádová K.²

¹ IV. interní hematologická klinika, FN Hradec Králové

² Fingerlandův ústav patologie, FN Hradec Králové

Myeloproliferativní choroby (MPN) tvoří velkou skupinu chorob, které vznikají na úrovni kmenové hematopoetické buňky bez jasné vyvolávající příčiny. Ve dření je zachováno vyžívání elementů a dochází k nadměrné produkci krevních elementů (jedné či více řad). Dalším společným rysem u chorob bez přítomnosti Philadelphského chromozomu je přítomnost molekulárních znaků JAK2V617 nebo CALRET mutace. Může docházet dominantně k nadměrné proliferaci červených krvinek (polycytemia vera, PV) nebo destiček (esenciální trombocytémie, ET). U některých pacientů se ve dření zvýšeně tvoří vazivo a vyplavují se rovněž nezralé bílé elementy (primární myelofibróza, PMF). Podezření na tato onemocnění bývají na základě anamnézy, klinického stavu (často zvětšená slezina) a na základě abnormalit v krevním obraze. K určení přesné diagnózy je nutné provedení trepanobiopsie se získáním histologie a určením přesného podtypu choroby. Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření přináší další informace o biologické povaze MPN.

Chronická myeloidní leukémie (CML) patří do této skupiny chorob, avšak významně se liší svojí etiopatogenezí vzniku. Ve většině případů pacienti s CML mají typický krevní obraz s leukocytózou a posunem doleva v diferenciálním rozpočtu. Pro potvrzení diagnózy CML je nutné provedení cytogenetického vyšetření dřeně s průkazem Philadelphského chromozomu (translokace 9. a 22. chromozomu). Dále je u nemocných přítomen molekulární marker BCR/ABL.

Do této skupiny chorob patří i velmi vzácná jednotka myeloidní eozinofilní neoplazie s pozitivitou fúzního genu FIP1L1-PDGFR alfa. Pro onemocnění je typická velmi významná eozinofilie a je nutno vyloučit všechny sekundární příčiny eozinofilie či jiný typ hematologického onemocnění. V našem sdělení představíme formou kazuistik všechny výše uvedené podtypy MPN s klinickými, cytologickými a histologickými nálezy pacientů.

Podpořeno programem MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).

PRŮKAZ HEPARINEM INDUKOVANÉ TROMBOCYTOPENIE/KAZUISTIKA PACIENT S COVID-19

Husáková M., Malíková I., Řádek M., Kvasnička J.

ÚBLBD Centrální hematologická laboratoř a Trombotické centrum VFN, Praha

Úvod: Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) může být závažnou komplikací u Covid-19 pozitivních pacientů léčených nefrakcionovaným heparinem (UFH) či nízkomolekulárními hepariny (LMWH). HIT je zprostředkovaná autoimunním mechanismem, kdy se na povrchu destičky tvoří komplexy heparin/PF4, které u některých jedinců indukují tvorbu specifických protilátek (HIT-Ig). Pacienti s HIT jsou následně ohroženi vznikem trombocytopenie, žilní a/nebo tepenné trombózy, popř. poruchou mikrocirkulace. Všechny tyto aspekty mohou vést ke stavům ohrožujícím život pacienta.

Cíl práce: seznámení s laboratorní problematikou vyšetření HIT a porovnání laboratorních vyšetření, kazuistika pacienta s COVID-19, který byl převeden na léčbu Arixtrou

Metodika HIT:

1. detekce na přítomnost protilátek HIT navázaných na komplex PF4/heparin – test PaGIA (particle gel immunoassay), DiaMed
2. detekce na přítomnost protilátek HIT – HIT-Ab (PF4-H), Instrumentation Laboratory
3. detekce na heparinu závislé aktivace krevních destiček pacientovým sérem (obsahujícím HIT protilátky) – funkční test HITALert, IQProducts.

Kazuistika: muž, 54 let, 1 měsíc hospitalizace při onemocnění COVID-19, tři týdny napojen na ECMO, podávání nefrakcionovaného heparinu (UFH), podezření na rozvoj HIT – pokles destiček o více než 50 % vstupní hodnoty, čas poklesu 10. den, čerstvá trombóza potvrzená CT, ostatní možná příčina trombocytopenie vyloučená – 4T score > 6, 11. den rozvinutí HIT, průkaz pomocí ID-Anti Heparin PF4 a HIT-Ab (PF4-H), potvrzení pozitivivity průtokovou cytometrií HITALert. Změna léčby z UFH na Fondaparinux (Arixtra – hodnoty aXa 0,55–0,77 IU/ml), nárůst počtu destiček, zlepšení stavu.

Závěr: Diagnostika HIT se stále opírá především o klinické údaje a při podezření na HIT je nutné okamžitě ukončit terapii hepariny. Diagnózu HIT je nutné potvrdit anebo vyloučit laboratorním testováním při použití obou typů testů, jak imunologického, tak funkčního.

Studie byla podpořena RVO-VFN64165/2021

HYPERHOMOCYSTEINÉMIE JAKO MOŽNÁ PŘÍČINA TROMBÓZY

Ješina P., Kožich V.

*Metabolické centrum Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu
Všeobecná fakultní nemocnice v Praze*

Homocystein je meziproduktem při intracelulárních přeměnách sirných aminokyselin a je považován za univerzální marker metabolismu sirných látek. Vzniká v methioninovém cyklu přeměnou methioninu a v dalším kroku je buď metabolizován v irreverzibilní transsulfurační dráze na cystein a taurin, nebo je zpětně recyklován na methionin v remethylační dráze. V České republice se každoročně provede 65 000–74 000 vyšetření celkového homocysteinu a přibližně 1 % výsledků má výrazně abnormální hodnoty. Tyto abnormality mohou být způsobené nerozpoznanými deficity vitaminů skupiny B, závažnými genetickými nemocemi a dalšími příčinami.

Homocystinurie jsou závažná lidská onemocnění charakterizovaná výrazně zvýšenou koncentrací homocysteinu v plasmě (celkový homocystein je typicky vyšší než 50–100 $\mu\text{mol/L}$) a řadou dalších specifických biochemických odchylek. Nejběžnější typ homocystinurie je způsobený deficitem cystathionin beta-syntázy a jeho klinické projevy zahrnují u adultních forem zejména trombózu, u těžších dětských forem těž mentální retardaci a různé typy postižení pojivové tkáně (luxace čoček, marfanoidní habitus a osteoporózu). Druhý typ homocystinurií (cca 20 různých nemocí) je způsoben neschopností buněk remethylovat homocystein zpět na methionin a projevuje se rovněž vznikem trombóz a dále příznaky podobnými těžkému deficitu vitaminu B₁₂ s postižením CNS a hematopoézy. Nejběžnější je deficit methylenetetrahydrofolátreduktázy. Pacienti s těmito poruchami však vyžadují zcela odlišný a individualizovaný způsob léčby, než se používá u deficitu vitaminu B₁₂ a závisí na typu genetické příčiny.

Naše pracoviště se opakovaně setkalo s pacienty trpícími některou z homocystinurií, kteří byli dlouhodobě sledováni na jiných pracovištích a u nichž byla správná diagnóza stanovena s několikaletým zpožděním a jimž nebyla podávána cílená léčba.

V případech nálezů hyperhomocysteinémie je vždy nutné vyšetření hladin vitaminů (B₁₂ a folátů), abychom oddělili nutriční deficit od geneticky podmíněného onemocnění. Nasazením vitaminů zejména ve vysokých dávkách bez stanovení správné etiologie může vést k chybné diagnóze, a tím poškození pacienta při nesprávné léčbě specifickými léčivými.

POROVNÁNÍ ÚČINNOSTI ENTEROSOLVENTNÍ VERSUS NON-ENTEROSOLVENTNÍ FORMY KYSELINY ACETYLSALICYLOVÉ NA INHIBICI FUNKCE KREVNÍCH DESTIČEK

Kessler P., Prokopová J., Satrapová P., Vágnerová J., Harudová M., Poul H.
Oddělení hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov

Východisko: Acetylsalicylová kyselina (ASA) je používána jako protideštičkový lék s cílem snížit výskyt arteriálních trombotických příhod. U pacientů s nedostatečnou inhibicí agregace trombocytů je vyšší riziko tepenných příhod než u pacientů s dostatečnou inhibicí agregace trombocytů. Výsledky některých studií naznačují, že v důsledku odlišné farmakokinetiky může být u některých pacientů účinek enterosolventní formy ASA snížený oproti non-enterosolventní formě. Zlatým standardem v testování odpovědi na ASA je optická agregometrie s použitím arachidonové kyseliny jako induktoru, dále je používáno POCT vyšetření na analyzátoru PFA-100/PFA200, možnou alternativou je vyšetření exprese aktivačních antigenů na trombocytech cytoflowmetricky.

Cíle studie: Porovnat protideštičkový efekt ASA v enterosolventní formě (Stacyl) s protideštičkovým efektem ASA v non-enterosolventní formě (Godasal) při použití 3 metod – optická agregometrie s použitím arachidonové kyseliny, vyšetření na PFA-200 s použitím cartridge COL/EPI a vyšetřením exprese P-selektinu na trombocytech měřené cytoflowmetricky v plné krvi.

Soubor pacientů: 30 pacientů léčených nejméně týden 100 mg Stacylu a 30 pacientů léčených nejméně týden 100 mg Godasalu.

Metodika: Pacientům byla odebrána žilní krev dopoledne, nalačno. Interval mezi požitím poslední dávky ASA a odběrem krve byl 20–28 hodin. Žilní krev byla odebrána do 2 zkumavek s citrátem a do 1 zkumavky s EDTA. Z odebrané krve byla vyšetřena optická agregometrie s použitím arachidonové kyseliny (AA) (končná koncentrace 0,5 mg/ml), PFA-200 s použitím cartridge COL/epi a cytoflowmetrie se stanovením exprese P-selektinu na trombocytech a krevní obraz

Statistická analýza: K statistickému vyhodnocení rozdílů průměru kvantitativních proměnných byl použit následující algoritmus: Shapiro-Wilkův test byl použit ke zjištění normality rozložení, v případě, že se nepodařilo prokázat nenormálnost rozložení ani v jedné skupině, byl použit Brown-Forsytheův test k vyhodnocení rozdílů rozptylů mezi skupinami. V případě, že se nepodařilo prokázat rozdíl rozptylů mezi skupinami, byl k vyhodnocení rozdílů průměrů použit klasický T-test. V případě průkazu nenormálního rozložení aspoň jednoho souboru proměnných byl k vyhodnocení rozdílů průměrů použit Mann-Whitneyův test. K vyhodnocení rozdílů kvalitativních proměnných a kvantitativních proměnných s použitím cut-off byl použit Chi kvadrát test.

Výsledky: Mezi oběma skupinami nebyly zjištěny rozdíly v maximální amplitudě při vyšetření agregace s kyselinou arachidonovou ani v expresi P-selektinu – viz tabulka č. 1.

K vyhodnocení rezistence ke kyselině acetylsalicylové v testu PFA COL/EPI byly použity 3 cut-off hodnoty; při použití žádné z nich nebyly zjištěny statistické rozdíly mezi soubory – viz tabulka č. 2.

Tab. č. 1: Maximální amplituda při vyšetření agregace s kyselinou arachidonovou a exprese P-selektinu.

	Godasal	Stacyl	P
Maximální amplituda	12,77±4,44	13,30±4,74	0,6546
Expres P-selektinu	9,12±4,89	10,72±9,89	0,9941

Tab. č. 2: Zastoupení pacientů rezistentních na acetylsalicylovou v testu PFA COL/EPI.

Cut-off	Godasal	Stacyl	P
< 158 s	15 (50,0 %)	10 (33,3 %)	0,1904
< 186 s	17 (56,7 %)	16 (53,3 %)	0,7953
< 200 s	17 (56,7 %)	17 (56,7 %)	1,000

PRŮKAZ FETÁLNÍCH ERYTHROCYTŮ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Kmentová K., Bušíková L., Vondráčková B., Řádek M.

ÚBLD Centrální hematologické laboratoře, VFN

V průběhu těhotenství, může vlivem poruchy fetomaternální placentární bariery, dojít k chronickému nebo akutnímu průniku fetálních erytrocytů do krevního oběhu matky (fetomaternální transfuze).

U chronického průniku fetálních erytrocytů dochází k postupné anemizaci plodu, hypoxemii a růstové retardaci.

U akutního průniku fetálních erytrocytů mohou nastat hemodynamické změny, které mohou vést až k intrauterinnímu odumření plodu (fetus mortus).

Na základě stanovení exprese fetálního hemoglobinu (HbF) na erythrocytech pomocí monoklonální protilátky můžeme metodou průtokové cytometrie prokázat přítomnost fetálních erytrocytů v krevním oběhu matky a diagnostikovat tak fetomaternální transfuzi.

KAPLACIZUMAB V LÉČBĚ TROMBOTICKÉ TROMBOCYTOPENICKÉ PURPURY – ANALÝZA DAT Z DATABÁZE VILP

*Lánská M.¹, Pohlreichová V.², Salaj P.², Semerád L.³, Gumulec J.⁴,
Májková P.⁵, Žák P.¹*

¹IV. interní hematologická klinika FN a LF, Hradec Králové

²Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

*³Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno
a LF Masarykovy univerzity, Brno*

⁴Klinika Hematoonkologie FN Ostrava a Lékařské fakulty Ostravské univerzity

⁵Institut biostatistiky a analýz, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Úvod: V léčbě trombotické trombocytopenické purpury (TTP) došlo k významné změně. Do první linie terapie se spolu s výměnnou plazmaferézou (TPE) a kortikosteroidy dostává kaplacizumab. Jedná se o humanizovanou bivalentní nanočástici zacílenou na A1 doménu von Willebrandova faktoru (vWF), která inhibuje adhezi trombocytů na vWF a působí preventivně proti tvorbě mikrotrombů. Předmětem tohoto sdělení jsou první zkušenosti s podáním kaplacizumabu v České republice (ČR), vychází z analýzy dat z databáze pro vysoce inovativní léčebné přípravky (VILP).

Soubor nemocných: Byla provedena retrospektivní analýza dat z databáze VILP u nemocných (n.) léčených kaplacizumabem v ČR v období od 1.1.2021 do 12.5.2022. Cíle hodnocení byly stanoveny v souladu s parametry v již publikované registrační studii HERCULES (NCT02553317). Byla hodnocena doba od prvního podání kaplacizumabu do normalizace počtu trombocytů a výskyt závažných událostí (úmrtí v souvislosti s diagnózou TTP, exacerbace nebo relaps, závažná trombembolická příhoda). Analýzu dat provedl Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v Brně.

Výsledky: Analyzovaný soubor zahrnuje 9 nemocných léčených kaplacizumabem v kombinaci s TPE a kortikosteroidy. Jednalo se o 7 žen a 2 muže s mediánem věku 43 let (rozmezí 21–78 let). Dávkování kaplacizumabu bylo u všech nemocných 10 mg denně. Medián délky sledování byl 9,7 měsíců (rozmezí 1,0–13,5). Medián doby od prvního podání kaplacizumabu do normalizace počtu trombocytů (nad $150 \times 10^9/l$) byl 3 dny. U všech nemocných došlo k normalizaci počtu trombocytů v průběhu prvního týdne. Ze sledovaného souboru zemřel 1 n., úmrtí nastalo z důvodu septické komplikace 1 rok po ukončení léčby kaplacizumabem. Do 30 dnů od poslední TPE nedošlo k rozvoji exacerbace nebo relapsu onemocnění, nebyla zaznamenána ani žádná závažná trombembolická příhoda.

Závěr: Byla analyzována první data o použití kaplacizumabu v léčbě akutní ataky získané TTP v ČR. Výsledky jsou v souladu s publikovanými daty, prokazují krátký medián do normalizace počtu trombocytů. Nebyla zaznamenána žádná závažná událost nebo nežádoucí příhoda.

METODIKY VYUŽÍVANÉ V SOUVISLOSTI S COVID-19 (TROMBELASTOMETRIE, FAKTOR XIII, AKTIVITA ANTI-XA UFH) A VÝZNAM STANOVENÍ FAKTORU XIII U KRITICKY NEMOCNÝCH PACIENTŮ NAPOJENÝCH NA ECMO

Malíková I.¹, Husáková M.¹, Flaksa M.², Kvasnička J.¹, Kvasnička T.¹

¹ÚBLD Centrální hematologická laboratoř a Trombotické centrum VFN, Praha

²Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny VFN, Praha

Úvod: Onemocnění COVID-19 významným způsobem ovlivnilo počty hospitalizovaných pacientů, u kterých bylo indikováno připojení na mimotělní membránovou oxygenaci (ECMO). ECMO jako pokročilá metoda podpory životních funkcí nahrazuje dle způsobu zapojení funkci srdce a plic. Použití modifikovaného mimotělního oběhu poskytuje pacientovi čas na vyléčení nemocného orgánu nebo k přechodu na další dlouhodobější podporu.

Všichni pacienti připojení na ECMO byli soustavně monitorováni, a kromě běžných vyšetření se u kritických pacientů sledovala i trombelastografie, hladina faktoru VIII a fibrinogenu, aktivita faktoru XIII (FXIII) a také se monitorovala účinnost podávaných heparinů.

Faktor XIII je molekula, která hraje významnou úlohu nejen v procesech krevního srážení, ale podílí se významným způsobem na procesech imunity, zánětu, hojení ran a tkáňové reparace. Deficity FXIII jsou velmi vzácnou vrozenou chorobou, ale v poslední době nabývají na významu získané nedostatky FXIII způsobené například masivním krvácením, diseminovanou intravaskulární koagulací, jaterní cirhózou a řadou dalších stavů. U pacientů na ECMO má být kritický pokles FXIII pod 50 %, kdy je při krvácení možnost substituce.

Cíl práce: Na příkladech pacientů s onemocněním COVID-19 chceme ukázat, jak se stav pacienta projevil na změnách v hemokoagulaci, které jsme sledovali na trombelastogramech, pomocí hladin fibrinogenu, faktoru VIII a aktivity FXIII.

1. kazuistika: muž, 55 let, 1 měsíc hospitalizace při onemocnění COVID -19, 3 týdny napojen na ECMO, týden v kritickém stavu, BMI 34,6, komplikace léčby vznikem trombózy a PE a vyvinutím HIT, nebyly kritické hodnoty FXIII při napojení na ECMO, hladiny FVIII a Fbg nedosahovaly extrémně vysokých hodnot, pokles destiček se rychle normalizoval po změně léčby, po měsíci hospitalizace propuštění do domácí péče, převedení na Warfarin.

2. kazuistika: muž, 54 let, hospitalizace při onemocnění COVID -19, po celou dobu napojen na ECMO, v kritickém stavu, BMI 41,4, leukocytóza, anemizace, nárůst zánětlivých markerů – CRP, PCT, zhoršení funkce ledvin, elevace jaterních testů, vysoké hladiny FVIII a Fbg, nízké hladiny FXIII pod 20 %, 17. den úmrtí.

Závěr: Uvedené kazuistiky ukazují nejen závažnost onemocnění COVID-19, ale také na význam monitorování pacientů připojených na ECMO, kdy hodnota FXIII může být významným prognostickým markerem.

Studie byla podpořena RVO-VFN64165/2021

MYSLÍME NA DYSFIBRINOGENÉMIE?

Matýšková M., Zavřelová J.

Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Brno

Patologie fibrinogenu, ať se jedná o snížení hladiny (hypofibrinogenémie) a/nebo je porucha v molekule fibrinogenu (dyfibrinogenémie), se vyskytují vrozené a získané.

V laboratorním nálezu nás na poruchu fibrinogenu většinou upozorní pouze aktivita fibrinogenu, může být prodloužený trombinový test a reptilázový test. Běžně vyšetřovaný protrombinový test (PT) nemusí být patologický, stejně jako APTT. U některých pacientů výsledky kolísají. Doplněním antigenu potom vidíme snížený poměr fibrinogen Akt/Ag $<0,7$. Pokud máme podezření na vrozený defekt, je vhodné molekulárně genetické vyšetření.

Vrozené poruchy jsou vzácné, často autozomálně dominantní, mohou být ale i recesivně dědičné. Mutace se nalézají ve všech třech genech, tj. *FGA*, *FGB* i *FGG*. V současnosti je identifikováno více než 100 mutací (většina bodových) ve více než 400 rodinách. Nejběžnější mutace (udáváno asi u 63 %) je v genu *FGA*, kdy je argininový zbytek (AaArg16) nahrazen histidinem nebo cysteinem, druhá nejčastější je v genu *FGG*, i v tomto případě je argininový zbytek (gArg275) nahrazen histidinem nebo cysteinem. Problematická je diagnóza fibrinogenu Longmont (Bb166Arg-> Cys), kde jsou diskrepantní nálezy dle typu reagentie a principu měření (mechanicky oproti spektrofotometricky) a defekt nemusí být poznán.

Získané poruchy se obvykle vyskytují u onemocnění jater a žlučových cest, autoimunitních chorob, reakcí akutní fáze, po léčích. U dysfibrinogenémie související s rakovinou (karcinom hepatocelulární, děložního čípku, prsu, ledvinových buněk) mohou nádorové buňky vylučovat abnormální fibrinogen. Po vyléčení nebo stabilizaci choroby může patologie vymizet.

Klinické projevy u dysfibrinogenémie závisí především na tom, v které části molekuly je porucha. Asi u 40–55 % pacientů jsou klinicky němé, mohou ale být doprovázeny krvácivými, a/nebo trombotickými projevy, a to jak arteriálními, tak i žilními, u žen se u vrozených poruch popisují četnější samovolné potraty.

Dysfibrinogenémie je zřejmě velmi poddiagnostikovaným stavem i proto, že trombotické příhody se nedávají do souvislosti s poruchou fibrinogenu. Často může dojít k přehlédnutí těchto defektů, zčásti i proto, že řada kliniků vyšetření hladiny fibrinogenu nevyžaduje a nevyšetřuje. Při snížené aktivitě fibrinogenu nebývají doplněny trombinový, příp. reptilázový test, nedoplňuje se vyšetření antigenu. Zapomínáme na získané defekty. Fibrinogen je navíc reaktant akutní fáze, proto by vyšetření k vyloučení vrozené dysfibrinogenémie mělo být prováděno v časovém odstupu od akutní příhody. Pro pacienty tento nálezy může mít významný dopad, proto je nezbytné na tuto možnost myslet a vyšetření dělat kompletně.

IVD-R LEGISLATIVA V HEMATOLOGICKÉ LABORATOŘI

Mikešová M.

Centrální laboratoře FNKV

5. dubna 2017 Evropský parlament a Rada (EU) v rámci nového nařízení (EU) 2017/746 upravil pravidla pro používání zdravotnických prostředků a jejich uvádění na trh. V tomto dokumentu jsou odděleně řešeny zdravotnické prostředky pro tzv. In-vitro diagnostiku („IVDR“) od prostředků, které se používají přímo v klinické praxi na pacientech („MDR“).

Tato legislativa mění a výrazně zpřísňuje současné podmínky pro vývoj a uvádění CE-IVD testů na trh, rozděluje vše, co souvisí s laboratorní i POCT diagnostikou 4 kategorií (A-D) dle míry rizika. Většina původních IVD CE diagnostik bude potřebovat posouzení tzv. notifikačním orgánem.

Velká změnou oproti původní legislativě je regulace používání testů vyvinutých v laboratoři (tzv. laboratory development testů – LDT). Mezi tzv. LDT testy se počítají i testovací soupravy bez označení CE např. určené pro výzkumné účely, ale i jakékoli vlastní modifikace IVDR testů (např. změna přístroje, kalibrátoru, úprava postupu...). Dodržování požadavků nové směrnice bude namátkově, či na oznámení kontrolováno SÚKL a používání těchto LDT testů je omezeno pouze na laboratoře, které jsou akreditovány dle normy EN ISO 15 189 (viz články 5.5 b, c).

Pro plnou implementaci IVDR bylo zavedeno přechodné období, které bylo původně plánováno do května 2022. V loňském roce (16. 12. 2021) na základě intervence výrobců, ale i evropských odborných společností komise schválila odložení implementace evropského nařízení pro diagnostiku in vitro (IVDR). Důvodem byla celosvětová pandemie COVID-19, ale i nepřipravenost procedurálních prvků důležitých pro implementaci, zejména centrálního registru zdravotnických prostředků a diagnostik EUDAMED a nedostatečný počet a kapacita akreditovaných notifikovaných osob. Tento odklad se týká pouze některých bodů směrnice zejména tzv. LDT testů. Pro klinické laboratoře je důležitá zejména kapitola 5.5. a Annex 1, laboratoře by měly sledovat stanovené termíny.

26. 5. 2022

- zdravotnická zařízení (laboratoře) zveřejní seznam LDT testů

26. 5. 2024 – Laboratoře používající LDT testy musí být schopny kontrolnímu orgánu (SÚKL) předložit:

- prohlášení „výrobce“ testu (kap II, článek 5.5 f). *Dokument musí obsahovat prohlášení o tom, že test splňuje obecné požadavky na bezpečnost a funkční způsobilost stanovené v příloze I nařízení IVD R (EU) 2017/746. Případně informaci o tom, které požadavky nejsou v plném rozsahu splněny, spolu s příslušným odůvodněním.*

- akreditaci dle normy EN ISO 15 189 (kap II, článek 5.5 b, c)
- poskytnout kontrolnímu orgánu podrobné informace o testu (kap II, článek 5.5 e)
- doložit dokumentaci o validaci odpovídající třídě D (kap II, článek 5.5 g, h)
- přezkoumání používání laboratorních testů v klinické praxi (surveillance kvality a funkčnost testu) (kap II, článek 5.5 i)

26. 5. 2028

- povinnost prokázat absenci odpovídajícího CE-IVDR produktu na trhu (kap II, článek 5.5 d) (dle databáze EUDAMED)

Mnoho odborníků a lékařských společností na evropské úrovni se začalo touto problematikou zabírat, nejvíce dokumentů má zpracované německé Sdružení lékařských společností „AWMF“ a na jejich webových stránkách je možno najít mnoho informací. České odborné společnosti rovněž nezahálají a v souvislosti s touto problematikou již proběhlo několik setkání, na které byli přizváni i zástupci CZEDMA, ale i MZ ČR a SÚKL, ČIA, NASKL, a další

LS ČHS ČLS JEP prověřuje situaci pro všechny aktuálně používané testy v hematologických laboratořích. Pro tzv. LDT testy je v plánu je připravit doporučení pro jednotné a obhajitelné pracovní postupy, zpracovat data napříč laboratořemi a tím získat a sdílet informace nutné pro obhájení používání těchto testů v klinické praxi. Cílem LS ČHS JEP je také připravit formuláře usnadňující zpracování dokumentace pro SÚKL.

V souvislosti s novou IVD-R směrnicí se také výrazně zkomplikuje a prodraží práce národních referenčních laboratoří a laboratořím věnujícím se diagnostice vzácných onemocnění. Těmto laboratořím může přípravy usnadnit zapojení se do Evropských společností věnujících se touto problematikou.

Ve všech zemích EU bude nová legislativa znamenat výrazný zásah do ekonomiky laboratoře a bude vyžadovat přehodnocení úhrady plátců zdravotních služeb.

CYTOLOGIE – DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA PANCYTOPENÍ

Mikulenková D.

Morfologicko-cytochemická laboratoř, ÚHKT, Praha

Pancytopenie v hodnotách krevního obrazu (KO) odpovídá snížené hodnotě leukocytů pod $4 \times 10^9/L$, hemoglobinu pod referenční mez pro daný věk a pohlaví, a trombocytů pod $100 \times 10^9/L$. Diferenciální diagnostika stavů spojených s pancytopenií je obsáhlá, příčiny mohou být velmi různorodé. Jednou z příčin je redukce zdravé hematopoézy z důvodu infiltrace kostní dřeně hematologickým onemocněním (akutní a chronické leukemie, lymfoproliferativní onemocnění), ale i nehematologickým tumorem (karcinomatóza dřeně); dále může být hematopoéza poškozena (myelodysplastický syndrom, megaloblastová anémie) a produkce zdravých hematopoetických buněk je pak neefektivní. Hematopoéza včetně potřebného hematopoetického mikroprostředí je redukována nebo téměř chybí u útlumu kostní dřeně, aplastické anémie, či jako reakce na farmakoterapii. Dalším, spíše méně častým faktorem pancytopenie, bývá hromadění zralých buněk ve slezině, či buňky mohou být destruovány v periferním řečišti.

Diagnostika pancytopenie spočívá ve změření hodnot KO včetně retikulocytů, jejichž normální hodnota nás informuje o přiměřené funkci erytropoézy; a dále i ve změření některých dalších nadstavbových parametrů, např. IPF (faktor nezralých destiček), což je faktor, který nás může informovat o aktivitě megakaryopoézy. Součástí povinného vyšetřovacího procesu je cytologické zhodnocení nátěru aspirátu kostní dřeně; vyšetření je vhodné doplnit o cytochemii (myeloperoxidáza, vyšetření železa). V řadě případů je nezbytné vzorek kostní dřeně vyšetřit dalšími speciálními metodami (průtoková cytometrie, genetika). V případech tzv. suchého aspirátu při intenzivní fibrotizaci kostní dřeně cytologické metody selhávají a je nutné vyšetřit kostní dřeň histologicky; vzorek se získává trepanobiopsií lopaty kosti kyčelní. Těžká pancytopenie je život ohrožující stav, který vyžaduje urgentní a přesnou diagnózu umožňující kromě symptomatické terapie nasazení cílené terapie. V prezentaci budou uvedeny různé případy pancytopenie a způsob jejich diagnostiky s využitím týmové spolupráce řady specialistů.

DIAGNOSTIKA A MANAŽMENT VRODENÉHO DEFICITU FAKTORA XIII

Plameňová I.¹, Žolková J.¹, Sokol J.¹, Bereczsky Z.², Katona E.², Sokol J.¹

¹Klinika hematológie a transfuziológie, Jesseniova lekárska fakulta

Univerzity Komenského, Martin, Slovenská republika

*²Oddelenie laboratórnej medicíny, Lekárska fakulta Debrecínskej univerzity,
Debrecín, Maďarská republika*

Úvod: Vrodený deficit faktora XIII (FXIII) je zriedkavé ochorenie s variabilným sklonom ku krvácaniu. Typické krvácanie z pupočníka sa objavuje u 80–90 % novorodencov s ťažkým deficitom FXIII. Výskyt intrakraniálneho krvácania je častejší ako u iných vrodených krvácajúcich ochorení. Ďalšími klinickými príznakmi sú oneskorené hojenie rán, recidivujúce spontánne potraty a krvácanie v gravidite a pri pôrode.

Prípad: Opisujeme prípad 3 súrodencov s vrodeným deficitom FXIII ťažkého stupňa. Dve staršie deti mali krvácanie z pupočníka vo veku 7 dní a pri traumách vyžadovali podanie transfúzie erytrocytov a čerstvo zmrazenej plazmy, najmladší zo súrodencov nekrvácal vzhľadom k preventívnemu podaniu koncentráту FXIII. Genetickým sekvenovaním boli identifikované 2 mutácie v géne F13, každý z rodičov je heterozygot pre 1 mutáciu v géne *F13A1* pre podjednotku FXIII-A. Vzhľadom k autozomálne recesívnemu typu dedičnosti sú rodičia asymptomatickí, a obe deti sú zmiešaní heterozygoti. Predpokladáme, že prítomnosť oboch mutácií v heterozygotnej forme má kumulatívny efekt na výskyt krvácajúcich prejavov u detí. Vzhľadom k ťažkému deficitu FXIII-A bola u pacientov indikovaná profylaktická substitučná liečba rFXIII-A.

Záver: Diagnóza deficitu FXIII je založená na vyšetrení aktivity FXIII a imunologickom stanovení antigénov podjednotiek FXIII-A a FXIII-B, pretože výsledky základného hemostazeologického vyšetrenia bývajú v norme. Jednoduchým skríningovým testom pre deficit FXIII je test rozpustnosti krvného koagula, genetickým vyšetrením je možné identifikovať prítomnosť kauzálnych mutácií génu F13.

POTRANSFUZNÍ REAKCE V KLINICKÉ PRAXI

Procházková R.

Transfuzní oddělení; Krajská nemocnice Liberec, a. s.

Fakulta zdravotnických studií, Technická univerzita v Liberci

Potransfuzní reakce jsou různorodou skupinou nežádoucích reakcí na podání transfuzního přípravku, které se mohou vyskytnout v průběhu transfuze nebo po ní. V praxi mohou představovat nepříjemnou komplikaci transfuze, výskyt některých reakcí může komplikovat následnou hemoterapii pacienta, závažné reakce mohou pacienta přímo ohrozit na zdraví či životě.

Mezi závažné reakce patří přenos infekcí, akutní hemolytické reakce, bakteriální/septické reakce, anafylaxe, TRALI a TA-GvHD. Obvykle jsou přítomny orgánové poruchy a stav pacienta vyžaduje monitorování životních funkcí.

Velká část PR je zprostředkována imunitně: rozpad či aglutinace krevních buněk jsou vyvolány podanými protilátkami (hemolytická reakce, TRALI), při přítomnosti protilátek proti krevním buňkám (febrilní reakce, hemolytická reakce, TRALI, refrakternost na podání trombocytů, potransfuzní purpura), alergií na některou složku podávaného přípravku (alergická nebo anafylaktická reakce), útlum tvorby krevních buněk při podání imunokompetentních buněk (TA-GvHD) či tvorba protilátek proti krevním buňkám. K potransfuzní reakci může dojít i při přetížení kardiovaskulárního aparátu nebo při narušení iontové rovnováhy (metabolické komplikace aj.). Transfuze může vést i k přenosu infekce z dárce nebo transfuzního přípravku na příjemce, kontaminovaný transfuzní přípravek může vyvolat bezprostřední septickou nebo bakteriálně-toxickou reakci.

Za specifický typ PR je považováno hromadění železa v organismu při dlouhodobém podávání erytrocytů. Příčinou nežádoucí reakce mohou být i technické komplikace při transfuzi.

Důležité je věnovat pozornost nově vznikajícím příznakům v průběhu transfuze či po ní. Akutní PR se může prezentovat celou škálou příznaků, mezi které patří např.: horečka, zimnice nebo třesavka, kožní projevy, svědění, nauzea nebo zvracení, dušnost, stridor, hypoxie, hypotenze, oligurie, brnění kolem úst nebo drobné svalové záškuby, atd. U akutních reakcí se příznaky objevují až do 24 hodin po transfuzi, u pozdních reakcí v řádu dnů až týdnů. Při podezření na potransfuzní reakci je třeba reakci správně klasifikovat, racionálně řešit a nahlásit krevní bance k laboratornímu vyšetření. Správné určení typu reakce má význam pro její terapii, případně pro prevenci do budoucna.

Prevencí potransfuzních reakcí je správná indikace transfuze (typ transfuzního přípravku, jeho dávka) a správné provedení všech úkonů v procesu aplikace transfuze.

STL ČLS JEP vypracovala Doporučený postup při řešení a vyšetřování potransfuzních reakcí. Dokument obsahuje klasifikaci potransfuzních reakcí, kdy každá definice obsahuje příčinu, popis klinických příznaků, diagnostická kritéria a návod k terapii. Důraz je kladen na řešení reakcí bezprostředně ohrožujících život včetně terapie, na možnosti jejich prevence a profylaxe a racionální postup při jejich laboratorním vyšetření. Doporučení dále podává návod, jak zajistit hemoterapii u pacientů s opakovanými potransfuzními reakcemi, s akcentem na střední a těžké alergické reakce. Samostatná část je věnována hlášení potransfuzních reakcí.

IMPEDANČNÍ AGREGOMETRIE

**Pulcer M.^{1,2}, Gumulec J.³, Burša F.⁴, Máca J.⁴, Recová L.¹, Štveráková V.²,
Buffa D.³, Stejskal D.⁵**

¹Oddělení klinické hematologie, Ústav laboratorní medicíny, FN Ostrava

²Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

³Klinika hematoonkologie, FN Ostrava

⁴Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, FN Ostrava

⁵Ústav laboratorní medicíny, FN Ostrava

Úvod: Pro správné fungování primární hemostázy je mimo jiné důležitý nejen počet, ale také funkce krevních destiček. Vedle zlatého standardu, tj. optické agregometrie se dnes používají i další metody. Jednou z nich je impedanční princip měření plné krve na přístroji Multiplate. Přístroj se používá nejen pro vyšetření funkce krevních destiček, ale také pro sledování účinku protideštičkové léčby. Výsledky měření jsou udávány v tzv. agregačních jednotkách (AU), rychlosti agregace (AU/min) a celkovou hodnotou plochy pod agregační křivkou (AUC).

Cíl: Sdělení má za cíl komplexně posoudit výkonnostní charakteristiky přístroje Multiplate. Bližší se pak věnuje vyšetření funkce trombocytů u trombocytopenických pacientů s těžkým průběhem infekce COVID-19 a sice vlivu počtu krevních destiček na validitu výsledků a účinku podání trombocytárních transfúzních přípravků na funkci a počet krevních destiček.

Metodika: Pro vyšetřování agregace krevních destiček byl prováděn ADPtest, COLtest, ASPItest a TRAPtest na přístroji Multiplate. Paralelně byl vyšetřen počet krevních destiček na hematologické lince Sysmex XN-9000. Vzorky byly odebírány do zkumavek značky Sarstedt s hirudinem, resp. K₃EDTA pro KO.

Výsledky: Vyšetření agregace krevních destiček na přístroji Multiplate musí být prováděno ze vzorku hirudinové plné krve do tří hodin od okamžiku odběru. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi transportem donáškou a potrubní poštou ($p = 0,0041$). U vybrané skupiny pacientů s těžkým průběhem onemocnění Covid-19 na ECMO byl pozorován nejen snížený počet, ale také snížená funkce krevních destiček. Proto bylo pacientům aplikováno podání různých typů transfúzních přípravků včetně trombocytárních koncentrátů.

Závěr: Vedle optické agregometrie lze provést vyšetření agregace krevních destiček na přístroji Multiplate impedanční metodou. Stejně jako u optické agregometrie je i zde limitujícím faktorem minimální počet krevních destiček ($100 \times 10^9/L$). Vyšetření lze aplikovat zejména u kriticky nemocných, kde může být výhodou kromě spolehlivé blokády aktivního trombinu ve vzorku hirudinem a měření v plné krvi i krátký čas od odběru k výsledku.

HEMATOLOGICKÝ ANALYZÁTOR BECKMAN COULTER DXH 560

Pulcer M.^{1,2}, Kolářová S.¹, Hanzelková V.¹, Stejskal D.^{2,3}

¹OKH ÚLM FNO

²LF OÚ

³ÚLM FNO

Úvod: Laboratorní diagnostika představuje významnou část klinické medicíny. V současné době je na trhu k dispozici velký výběr různých typů hematologických analyzátorů od malých až po velké hematologické linky. Nejnovějším hematologickým analyzátozem firmy Beckman Coulter je přístroj s označením DxH 560. Umožňuje měřit krevní obraz a diferenciální počet leukocytů.

Cíl: Komplexní posouzení výkonnostních charakteristik analyzátoru DxH 560 v praxi. Dalším cílem bylo porovnání výsledků KO a DIFF mezi DxH 560 a Yumizen H550.

Metodika: Na Oddělení klinické hematologie ÚLM ve FN Ostrava byly vzorky analyzovány nejprve na DxH 560 a následně na Yumizen H550. U vybraných vzorků byly výsledky doplněny o mikroskopické vyšetření leukocytů. Datový soubor byl vyhodnocen statisticky a graficky pomocí softwaru MedCalc.

Výsledky: Výsledky studie prokázaly velmi dobrou korelaci ve výsledcích mezi porovnávanými analyzátoři.

Závěr: Analyzátor Beckman Coulter DxH 560 je plně automatizovaný hematologický analyzátor, který má uživatelsky přívětivý software, ke svému provozu potřebuje jen tři reagenty, nabízí kazetový a také manuální mód měření, a to vše při aspirovaném objemu pouhých 17 µL plné krve. Svým výkonem 55 vzorků za hodinu se hodí spíše do středních či menších laboratoří.

KOAGULAČNÍ ANALYZÁTOR SYSMEX CN-6000 – PRVNÍ ZKUŠENOSTI V ČR

*Recová L.¹, Pulcer M.^{1,2}, Šromová K.¹, Grebeníček L.¹, Bednářová L.¹,
Nemethová L.¹, Stejskal D.^{1,2}*

¹OKH ÚLM FNO

²LF OU

Úvod: Nejnovější analyzátor Sysmex CN-6000 je plně automatizovaný analyzátor hemostázy. Je vysoce výkonný při zachování kompaktních rozměrů. Charakteristickými vlastnostmi jsou minimalistický půdorys a vysoká propustnost. Inteligentní správa pracovních postupů s komplexní nabídkou testů na jediném analyzátoru, od rutinních po speciální, a inovativní a minimalizovaná proaktivní údržba také přispívá k uživatelsky osvěžující zkušenosti. Analyzátor poskytuje spolehlivé a vysoce validní výsledky díky osvědčené technologii více vlnových délek a pre-analytické kontrole vzorků.

Cíl: Cílem prezentace je komplexní posouzení charakteristik nejmodernějšího koagulačního systému. Dále porovnání vybraných rutinních a speciálních testů se stávajícím koagulačním systémem Sysmex CS-5100. Zejména rychlost jednotlivých stanovení.

Metodika: Uživatelská zkušenost s novým analyzátozem založená na zkušebním provozu v reálných podmínkách laboratoře a získání validních výsledků rutinních a speciálních testů.

Výsledky: Porovnání výsledků rutinních a speciálních testů, výkonnostních charakteristik, pracovního rozmezí jednotlivých testů a vlivu interferencí na stanovení.

Závěr: Nový analyzátor hemostázy je plně automatizovaný, moderní, spolehlivý a extrémně rychlý. Zároveň také velmi kompaktní. Poskytuje vylepšené analytické funkce a také minimalizuje náklady spojené s údržbou použitím sofistikovanějších materiálů a postupů. Systém nabízí vysoký výkon pro velkou laboratoř hemostázy díky množství nových funkcí, které vytvářejí výjimečnou uživatelskou zkušenost.

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE JAKO NÁSTROJ KE SCREENINGU LEUKOCYTŮ

*Říhová L., Bezděková R., Poláčková P., Almáši M., Suská R., Penka M.
OKH, FN Brno, NBP*

Úvod: Průtoková cytometrie je unikátní metodou analýzy buněčných populací v různých biologických materiálech. Její využití v hematologii je zaměřeno zejména na analýzu leukocytů. Polychromatická analýza lymfoidní a myeloidní řady umožňuje zachyt případné patologie, což ji činí nepřekonatelnou v dalším zpřesnění morfologického nálezu.

Cíl práce: Detailní screeningová analýza leukocytárních subpopulací v periferní krvi pomocí polychromatické průtokové cytometrie.

Materiál a metody: Celkem byla zhodnocena periferní krev (PK) 50 osob, zaslaných na oddělení nejčastěji na podkladě relativní lymfocytózy, leukocytózy či leukopenie. Vzorek PK byl zpracován jednak dle SOP pro Euroflow analýzu lymfocytů (tzv. lymfoid screen tube, LST), a to nejprve 2x promyt v 0,5 % fetal bovine serum (FBS), poté inkubován s protilátkami: CD4, CD20, CD45, CD8, CD56, kappa, lambda, CD5, CD34, CD19, TCRgamma/delta, CD3 a CD38; následně zlyzován a promyt. V rámci vlastního panelu pro myeloidní řadu byl vzorek inkubován s protilátkami CD16, CD45, HLA-DR, CD123, CD34, CD11b, CD33 a CD38; poté zlyzován a promyt. Zisk dat proběhl na BD FACS Canto (Becton Dickinson) a reanalýza pomocí SW Infinicyt (Cytognos).

Výsledky: Specifická kombinace antigenů v LST zkumavce a následná reanalýza pomocí speciálního SW umožňuje velmi jednoduše identifikovat základní lymfocytární subpopulace a odhalit případnou patologii. Naprostá většina vzorků spadala zastoupením T, B, NK buněk do normálního rozsahu. U 3 pacientů byla nalezena patologická populace B lymfocytů (1x B-CLL, 1x MBL, 1x jiná klonální subpopulace B lymfocytů), u 1 pacienta pak byla následnými analýzami potvrzena přítomnost klonu T lymfocytů. U pacientů lze takto identifikovat také LGL lymfocyty, které byly u 1 pacienta zastíženy ve výrazném zmnožení.

V rámci myeloidní řady lze jednoznačně odlišit prolínající se populace bazofilů, CD34⁺ buněk, a také prekurzorové dendritické buňky (myeloidní a lymfoidní) vč. identifikace subpopulací monocytů lišících se expresí CD16. Bylo detekováno různé zastoupení nezralé frakce neutrofilů, tzv. nízkodenzitních neutrofilů, jejichž funkce prozatím není zcela objasněna a mohou být zaměněny za nezralou frakci myelocytů. Výrazná patologie zde nebyla zachycena.

Závěr: Spojením standardizovaného Euroflow přístupu pro analýzu lymfocytů s vlastním panelem pro analýzu myeloidní řady lze dosáhnout komplexní analýzy leukocytárních subpopulací. Tento screeningový přístup umožňuje jednak odhalit

patologii a dále zpřesnit morfologické nálezy, navíc v krátkém časovém horizontu. Na prezentovaný rychlý screening mohou navazovat další upřesňující analýzy fenotypu případných patologických buněk, což je výhodou pro stanovení diagnózy, resp. k potvrzení/vyloučení hematologické malignity.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNBr; 65269705).

KAZUISTIKA PACIENTA S IMUNITNÍ TROMBOTICKOU TROMBOCYTOPENIÍ VYVOLANOU VAKCINACÍ PROTI ONEMOCNĚNÍ COVID-19 (VITT)

Sadílek P.¹, Malý R.², Dulíček P.¹, Fátorová I.¹

¹*FN Hradec Králové, IV. interní hematologická klinika*

²*FN Hradec Králové, I. interní kardiologická klinika*

Vakcínou vyvolaná imunitní trombotická trombocytopenie (VITT) je protrombotický syndrom, který se poprvé objevil v únoru 2021 v souvislosti s podáváním očkovací látky proti Covid-19. Objevil se nejdříve u malého počtu jedinců očkováných vakcínou firmy AstraZeneca, následně i po vakcíně firmy Johnson & Johnson, což jsou vakcíny založené na adenovirovém vektoru.

VITT je (podobně jako HIT) způsobena protilátkami namířenými proti destičkovému faktoru 4 (PF4) vázanému na povrchu krevních destiček (epitop na PF4 se však liší od epitopu rozpoznávaného HIT protilátkami). Jedná se o protilátky třídy IgG, které aktivují krevní destičky prostřednictvím receptorů FcγRIIa, což vede následně k výrazné stimulaci koagulačního systému a ke klinicky významným tromboembolickým komplikacím. Trombóza se u VITT může objevit v typických místech žilního tromboembolismu, časté jsou však trombózy v neobvyklých lokalizacích, zejména žil splanchnických, nadledvinových, mozkových a očních.

Diagnostika VITT vyžaduje jak průkaz klinických symptomů, tak laboratorní potvrzení patogenních protilátek. Laboratorní diagnostika VITT zahrnuje vyšetření krevního obrazu a základních koagulačních testů. Zásadní je však vyšetření protilátek proti PF4 obvykle technikou ELISA, případně funkčními testy používanými v diagnostice HIT. Naopak screeningové imunologické testy používané k diagnostice HIT jsou k průkazu VITT zcela nevhodné, dávají falešně negativní výsledky. Funkční testy v diagnostice VITT nejsou vyžadovány, pokud je výsledek techniky ELISA silně pozitivní, tzn. naměřená optická hustota je vyšší než 2,0. Diagnóza se pak považuje za potvrzenou pozitivním testem ELISA ve vhodném klinickém kontextu s trombózou a/nebo trombocytopenií, po podání vakcíny proti Covid-19 a bez expozice heparinu.

Studie publikované v odborné literatuře ukazují, že protilátky u VITT jsou přechodné. Pozitivita funkčních testů u většiny pacientů mizí v horizontu 5–28 týdnů. Pozitivita imunologických testů přetrvává delší dobu, titry protilátek však postupně klesají. Vzácně se objevuje tzv. dlouhotrvající VITT, kdy protilátky přetrvávají v oběhu velice dlouhou dobu, což je důvod, proč by tito pacienti neměli v budoucnu dostávat vakcíny proti Covid-19 založené na adenovirovém vektoru.

Předmětem tohoto sdělení je prezentace kazuistiky dosud jediného potvrzeného pacienta s VITT na našem pracovišti.

Podpořeno programem MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).

FRAGMENTY PROTROMBINU 1+2 VČERA, DNES A ZÍTRA

Sadílek P., Jančíková L., Fátorová I.

FN Hradec Králové, IV. interní hematologická klinika

Fragmenty protrombinu 1+2 (F1+2) jsou považovány za přímé markery generace trombinu in vivo. Odštěpují se z molekuly protrombinu při jeho přeměně na trombin. Jejich biologický poločas uváděný v literatuře je 90–120 minut. Oproti d-dimerům, které jsou degradačními produkty zesíťovaného fibrinu, jsou F1+2 výrazně časnějším markerem aktivace hemostázy. Navíc na rozdíl od d-dimerů odrážejí i krátkodobou aktivitu trombinu. Umožňují určit jak hyperkoagulační, tak hypokoagulační stav, naměřené hodnoty mohou být zvýšené i snižené.

Hodnoty F1+2 se zvyšují s přibývajícím věkem, v těhotenství, u nádorových a kardiovaskulárních chorob, virových onemocnění (např. COVID-19) či u žilního tromboembolismu. Naopak snížené hodnoty nacházíme u pacientů na antikoagulační léčbě, která navozuje potlačení koagulační aktivity, a tudíž i tvorbu F1+2. Po přerušení antikoagulační léčby dochází k opětovnému zvýšení koagulační aktivity, nárůstu koncentrace F1+2 a také rizika opakujících se příhod. Zejména u léčby antagonisty vitamínu K dochází v závislosti na hodnotě INR k poklesu koncentrace F1+2 pod spodní fyziologickou mez, což může být indikátorem vyššího rizika krvácení.

Koncentraci F1+2 lze v současné době stanovit buď technikou ELISA nebo pomocí LOCI technologie. První ELISA technika využívající polyklonální protilátky byla vyvinuta již v roce 1990. Teprve v roce 2014 byla vyvinuta ELISA využívající monoklonální protilátky a v roce 2017 představila firma Siemens INNOVANCE LOCI F 1+2, první plně automatizovanou metodu aplikovatelnou na rutinní koagulometr Atellica COAG 360 System. LOCI technologie se vyznačuje vysokou senzitivitou, vynikající přesností a krátkou dobou analýzy (13 minut). Metoda využívá monoklonální protilátky a má velký rozsah měření (15–5000 pmol/l). Všechny reagenty jsou součástí reagenční cartridge, která má i přes stálé uložení na palubě přístroje dlouhou stabilitu (14 dní). Metoda je obzvláště vhodná pro statimové, nepřetržité monitorování koncentrace F1+2, např. za účelem sledování prognózy, vývoje nebo k predikci rizika rozvoje kardiovaskulárních či tromboembolických komplikací.

V rámci naší studie jsme sledovali kinetiku F1+2 u vybraných pacientů FN HK s různými diagnózami, s hyperkoagulačním stavem. Koncentrace F1+2 byla měřena setem INNOVANCE LOCI F 1+2 na automatickém koagulometru Atellica COAG 360 (Siemens Healthineers).

Podpořeno programem MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).

DESET LET S PŘÍMÝMI ANTIKOAGULANCII

Šigutová P.

Ústav klinické biochemie a hematologie FN a LF UK Plzeň

V roce 2012 byla v České republice uvedena do klinické praxe dlouho očekávaná léčba přímými antikoagulancii, tehdy označovanými jako nová perorální antitrombotika (NOAC, new oral anticoagulants nebo také non vitamin K antagonists oral anticoagulants). Dnes se tyto moderní léčivé přípravky doporučuje označovat zkratkou DOAC (direct oral anticoagulants). Dělí se na přímé inhibitory trombinu (gatraný) a přímé inhibitory FXa (xabany). Z nich jsou v ČR registrovány a používány dabigatran, rivaroxaban, apixaban a edoxaban.

Dříve bylo jako jedna z hlavních výhod DOAC zdůrazňováno, že léčba nemusí být nijak laboratorně kontrolována. S postupem doby se však ukázalo, že v některých situacích je laboratorní monitorování hladiny léku nezbytné: při krvácení, před akutními invazivními výkony či při podezření na předávkování. Monitorace může být užitečná i před zahájením jiné léčby ke zjištění rizika krvácení či u pacientů s extrémní hmotností. K předávkování může dojít např. při zhoršení renálních funkcí, zvláště u pacientů léčených dabigatranem. U akutního krvácení je důležité rozlišit, zda jde o lokální příčinu krvácení nebo se jedná o vliv DOAC.

V případě nutnosti monitorování je pro hodnocení laboratorních výsledků zapotřebí znát dobu podání poslední dávky DOAC kvůli jejich krátkému biologickému poločas. Pro sledování aktivity dabigatranu je používáno měření dilutovaného trombinového času (dTT; ve FN Plzeň od března 2012). Pro sledování účinku xabanů se měří aktivita anti-Xa kalibrovaná na rivaroxaban, apixaban nebo edoxaban (ve FN Plzeň postupně od dubna 2013, května 2015 resp. od června 2018). V některých situacích je v laboratoři potřeba před samotným koagulačním měřením odstranit DOAC ve vyšetřované plazmě pomocí aktivního uhlí (reagencie DOAC Stop).

Běžné koagulační testy pro monitorování léčby nejsou vhodné, protože nejsou dostatečně citlivé a neodrážejí skutečný vliv užívaného antitrombotika na hemostázu. Na druhé straně významně (až atypicky) patologické hodnoty protrombinového či trombinového testu při screeningovém vyšetření mohou při neznámé lékové anamnéze poukázat na přítomnost DOAC.

Užitečné může být POCT stanovení DOAC z moče (DOAC Dipstick resp. DOASENSE).

Jako antidotum dabigatranu je používán idarucizumab. Pro reverzi účinku rivaroxabanu, apixabanu a edoxabanu poměrně nově existuje antidotum andexanet alfa, v současné době pro klinickou praxi v ČR zatím nedostupný. Ve fázích klinického testování je také univerzální antidotum ciraparantag, který vazbou na hepariny, fondaparinux či DOAC jejich účinek antagonizuje.

S „novými“ léky se stále učí zacházet nejen laboratoř, ale i ošetřující lékaři a sestry. Neméně důležitá je i postanalytická část se zhodnocením laboratorního výsledku v kontextu s důvodem vyšetření, s druhem léku, jeho dávkováním, časem užití poslední dávky a očekávaným poločasem s přihlédnutím k ledvinným funkcím.

VRODENÁ DYSFIBRINOGENÉMIA: POKROKY VO VÝSKUME, DIAGNOSTIKE A MANAŽMENTE LIEČBY

**Šimurda T.¹, Casini A.², Neerman-Arbez M.³, Steranková M.¹, Žolková J.¹,
Škorňová I.¹, Kolková Z.⁴, Loderer D.⁴, Grendár M.⁴, Brunclíková M.¹,
Lasabová Z.⁵, Dobrotová M.¹, Plameňová I.¹, Staško J.¹, Kubisz P.¹**

¹Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfúziológie,
Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzitná nemocnica Martin

²Division of Angiology and Hemostasis, Faculty of Medicine,
Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland

³Department of Genetic Medicine and Development, Faculty of Medicine,
University of Geneva, Geneva, Switzerland

⁴Martinské centrum pre biomedicínu, Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine

⁵Ústav molekulovej biológie a genomiky, Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Vrodená dysfibrinogenémia (VD) je zriedkavé ochorenie hemostázy, spôsobené zmenami v štruktúre molekuly fibrinogénu. Tieto zmeny vedú k poruche funkcie fibrinogénu. Laboratórna diagnostika je založená na diskrepancii medzi zníženou aktivitou fibrinogénu a normálnym antigénom fibrinogénu. K potvrdeniu diagnózy je nevyhnutné genetické testovanie. U väčšiny prípadov je VD spôsobená heterozygotnou missense mutáciou v jednom z troch génov kódujúcich molekulu fibrinogénu (*FGA*, *FGB*, *FGG*). Na základe genotypu a fenotypu, podvýbor pre faktor XIII a fibrinogén ISTH navrhol novú klasifikáciu pre VD. Klinický fenotyp je vysoko heterogénny. Väčšina pacientov je asymptomatická, ale u iných môžeme pozorovať krvácania, a v niektorých prípadoch aj trombotické komplikácie. Z dôvodu spresnenia fenotypu sa vo výskumných laboratóriách vyšetrujú aj globálne testy hemostázy a špeciálne funkčné analýzy fibrinového koagula. Manažment liečby niektorých najčastejších klinických stav, akými sú akútne krvácanie, chirurgický výkon a tehotenstvo je veľmi náročný. V liečbe zohráva najdôležitejšiu úlohu podávanie fibrinogénového koncentrátu. Okrem toho sú dôležité antifibrinolytiká a antikoagulantia, ktoré sú súčasťou liečby v špecifických klinických prípadoch. V súčasnosti sa preto kladie veľký dôraz na komplexnú diagnostiku VD. Klasifikácia, diagnostické postupy a výskum v oblasti vrodených porúch fibrinogénu sú nevyhnutné k zlepšovaniu manažmentu liečby.

Pod'akovanie: Práca bola podporená projektmi: Granty VEGA 1/0479/21, 1/0436/21, Grant Univerzity Komenského (UK/5/2022).

LÉČBA PACIENTŮ SE ZÍSKANOU HEMOFILIÍ A, ZKUŠENOSTI Z BRNĚNSKÉHO CENTRA

*Smejkal P.^{1,2}, Kamelander J.^{1,2}, Bulíková A.^{1,3}, Romanová G.^{1,2,3}, Kíssová J.^{1,3},
Šlechtová M.¹, Zavřelová J.^{1,2}, Žáčková D.³, Volková L.³, Penka M.^{1,3}*

¹Oddělení klinické hematologie, FN Brno

²Katedra laboratorních metod, LF MU

³Interní hematologická a onkologická klinika FN Brno a LF MU

Úvod: Získaná hemofilie A (ZHA) je poměrně vzácné onemocnění s roční incidencí cca 1–1,5 na milion populace.

Pacienti a metodika: Zhodnotili jsme výsledky diagnostiky a léčby pacientů se ZHA ve FN Brno od roku 1998 po současnost.

Výsledky: V tomto období bylo na našem pracovišti diagnostikováno celkem 45 pacientů se ZHA. Ve 26 případech byla etiologie inhibitoru FVIII idiopatická, u 11 pacientů byla malignita, u 7 revmatoidní artritida a jedené pacientky byla ZHA po porodu. Medián věku byl 76 let (34–91), hladiny FVIII 3 % (0–38 %) a inhibitoru FVIII 16 BU/ml (1,06–19 000 BU/ml). Všichni pacienti měli krvácivé projevy, především do podkoží a svalstva, z nichž 28 (62 %) vyžadovalo léčbu. U 26 z nich byla k léčbě krvácení použita bypassová aktivita (10x pouze aPCC, 8x pouze rFVIIa, 8x aPCC i rFVIIa) a 2x vysoká dávka FVIII (se vstupním titrem inhibitoru 2,4 BU/ml, resp. 0,88 BU/ml).

Kromě pacientky s velmi nízkým titrem inhibitoru po porodu, který vymizel spontánně, a tří pacientů s infaustní prognózou (2x pro pokročilou malignitu a 1x pro septický stav po evakuaci hematomu stehna), byla vždy zahájena imunosupresivní terapie (IST) s cílem eradikace inhibitoru FVIII.

U většiny pacientů byl použit standardní režim kortikosteroidy (KS) a cyklofosfamid (CF), u osmi pacientů pouze KS a u jednoho pacienta pouze CF, 1x byla použita kombinovaná chemoterapie R-COP při současné léčbě nově diagnostikovaného lymfomu.

Ze 41 pacientů léčených IST bylo dosaženo eradikace inhibitoru FVIII u 32 (78 %) z nich, v mediánu 31 dnů (14–180). Z toho 1x až po druhé linii IST: u dvou pacientů byl pro neúčinnost kombinace KS + CF podán i rituximab (remise nebyla dosažena) a u jedné pacientky byl ve II. linii léčby CF nahrazen mykofenolátem (MF) s dosažením remise.

K recidivě inhibitoru do jednoho roku od původní diagnózy ZHA došlo u 7 pacientů (21,9 %). V pěti případech byla recidiva zvládnuta stejnou IST (KS nebo KS + CF) jako vstupně (u jedné pacientky byl následně diagnostikován pokročilý tumor pankreatu), u jedné pacientky při nutnosti trvalé kortikoterapie byl použit s úspěchem MF a u jednoho pacienta byla recidiva inhibitoru za 11 měsíců

od jeho eradikace, kdy byla bez efektu kombinace KS + CF a následně podaný rituximab měl efekt jen částečný a pacient zemřel na infekční komplikace.

Celková úmrtnost do jednoho roku od diagnózy byla vysoká 18/45 (40 %). Zemřeli 3 infaustní pacienti, u nichž nebyla IST zahájena a všech 9 pacientů, kteří po zahájení IST nedosáhli eradikace inhibitoru: 3x na progresi tumoru, 3x na infekční komplikace (z toho 1x po nutnosti evakuace hematomu retroperitonea po předchozí implantaci TP kyčle) a 3x na kardiální komplikace (z toho 2x infarkt myokardu). Z pacientů, kteří dosáhli eradikace inhibitoru, 3 zemřeli při následné dlouhodobé hospitalizaci v LDN na bronchopneumonii a 3 na progresi onkologického onemocnění. Ze všech pacientů s diagnostikovanou ZHA tedy dlouhodobě přežilo (déle než 1 rok) 27/45 (60 %) a z pacientů léčených IST 26/41 (63,4 %).

Závěr: Léčba krvácení u pacientů se ZHA byla zvladatelná kromě dvou případů, kdy byla nutná evakuace rozsáhlého hematomu třísla a retroperitonea. Všichni pacienti, kteří nedosáhli eradikace inhibitoru zemřeli na komplikace – infekční, kardiální nebo progresi onkologického onemocnění. Část z pacientů, kteří dosáhli remise onemocnění, také zemřela – na bronchopneumonii vlivem dlouhodobé imobilizace a na onkologické onemocnění. Podíl na tom měl vysoký věk pacientů. Ve II. linii imunosuprese se nám spíše než rituximab osvědčil mykofenolát.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705).

SYNDRÓM LEPIVÝCH DOŠTIČIEK U PACIENTOK SO SPONTÁNNYM ABORTOM

Sokol J.¹, Lisá L.¹, Škereňová M.², Žolková J.¹, Chudej J.¹, Chbat A.¹, Lineková E.¹, Péčová M.¹, Staško J.¹, Kubisz P.¹

¹Klinika hematológie a transfuziológie, Národné centrum hemostázy a trombózy, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Univerzitná nemocnica Martin

²Ústav klinickej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Univerzitná nemocnica Martin

Kľúčové slová: glykoproteín VI, polymorfizmus, syndróm lepiivých doštičiek, potrat.

Úvod: Syndróm lepiivých doštičiek (SPS) je charakterizovaný in vitro zvýšenou agregáciou trombocytov po podaní adenosindifosfátu (ADP) a adrenalínu (EPI). SPS sa prejavuje artériovou a/alebo venóznou trombózou a potratmi. Presný genetický základ ochorenia stále nepoznáme. Diagnóza a klasifikácia SPS sa opiera o vyšetrenie agregácie doštičiek, pričom ako už bolo vyššie spomenuté, používajú sa dva induktory: ADP a EPI.

Cieľ: Cieľom práce bolo vyšetrenie vybratých polymorfizmov celkovo 8 génov (GP6, PEAR1, ADRA2A, MRV11, FCER1G, JAK2, GAS6 a PPBP) u pacientok so SPS a anamnézou spontánneho abortu v porovnaní so zdravými ženskými kontrolami.

Metodika: Agregabilita trombocytov bola testovaná v plazme bohatej na doštičky pomocou PACKS-4 agregometra (Helena Laboratories, USA). Na genotypovú analýzu bola použitá vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia (HRM) pomocou LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Nemecko).

Výsledky: Celkovo sme vyšetrili 64 pacientok so SPS a 54 zdravých ženských kontrol. V rámci genotypovej analýzy sme našli signifikatne vyššiu frekvenciu výskytu 5 jednonukleotidových polymorfizmov (SNPs) génu GP6 u pacientok so SPS vs. kontroly (rs1671152, rs1654433, rs1613662, rs1654416 a rs2304167). V rámci haplotypovej analýzy sme pozorovali aj signifikatne vyšší výskyt 5 haplotypov génu GP6 u pacientok so SPS vs. kontroly (acgg a aagg u GP6_5reg haplotype; ccgt u GP6_3reg haplotype; ta u GP6_REG haplotype; PEAN u GP6_PEAN haplotype).

Záver: Naše výsledky, najmä vyšší výskyt 4 nesynonymných variantov v kódujúcej oblasti génu GP6, podporujú myšlienku, že polymorfizmy GP6 sú spojené s hyperagregabilitou trombocytov, ktorá sa manifestuje v podobe spontánneho potratu.

Podakovanie: Táto práca bola podporená grantom KEGA 056UK-4/2022, VEGA 1/0250/22 a APVV-17-0054.

STICKY PLATELET SYNDROME (SPS) – KDE SME A KAM SMERUJEME V ROKU 2022?

Staško J., Hollý P., Sokol J., Lisá L., Plameňová I., Kubisz P.

*Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfúziológie,
Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine
a Univerzitná nemocnica Martin, Martin, SR*

Úvod: Sticky platelet syndrome (SPS) je menej známa trombofilná porucha funkcie trombocytov s familiárnym výskytom a s pravdepodobným genetickým podkladom. SPS je klinicky charakterizovaný zvýšeným rizikom venózných a artériových trombotických príhod a tehotenských (placentárne navodených) komplikácií. Hlavným laboratórnym kritériom je zvýšená agregácia trombocytov po nízkych dávkach adenosíndifosfátu (ADP) a epinefrínu (EPI, adrenalínu). Napriek tomu, že SPS bol po prvýkrát popísaný pred 40 rokmi, mnoho otázok týkajúcich sa jeho etiológie, patomechanizmu, genetického pozadia, optimálnej diagnostiky a liečby zostáva kontroverzných.

Cieľ: Cieľom príspevku je zhrnúť doterajšie publikované štúdie, aktuálnu definíciu syndrómu, poukázať na jej limitácie a navrhnúť perspektívne možnosti ďalšieho výskumu SPS.

Materiál a metódy: Metódou zberu materiálu bol literárny výber publikácií o SPS z databáz Medline, Embase a publikovaných príspevkov z medzinárodných vedeckých a odborných konferencií, doplnený nepublikovanými výsledkami autorov.

Výsledky: Prehľad súčasného poznania SPS je nasledovaný rozborom jeho patofyziologických, diagnostických a terapeutických problémov.

Záver: Kľúčovým problémom diagnostiky SPS je naďalej štandardizácia optickej agregometrie (LTA) ako „zlatého štandardu“ pre hodnotenie funkcie trombocytov pri SPS. Chýbanie veľkých prospektívnych štúdií zostáva, napriek narastajúcemu počtu publikovaných kazuistík a súborov pacientov, hlavnou limitáciou pre prijatie SPS ako samostatnej nozologickej jednotky v klinickej praxi.

Podakovanie: Práca bola podporená projektom Vega 1/0479/21 a projektom APVV 16-0020.

HEMOCYTOMETRICKÉ PROGNOSTICKÉ SKÓRE COVID-19 JAKO SNADNO DOSTUPNÝ MARKER K PREDIKCI STŘEDNĚ TĚŽKÉHO A TĚŽKÉHO PRŮBĚHU COVID-19 V KLINICKÉ PRAXI

Vrbacký F.¹, Blažek M.², Fátorová I.¹, Mirská K.³, Hrnčířová K.¹

*¹IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové
a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové*

*²Plicní klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta
Univerzity Karlovy, Hradec Králové*

³Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové

Klíčová slova: COVID-19, koronavirus, hemocytometrické prognostické skóre COVID-19.

Úvod: Coronavirové onemocnění 2019 (COVID-19) je život ohrožující stav s velmi heterogenním průběhem ovlivněným např. věkem a dalšími komorbiditami. Mnoho současných studií se proto zaměřuje na analýzu ukazatelů spojených s časným hodnocením klinického průběhu a prognózy onemocnění COVID-19.

Jedním z možných publikačně podpořených prognostických ukazatelů je hemocytometrické prognostické skóre COVID-19 založené na kombinaci hematologických parametrů. Prognostické skóre COVID-19 by mohlo být velmi užitečným a snadno dostupným ukazatelem v klinické praxi. Zejména pak k predikci středně těžkého a těžkého průběhu COVID-19 v čase primárního kontaktu s pacientem.

Metodika: Do studie byli zařazeni pacienti s COVID-19 vyšetření ve Fakultní nemocnici Hradec Králové s příznaky infekce dýchacích cest a pozitivním PCR testem na virus SARS-CoV-2. Při prvním kontaktu s pacientem bylo spolu s dalšími laboratorními parametry hodnoceno prognostické skóre COVID-19 a klinický stav nemocných. Někteří pacienti byli léčeni ambulantně a někteří byli přijati pro respirační tíseň při probíhající pneumonii COVID-19 nebo pro související komplikace.

Hodnotili jsme vstupní hodnotu prognostického skóre COVID-19 a jeho vztah k dalšímu klinickému vývoji onemocnění, abychom ověřili možnost využití tohoto ukazatele ke stanovení prognózy COVID-19 v čase prvního kontaktu s nemocným. Prognostický význam byl vyhodnocen pomocí ROC (Receiver Operating Characteristic) křivek a plochy pod křivkou (AUC, area under curve).

Výsledek: Ze 180 sledovaných nemocných se závažné příznaky rozvinuly u 44. Z hodnocených parametrů byla nejvyšší hodnota AUC u COVID skóre (0,855). Nejvyšší kombinace sensitivity (91,9 %) a specificity (71,7 %) pro identifikaci nemocných s následným středně těžkým a těžkým průběhem onemocnění bylo dosaženo při hranici COVID skóre > 1.

Závěry: Prognostické skóre COVID-19 je slibným ukazatelem, který dobře stratifikuje pacienty s COVID-19 do skupin podle budoucího vývoje onemocnění již v době prvního kontaktu a umožňuje tak včasné zajištění zvýšené péče u těch, u kterých je vysoké riziko závažného vývoje.

Tato práce byla podpořena programem Cooperatio, vědní oblast ONCO a MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).

POLIEKOVÉ ABNORMALITY FIBRINOGENU

Wild A., Ondrejčeková A.

Hematologické odd., FNsP F.D. Roosevelta, Banská Bystrica, Slovensko

Získané poruchy fibrinogénu sa bežne vyskytujú ako dôsledok diseminovanej intravaskulárnej koagulopatie, primárnej hyperfibrinolýzy, koagulopatie pri cirhóze heparu, hemodilúcie, po podaní fibrinolytík či asparaginázy.

Cieľ: upozorniť na abnormality fibrinogénu vyskytujúce sa v klinickej praxi hematológa v súvislosti s užívaním liekov primárne neovplyvňujúcich hemostázu.

Metodika: prehľad problematiky z literatúry a vlastné skúsenosti formou ka-
zuistik.

Výsledky: Autori sa zameriavajú na abnormality fibrinogénu ako dôsledok podávania dvoch liekov: Hypofibrinogénia pri podávaní antibiotika tigecyklínu, ktorej vznik je závislý na dávke a dĺžke podávania, u časti pacientov je symptomatická, môže vyžadovať aj substitúciu fibrinogénu.

Hypofibrinogénia a hyperfibrinolýza indukovaná valproátom, k parciálnej úprave dochádza už niekoľko dní po jeho vysadení. Stav môže vyžadovať podanie antifibrinolytík a fibrinogénu.

Záver: pri diferenciálnej diagnostike hypofibrinogénie je nutné zvážiť aj spojenosť s užívaním liekov primárne neovplyvňujúcich hemostázu.

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA HIT

Zavřelová J., Chytrá D., Kovaříková J., Bulíková A., Penka M.

Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno

Úvod: Heparinem indukovaná trombocytopenie je klinicko-laboratorní syndrom charakterizovaný imunitně podmíněnou trombocytopenií a je život ohrožující komplikací léčby heparinem. Heparin se váže na trombocyty, dochází k uvolnění PF4 z α -granulí trombocytů, tvoří se komplexy Heparin/PF4, které mohou u některých lidí indukovat tvorbu specifických protilátek (IgG, ev. IgM, IgA). Vazba imunokomplexů na Fc γ RIIa receptory destiček vede k aktivaci destiček.

Laboratorní diagnostika HIT zahrnuje testy imunologické – průkaz protilátek proti PF4/Heparin kvalitativními testy (průkaz přítomnosti/nepřítomnosti) nebo ELISA testy (průkaz protilátek různých tříd) a testy funkční. Těmito testy vyšetřujeme schopnost HIT protilátek aktivovat normální trombocyty jen v přítomnosti heparinu (ne v nepřítomnosti a při vysoké koncentraci). Při aktivaci destiček dochází k uvolňování α -granulí a denzních granulí, generaci destičkových mikropartikulí, expresi membránových glykoproteinů, agregaci destiček.

K funkčním testům patří uvolnění serotoninu (referenční metoda) HPLC, destičkový agregační test, exprese destičkový membránových glykoproteinů průtokovou cytometrií a další testy.

Metodika: V naší laboratoři používáme k průkazu přítomnosti protilátek screeningový kvalitativní test (Stick Expert HIT, Stago), rychlý a dostupný statimově 24 hodin denně a test ELISA k průkazu protilátek IgM, IgG, IgA protilátek (Zymutest HIA IgG, IgA, IgM, Hyphen BioMed). Vyhodnocuje se hodnota OD porovnáním s cut-off. Výsledek musí být potvrzen poklesem OD při nadbytku heparinu. K průkazu schopnosti protilátek aktivovat normální trombocyty v přítomnosti heparinu (ne v nepřítomnosti a nadbytku heparinu) používáme funkční testy destičkový agregační test a průkaz exprese Anexinu V průtokovou cytometrií.

Výsledky: V práci prezentujeme výsledky 6 pacientů, u kterých jsme v období únor – květen 2022 diagnostikovali HIT. Všichni pacienti měli pozitivní protilátky proti PF4/Heparin screeningovým kvalitativním testem a výrazně pozitivní protilátky metodou ELISA ve třídě IgG, u jednoho současně i IgA. U třech pacientů byly pozitivní oba dva funkční testy, destičkový agregační test i test k průkazu HIT průtokovou cytometrií. U jednoho pacienta byl pozitivní jen destičkový agregační test při nižší koncentraci heparinu (0,5 IU/ml) a pozitivita byla ověřena SRA na ÚHKT, test HIT průtokovou cytometrií byl negativní. U zbývajících dvou pacientů byly oba funkční testy negativní, se vzestupem destiček po vysazení heparinu – suspektní HIT.

Závěr: Důležitým předpokladem správné diagnostiky HIT je standardizace funkčních testů, která zahrnuje výběr vhodných dárců destiček, pokud možno otestovaných a na reaktivitu s HIT protilátkami, použití pozitivních a negativních kontrol, inaktivaci vzorku pacienta při 56 °C, použití vhodných koncentrací heparinu.

miRNA A HYPERAGREGABILITA TROMBOCYTOV PRI SYNDRÓME LEPIVÝCH DOŠTIČIEK

Žolková J.¹, Vadelová E.¹, Škereňová M.², Ivanková J.¹, Sokol J.¹, Staško J.¹

*¹Klinika hematológie a transfuziológie, Národné centrum hemostázy a trombózy,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave,
Univerzitná nemocnica Martin*

*²Ústav klinickej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave, Univerzitná nemocnica Martin*

Úvod: Syndróm lepiivých doštičiek (SPS) je označovaný ako trombofilná trombocytopenia s autozomálne dominantnou dedičnosťou. Väčšina genetických štúdií doteraz preukázala, že do patogenézy SPS je zapojená variabilita génov, napr. GP6, GAS6, PEAR1 a MRVI1. Aj napriek zvyšujúcemu sa záujmu o tento syndróm sa zatiaľ nepodarilo identifikovať genetickú abnormalitu spôsobujúcu SPS. Zaujímavé možnosti pre ďalší výskum príčiny SPS ponúkajú miRNA trombocytov, ktoré sú považované za biomarkery vaskulárnej trombózy, a pravdepodobne zasahujú do reaktivity trombocytov.

Cieľ: Predstaviť pilotnú štúdiu zameranú na sledovanie vzťahu medzi expresiou nami vybraných miRNA trombocytov a hyperagregabilitou trombocytov u pacientov s SPS.

Metódy: V pilotnej štúdií sme vyšetrili 45 pacientov s potvrdenou diagnózou SPS a 30 zdravých dobrovoľníkov. Pri analýze vzoriek sme využili metódu funkčného vyšetrenia trombocytov (svetelnú agregometriu), a metódu magnetickej separácie trombocytov. Na určenie expresei nami vybraných miRNA v trombocytoch sme využili kvantitatívnu reverzne transkripčnú polymerázovú reťazovú reakciu (qRT-PCR).

Výsledky: Pri analýze expresei miRNA-96, miR-126 a miR-233 v trombocytoch sme nepozorovali vzťah s funkčným vyšetrením trombocytov u pacientov so SPS. V súbore pacientok so SPS a tehotenskými komplikáciami sme však zaznamenali významne zvýšenú expresiu miR-96 v trombocytoch ($p < 0,01$).

Záver: Naše výsledky v celom súbore pacientov so SPS nepotvrdili predpoklad, že zmeny v expresii miR-96, miR-126 a miR-233 v trombocytoch by mohli spôsobiť abnormality v reaktivite trombocytov, ktoré by sa prejavili ako SPS. V súbore pacientok so SPS a tehotenskými komplikáciami sa expresia miR-96 v trombocytoch takmer zdvojnásobila, čo by mohlo súvisieť so zmenami v patogeneze SPS u týchto pacientok, no tieto zistenia je potrebné overiť na súbore s väčším počtom pacientok.

GENETICKÁ VARIABILITA U PACIENTOV S VON WILLEBRANDOVOU CHOROBOU

**Žolková J.¹, Kolková Z.², Loderer D.², Provazníková D.³, Hrachovinová I.³,
Grendár M.⁴, Dobrotová M.¹, Ivanková J.¹, Škorňová I.¹, Vadelová E.¹,
Sokol J.¹, Lasabová Z., Kubisz P.¹, Staško J.¹**

¹*Klinika hematológie a transfúziológie, Národné centrum hemostázy a trombózy,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave,
Univerzitná nemocnica Martin*

²*Martinské centrum pre biomedicínu, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave*

³*Laboratoř pro poruchy hemostázy, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*

⁴*Bioinformatické konzultačné centrum, Martinské centrum pre biomedicínu,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave*

Cieľ: Sledovanie vzťahu medzi laboratórnym fenotypom a genotypom u pacientov s vWCH.

Úvod: Von Willebrandova choroba (vWCH) vzniká v dôsledku mutácií v géne pre von Willebrandov faktor (vWF). Doteraz bolo identifikovaných takmer 590 unikátnych kauzálnych mutácií, ktoré rôznymi mechanizmami vedú k deficitu vWF v plazme alebo k poruchám v jeho funkciách v adhézii a agregácii trombocytov alebo v interakciách s FVIII. V rutinej diagnostike vo väčšine prípadov kompletná laboratórna diagnostika umožňuje stanoviť diagnózu pacienta. No existujú špeciálne situácie, kedy genetické testovanie môže byť nápomocné, dokonca v niektorých prípadoch kľúčové. Okrem toho štúdie na veľkej populácii pacientov s vWCH, ktoré popisujú vzťahy medzi genotypom a fenotypom na veľkom počte pacientov, poskytujú komplexné a unikátne dáta.

Súbor a metódika: Do štúdie bolo zaradených 27 pacientov a 8 rodinných príslušníkov, ktorým bol realizovaný laboratórny skrining na vWCH (vWF:Ag, VWF:Ac, FVIII:C, VWF:CB, PFA100) a diskriminačné vyšetrenia (RIPA, analýza multimérov, genetické testovanie). Na genetické testovanie sme využili vlastný dizajn NGS panelu a prítomnosť identifikovaných variantov sme overili pomocou Sangerovho sekvenovania. Na detekciu veľkých génových delécií sme využili metódu MLPA.

Výsledky: V skupine pacientov sa nám podarilo identifikovať 13 rôznych mutácií. Z toho 5 missense mutácií (p.Thr791Met, p.Arg854Gln, p.Arg926Gln, p.Trp1144Gly, p.Ile1628Thr), 4 delécie/inzercie (delEx1-3, c.878_878delC, c.2435delC, c.8217_8218insA), 3 nonsense mutácie (p.Tyr883*, p.Arg1853*, p.Arg2434*) a 1 zostrihovú mutáciu (c.3379+1G>A). Najčastejšou mutáciou bola c.2435delC, ktorá bola prítomná u pacientov s typom 1, 2N aj 3 vWCH. U troch

pacientov sme identifikovali zmiešaný fenotyp 1/IIIE. U týchto pacientov bola prítomná mutácia p.Trp1144Gly. U pacientov s typom 2N vWCH bola najčastejšou mutáciou p.Arg854Gln. U8 pacientov genotyp nekoreloval s laboratórnym nálezom alebo úplne nevysvetľoval laboratórny nález týchto pacientov.

Záver: Klinický obraz a genetické pozadie vWCH sú veľmi heterogénne. Aj keď sa v minulosti predpokladalo, že genetické testovanie umožní vysvetliť vzťah medzi genotypom a fenotypom u všetkých pacientov, kvôli neúplnej penetrancii a variabilnej expresivite, genotyp nie vždy korešponduje s plazmatickou hodnotou vWF a klinickým prejavom krvácania pacienta. Preto má zovšeobecňovanie genetického testovania pri vWCH nízky klinický význam. Potrebný je individuálny prístup, založený na interakcii medzi lekárom, pacientom a skúseným laboratóriom, aby sa predišlo chybnjej klasifikácii vWCH. Pri stanovovaní diagnózy je potrebné brať do úvahy aj environmentálne faktory, ktoré vplývajú na plazmatické koncentrácie vWF.

Pod'akovanie: *Práca bola podporená projektom VEGA1/0187/17.*

POSTEROVÁ SEKCE

GENETICKÁ VARIABILITA GÉNOV PRE GPVI, MRVI1 A PEAR1 U PACIENTOV S HYPERAGREGABILITOU TROMBOCYTOV A TEPNOVÝMI OKLÚZIAMI

*Brunclíková M.¹, Ivanková J.¹, Škereňová M.², Dobrotová M.¹, Hollý P.¹,
Šimurda T.¹, Stančíaková L.¹, Steranková M.¹, Škorňová I.¹, Staško J.¹*

*¹Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfúziológie,
Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzitná nemocnica Martin*

*²Martinské centrum pre biomedicínu, Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin*

Kľúčové slová: Syndróm lepiivých doštičiek, hyperagregabilita trombocytov, artériová trombóza, genetické pozadie.

Úvod: Syndróm lepiivých doštičiek (SPS) je trombofilná trombocytopatia charakterizovaná prekonanou trombózou spolu s laboratórne verifikovanou zvýšenou agregabilitou trombocytov vyvolanou nízkymi koncentraciami doštičkových induktorov – adenozindifosfátom (ADP) a/alebo adrenalinom (EPI). Klinické prejavy ochorenia sú pestré. SPS sa môže manifestovať uzávermi v rôznych lokalitách. Najčastejšie sa trombózy formujú v tepnách.

Ciele a metodika: Cieľom práce bolo pokúsiť sa identifikovať príčinu a mechanizmy vzniku SPS u pacientov s artériovými trombózami. Prostredníctvom genetickej analýzy zistiť prítomnosť vzťahu medzi polymorfizmami nami vybraných génov a klinickým fenotypom ochorenia a verifikovať, či tieto polymorfizmy majú vzťah ku vzniku artériových trombóz. Analyzovali sme súbor 69 pacientov s SPS do 45 rokov, ktorí prekonali artériovú trombózu. Kontrolnú skupinu tvorilo 69 zdravých darcov krvi.

Výsledky: Vybrané polymorfizmy génov a skúmané haplotypy pre GPVI, PEAR1, MRVI1 sa nezdajú byť rizikovým faktorom pre rozvoj SPS s fenotypom artériovej trombózy. V podskupine pacientov so SPS I sme zaznamenali zníženú frekvenciu minoritnej alely A SNP rs12041331 v géne PEAR1 (hraničná hodnota p , $p = 0,061$), ktorá môže byť považovaná za protektívnu proti artériovej trombóze. V rovnakej podskupine pacientov s SPS I, haplotyp TA v géne PEAR1 tiež vykazoval zníženú frekvenciu s hraničnou nevýznamnosťou ($p=0,056$). Môžeme teoretizovať o jeho ochrannej úlohe u pacientov s SPS I. Pri analýze SNPs a haplotypov GP6 vrátane haplotypu PEAN sme taktiež nezaznamenali vyšší, respektíve nižší výskyt vo frekvencii skúmaných genetických zmien. Nepotvrdili sme súvislosť medzi genetickými zmenami GP6 a vznikom fenotypu artériovej trombózy.

Záver: Naše výsledky podporujú myšlienku, že skúmaná genetická variabilita vybraných SNP v génoch GP6, PEAR1 a MRVI1 nie je spojená s hyperagregabili-

tou krvných doštičiek prejavujúcou sa ako artériová trombóza. Možnú ochrannú úlohu minoritnej alely A SNP rs12041331, ako aj potenciálne protektívnu úlohu haplotypu TA v géne PEAR1 súvisiacu s artériovou trombózou, zistenou v podskupine pacientov SPS I, je potrebné overiť v ďalšom výskume.

ZÍSKANÝ INHIBITOR FAKTORU XI

*Fenclová T.¹, Provažníková D.¹, Lišková R.¹, Radovská A.¹, Šimoníková M.¹,
Loužil J.², Češpíková D.¹, Mareček F.¹, Salaj P.², Hrachovinová I.¹*

¹Ústav hematologie a krevní transfuze,

Národní referenční laboratoř pro poruchy hemostázy, Praha

²Ústav hematologie a krevní transfuze,

Centrum pro trombózu a hemostázu, Praha

Úvod: Deficit faktoru XI je dědičná nebo získaná krvácivá choroba, která způsobuje zvýšenou tendenci ke krvácení po traumatu nebo operačním zákroku. V našem sdělení prezentujeme pacientku se získaným deficitem faktoru XI na pozadí Lupus antikoagulans (LA) a dědičné poruchy faktoru XI.

Metody: Hladina faktoru XI byla vyšetřována koagulační jednofázovou metodou, stanovení inhibitoru Bethesda metodou, LA podle doporučení Laboratorní sekce ČHS ČLS JEP. Dále byla provedena analýza genomové DNA Sangerovým sekvenováním.

Výsledky: Pacientka byla sledována od roku 2007, poprvé vyšetřena při zachytu prodlouženého APTT (poměr 1,88), kdy jí byl potvrzen LA. Hladiny faktorů VIII, IX, XI a XII byly při opakovaném vyšetření všechny sniženy, ale normalizovaly se s ředěním vzorku kromě faktoru XI, jehož hladina byla opakovaně velmi nízká (kolem 15 %). Pacientka nevykazovala krvácivou anamnézu a v rodinné anamnéze se vyskytovaly pouze epistaxe. Po došetření členů rodiny bylo zjištěno, že otec pacientky má deficit FXI s hladinou faktoru kolem 5 %, má vrozený deficit FXI, potvrzený dvěma heterozygotními mutacemi. S touto informací jsme vyšetřili pacientku na přítomnost rodinných mutací v genu pro FXI. Byla zjištěna pouze jediná mutace p.Thr150Met, která je podle mezinárodní databáze mutací F11 spojena v heterozygotní formě s asymptomatickým průběhem onemocnění a hladinou FXI 23–52 %. Na základě diskrepance v hladině FXI byl u pacientky vyšetřen inhibitor FXI. Titr inhibitoru byl stanoven na 8,6 B.U./ml.

Závěr: U pacientky jsme prokázali získaný inhibitor FXI a také mutaci v genu pro FXI, což vysvětluje velmi nízkou hladinu FXI. Vzhledem k současné přítomnosti přetrvávajících antifosfolipidových protilátek (LA normalizovaný poměr = 1,93) se pravděpodobně jedná o komplexní vliv specifických a nespecifických protilátek a vrozeného deficitu FXI. Případ je unikátní v tom, že navzdory hlubokému deficitu FXI a přítomnosti inhibitoru pacientka neměla žádné krvácivé projevy. Je možné, že současné prokoagulační působení LA tento deficit klinicky koriguje.

SOLUBILNÝ ENDOTELOVÝ RECEPTOR PRE PROTEÍN C A TROMBOEMBOLIZMUS

Ivanková J., Dobrotová M., Staško J.

Klinika hematológie a transfúziológie, Univerzitná nemocnica Martin

Národné centrum hemostázy a trombózy, Martin

Cieľ: Cieľom našej práce bolo zistiť koncentráciu solubilného endotelového receptora proteínu C (sEPCR) u pacientov, ktorí prekonalí venóznou alebo arteriálnu trombózu.

Úvod: Proteín C je dôležitý prirodzený inhibitor koagulácie, ktorý je aktivovaný na aktivovaný proteín C (APC) komplexom trombín-trombomodulín. Solubilný EPCR je transmembránový glykoproteín, ktorý cirkuluje v plazme v koncentrácii cca 100 ng/ml. sEPCR má schopnosť viazať proteín C, a tiež APC a tým inhibovať antikoagulačnú funkciu APC, lebo komplex sEPCR/APC sa nemôže viazať na fosfolipidy. Zvýšená koncentrácia sEPCR môže byť okrem iného podmienená aj prítomnosťou polymorfizmov v géne EPCR, čo podľa literárnych údajov môže viesť k zvýšenému riziku pre vznik HVT.

Súbor a metodika: sEPCR sme stanovili u 156 pacientov, 112 pacientov prekonal HVT/PE a 44 pacientov prekonal iCMP. Koncentráciu sEPCR sme stanovili aj u 55 zdravých kontrol. Plazmatickú koncentráciu sEPCR sme stanovili metódou ELISA podľa pokynov výrobcu, komerčným kitom Asserachrom sEPCR, Diagnostica Stago®, France.

Výsledky:

sEPCR (ng/ml)	n	priemer	SD	p
zdravé kontroly	55	121,8	48,8	
pacienti s iCMP	44	162,4	85,4	p < 0,05
pacienti s HVT/PE	112	173,4	124,8	p < 0,001
pacienti spolu	156	162,5	115,9	p < 0,001

Záver: U pacientov, ktorí prekonalí venóznym tromboembolizmus sme zistili štatisticky významné zvýšenie koncentrácie sEPCR. Vázba sEPCR na PC a APC pravdepodobne interferuje s antikoagulačnou funkciou APC a má za následok zvýšené riziko pre HVT.

SYNDRÓM LEPIVÝCH TROMBOCYTOV A TEHOTENSKÉ KOMPLIKÁCIE V NCHT KHaT JLF UK A UN MARTIN V ROKOCH 2004–2022

Lisá L., Dobrotová M., Sokol J., Hollý P., Plameňová I., Žolková J., Staško J.

Klinika hematológie a transfúziológie JLF UK a UN Martin, SR

Kľúčové slová: syndróm lepiivých doštičiek, aborty, kyselina acetylsalicylová.

Gravidita je fyziologický trombofilný stav, ktorý ženu chráni pred nadmerným krvácaním počas pôrodu. Na druhej strane so sebou prináša zvýšené riziko trombózy predovšetkým u žien s vrodenou trombofiliou. Syndróm lepiivých doštičiek (SPS) sa môže prejavíť práve v období tehotnosti, či už tepnovými, alebo žilovými trombózami, ale často aj rôznymi tehotenskými komplikáciami, ako sú opakované včasné aborty, neskoré aborty, predčasný pôrod či pôrod mŕtveho plodu.

Cieľom našej práce bolo zistiť výskyt uvedených komplikácií u pacientiek s potvrdenou diagnózou SPS, ako aj zhodnotiť možnú súvislosť a význam vyšetrenia SPS v súbore pacientiek s opakovanými komplikáciami v tehotnosti.

Súbor tvorilo 160 pacientiek, ktoré boli vyšetrené v NCHT KHaT JLF UK a UN Martin v rokoch 2004–2022. Po odobratí anamnestických údajov bol u nich realizovaný trombofilný skrining vrátane agregometrie za účelom stanovenia diagnózy SPS. Agregometria bola realizovaná pomocou agregometra PACKS-4 a neskôr AggRAM (Helena Laboratories, USA) metódou podľa Mammena a diagnóza SPS bola určená podľa diagnostických kritérií Mammena a Bicka. Medián veku v súbore bol 33 rokov.

Typ I SPS bol diagnostikovaný v 60 prípadoch (37 %), typ II u 99 žien (62 %) a typ III sme potvrdili len u 1 pacientky (1 %). V našom súbore sme 134-krát zaznamenali včasný potrat (do 12. týždňa gravidity), u 36 pacientiek bol v anamnéze prítomný aspoň 1 neskorý abort (po 12. týždni gravidity), 11-krát išlo o mŕtvy plod a 13-krát sa vyskytol predčasný pôrod. V šiestich prípadoch sme v osobnej anamnéze zistili zlyhanie embryotransferu po IVF. U jednej pacientky išlo o primárnu sterilitu, avšak pacientka mala pozitívnu rodinnú anamnézu trombózy. Počet včasných potratov sa pohyboval medzi 1 až 6. Vo vyšetrovanom súbore 160 pacientiek sa tepnová či žilová trombóza vyskytla len u štyroch, čo predstavuje 2,5 %. 153 pacientiek (95,67 %) bolo nastavených na liečbu kyselinou acetylsalicylovou prevažne v dávke 100 mg denne. Len v 17 prípadoch bol identifikovaný pridružený trombofilný stav. Celkovo 85 (53,13 %) pacientiek malo pozitívnu rodinnú anamnézu tepnových a žilových tromboembolických príhod. Minimálne u 76 (47,5 %) pacientiek po stanovení diagnózy SPS a zahájení liečby prebiehala ďalšia gravidita bez výraznejších komplikácií.

VRODENÝ DEFICIT FXIII – LABORÁTORNA DIAGNOSTIKA

*Mešová P., Furindová K., Nahálková I., Škorňová I., Žolková J.,
Plameňová I., Staško J.*

*Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie,
Univerzitná nemocnica Martin*

Úvod: Koagulačný faktor XIII (FXIII), inak nazývaný aj fibrín stabilizujúci faktor, je posledným členom koagulačnej kaskády, kde má dôležitú úlohu v stabilizácii fibrínovej zátky. Vrodený deficit FXIII je veľmi zriedkavé ochorenie s automálne recesívnym typom dedičnosti. Pri jeho nedostatku vzniká koagulum, ktoré nie je dostatočne pevné a rýchlo podlieha fibrinolýze. Pacienti s týmto ochorením trpia vážnymi krváčovými prejavmi už od narodenia, t.j. krvácanie z pupočníka, spontánne aborty, krvácanie do mozgu. Typické je oneskorené krvácanie a zlé hojenie rán. Príčinou vzniku sú najčastejšie mutácie v *13A1* gène. Klinicky významný je pokles FXIII pod 3 %, čo vzhľadom na typ dedičnosti zahŕňa pacientov s homozygotnou formou ale aj zmiešaných heterozygotov.

Cieľ: Cieľom práce je prezentovať naše skúsenosti s laboratórnou diagnostikou vrodeného nedostatku FXIII u 3 pacientov a ich rodičov.

Metódy: V prvom kroku boli pacientom realizované rutinné koagulačné testy – PT, APTT, TT, Fbg (ACL TOP 550, Beckman Coulter, USA). Kvalitatívne stanovenie FXIII sme hodnotili testom rozpustnosti koagula v 5M močovine. Na stanovenie antigénu A podjednotky FXIII sme použili latexovú imunoassay FXIII antigen (HemosIL, Werfen, Taliansko). Funkčnú aktivitu FXIII sme stanovili použitím kitu Berichrom FXIII (Siemens, Nemecko).

Výsledky: V rámci laboratórnej diagnostiky sme u 3 pacientov s krváčovými prejavmi realizovali základné koagulačné vyšetrenia a krvný obraz so zameraním na počet trombocytov, ktoré boli v rozsahu referenčných hodnôt. Pre podozrenie na vrodený nedostatok FXIII sme realizovali špecifické testy. U všetkých pacientov sme pozorovali výrazné znížené hodnoty funkčnej aktivity FXIII – pacient č. 1: 15,5 %, pacient č. 2: 10,1 %, pacient č. 3: 9,3 % a rodičia sa nachádzali na spodnej hranici normy (70–140 %). Výrazne znížené boli aj hodnoty antigénu A podjednotky FXIII – pacient č. 1: < 1 %, pacient č. 2: 1,4 %, pacient č. 3: 2,7 %. Kvalitatívne stanovenie FXIII sme hodnotili testom rozpustnosti koagula v 5M močovine. Fibrín stabilizovaný FXIII je v močovine nerozpustný. V prípade nedostatku FXIII sa rozpúšťa koagulum v močovine v čase kratšom ako 48 hodín, podobne ako v prípade našich pacientov – pacient č. 1 za 2 hodiny, pacient č. 2 za 1 hodinu, rodičia viac ako 48 hodín. Na našom pracovisku sa realizovalo aj genetické testovanie na prítomnosť mutácií v génoch pre FXIII, ktoré potvrdilo vrodený nedostatok FXIII na molekulárnej úrovni.

Záver: Pri nedostatku FXIII sú základné koagulačné testy v norme, preto je potrebné realizovať priamo špecifické testy. Genetické testovanie môže pomôcť odhaliť príčinu vzniku ochorenia na molekulárnej úrovni. Znížené hodnoty funkčnej aktivity aj antigénu FXIII u našich pacientov potvrdili deficit FXIII. Prítomnosť mutácie v géne pre FXIII indikovala, že sa jedná o vrodený deficit FXIII.

FUNKČNÝ TEST STANOVENIA HIT PRIETOKOVOU CYTOMETRIOU

Nahálková I., Škorňová I., Furindová K., Vážanová A., Staško J.

Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfúziológie

JLF UK a UNM, Martin

NÚSCH, a.s. Bratislava

Úvod: Heparínom indukovaná trombocytopénia (HIT) je stav vyvolaný protilátkami proti komplexu heparín/PF4 pri liečbe heparínom. Spôsobuje trombocytopéniu a niekedy aj arteriálnu alebo žilovú trombózu. Heparín sa patofyziologicky viaže na trombocyty, pričom sa z a granúl trombocytu uvoľňuje PF4. Na povrchu trombocytu sa tvorí komplex heparín/PF4, ktorý vyvoláva u niektorých jedincov tvorbu špecifických protilátok (najčastejšie IgG) s následnou aktiváciou trombocytov, ktoré uvoľňujú zložky s prokoagulačnou aktivitou. Prevalencia je približne 0,5–5 % heparinizovaných pacientov.

Laboratórna diagnostika HIT zvyčajne prebieha v dvoch krokoch. Prvým krokom je dôkaz prítomnosti protilátok proti komplexu heparín-PF4, niektorým z imunologických testov a následne pri pozitívite testu (t.j. dôkaze prítomnosti protilátok) nasleduje potvrdenie alebo vylúčenie HIT funkčným testom, ktorého úlohou je dôkaz schopnosti prítomných protilátok aktivovať trombocyty. Definitívne je možné stanoviť diagnózu HIT až pri pozitívnom výsledku funkčného testu, pričom existuje značná skupina pacientov (najmä po kardiochirurgickom výkone), ktorí majú prítomné protilátky (pozitívita v imunologických testoch), ale funkčný test majú negatívny a teda HIT nemajú.

Cieľ: Cieľom práce bolo poukázať na výhody, úskalia a možnosti aplikácie funkčného testu HIT Alert pomocou prietokovej cytometrie.

Metóda: Kontrolné vzorky zdravých darcov boli odobraté do citrónanu sodného s koncentráciou 0,109 mol/l.

Vzorky pacientov boli odobraté do skúmavky bez protizrážavého činidla. Analyzovali sme séru pacientov s podozrením HIT, pomocou imunologického testu ID-PaGIA Heparin/PF4 (particle gel immunoassay). U vzoriek s pozitívnym výsledkom bolo sérum analyzované pomocou prietokovej cytometrie funkčným certifikovaným testom – kitom HITAlert.

Výsledky: Analýzou 93 vzoriek pacientov s podozrením HIT imunologickým testom ID-PaGIA Heparin/PF4 sme dostali 71 pozitívnych výsledkov, 7 negatívnych výsledkov a 15 vzoriek +/- . Ďalším testovaním týchto vzoriek prietokovou cytometriou-kitom HITAlert- malo 27 vzoriek pozitívny a 65 vzoriek negatívny výsledok a jedna vzorka mala nejednoznačný výsledok.

Záver: Určenie prítomnosti protilátok spôsobujúcich HIT je nevyhnutné, ale nie dostatočné na diagnostiku HIT. Výsledky funkčného testu HIT v analyzovanom

súbore podávajú kvalitatívny a spoľahlivý údaj na určenie prítomnosti protilátok špecifických pre komplex heparín/PF4, avšak nie vždy stopercentný. Včasné a presné výsledky imunologického testu, funkčného testu spolu s klinickým nálezom a stanovením 4Ts skóre môžu významne zlepšiť prognózu ochorenia. Na základe našich doterajších skúseností aplikáciou funkčného testu stanovenia HIT pomocou prietokovej cytometrie môžeme povedať, že metóda má svoje výhody (funkčný, relatívne krátky čas analýzy, nerádioaktívny) i úskalia (vyžaduje špecializované pracoviská s odbornou znalosťou a prístrojovým vybavením prietokovej cytometrie).

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená projektami APVV-16-0020, Vega 1/0168/16, Vega 1/0187/17 a Centra excelentnosti pre perinatologický výskum (CEPV II, ITMS 26220120036) a centra pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET).

SROVNÁNÍ INDUKOVANÉ AGREGACE TROMBOCYTŮ STANOVENÉ SYSTÉMEM ATELICA COAG 360 A AGREGOMETREM APACT 4004

Pilnáčková M., Dytrychová V., Kieslichová S., Fátorová I.

FN Hradec Králové, IV. interní hematologická klinika – laboratoř

Systém Atellica COAG 360 výrobce firmy Siemens je plně automatizovaný koagulační analyzátor, který na jedné platformě sjednocuje pět metodik. Do této kombinace je vedle koagulační, chromogenní, imunologické a vysoce citlivé imunochemické LOCI metodiky zařazena také agregace krevních destiček.

Přístroj Atellica umožňuje automatizované vyšetření funkce trombocytů na principu optické transmisní agregometrie (LTA) podle Borna v citrátové plazmě bohaté na destičky (PRP) po stimulaci induktorem agregace. Preanalytická kontrola vzorků přístrojem, tzn. kontrola naplnění primární zkumavky a kontrola tzv. HIL (hemolýza, ikterita, lipémie), minimalizuje procento chyb a opakované testování. Výkon přístroje v profilu „agregace“ je 29 PRP vzorků za 1 hodinu.

Cílem naší studie bylo porovnat výsledky vyšetření indukované agregace krevních destiček (AG) získané na přístroji Atellica COAG 360 s hodnotami naměřenými na poloautomatickém optickém agregometru Apact 4004 výrobce fy LABiTec. Studie byla provedena při testování systému Atellica na našem pracovišti. Vyšetřeno bylo 36 zdravých, neléčených dobrovolných dárců, mužů a žen ve věku nad 18 let. Měření probíhalo paralelně na obou porovnávaných přístrojích bez časových prodlev. Použité induktory agregace byly shodné, a to ADP, kyselina arachidonová (ArA), epinefrin, kolagen a ristocetin (2 koncentrační hladiny). Koncentrace jednotlivých induktorů se lišila podle daného přístroje. U systému Atellica jsou finální koncentrace všech induktorů nižší v porovnání s Apactem 4004. Porovnávaným parametrem byla hodnota max. agregace (%).

Výsledky měření byly statisticky vyhodnoceny pomocí shody ve vybraných percentilech. Stanoven byl 2,5. percentil a 97,5. percentil a také 5. percentil a 95. percentil. Zjistili jsme, že stanovené hodnoty percentilů u porovnávaných testů po stimulaci ADP, ArA a epinefrinu se shodují a leží u naší kohorty zdravých dárců ve fyziologických mezích. U testů indukovaných kolagenem a ristocetinem jsou hodnoty percentilů u systému Atellica nižší, ale nachází se taktéž v oblasti fyziologického rozmezí. Pro ověření významu zjištěných rozdílů zejména pro hodnoty v oblasti spodní hranice fyziologických mezí a míru zatížení případné chyby v měření by bylo vhodné vyšetřit větší soubor vzorků s hodnotami AG v oblasti normálních a také patologických hodnot.

Závěrem můžeme říci, že výsledky AG souboru zdravých dárců naměřené plně automatizovaným systémem Atellica jsou po stimulaci ADP, ArA a epinefrinem srovnatelné s hodnotami získanými na poloautomatickém agregometru Apact 4004.

Podpořeno programem MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906).

ANALÝZA MULTIMÉROV VWF SYSTÉMOM HYDRASYS 2 SCAN

Škorňová I., Hollý P., Šimurda T., Steranková M., Staško J.

*Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfúziológie
JLF UK a UNM, Martin*

Kľúčové slová: von Willebrandov faktor (VWF), multiméry.

Úvod: Von Willebrandov faktor (VWF) je multimerický proteín, ktorý plní dve kľúčové funkcie v hemostáze. Podieľa sa na interakcii medzi doštičkami a subendotelom v mieste cievneho poškodenia a interakcii medzi doštičkami navzájom. VWF tvorí komplex s faktorom VIII v pomere (1:1), čím ho chráni pred proteolýzou aktivovaným proteínom C.

Adhezívna aktivita VWF závisí od veľkosti jeho multimérov, ktoré sa pohybujú od 500 do viac ako 10 000 kDa. Klinicky významné a najúčinnnejšie pri interakcii s kolagénom a trombocytárnymi receptormi sú multiméry s vysokou molekulovou hmotnosťou (HMW), ktoré majú 5000–10000 kDa.

Cieľ: Cieľom práce bolo poskytnúť možnosť využitia analýzy multimérov von Willebrandovho faktora pomocou systému Hydrasys 2 scan.

Metóda: Poloautomatický prístroj Hydrasys 2 scan (Sebia, Lisses, Francúzsko) s použitím testu „Hydragel 5 von Willebrand Factor Multimer“ je určený na analýzu distribúcie multimérov VWF v ľudskej plazme pomocou elektroforézy s použitím vopred pripravených 2% agarózových gélov, priamej imunofixácie, vizualizácie s protilátkou značenou peroxidázou. Farebné gély s multimérmí z prístroja Hydrasys 2 scan sme vizuálne skontrolovali a naskenovali pomocou softvéru Phoresis 8.63. Denzitometrický graf každej vzorky sme kvalitatívne a aj kvantitatívne vyhodnotili v porovnaní s kontrolnou vzorkou získanou na rovnakom géle.

Výsledky: Sledovaný súbor tvorilo 75 vzoriek s požiadavkou vyšetrenia multimérov VWF. Analýzou multimérov VWF ako doplnujúcim vyšetrením sme u 58 pacientov potvrdili VWCH, u 2 pacientov získaný syndróm VWCH (pričom u jedného bol analýzou multimérov VWF potvrdený Heydeho syndróm), 10 pacientov tvorilo bližšie neklasifikovanú skupinu s VWCH, u 2 pacientov sme potvrdili trombotickú trombocytopenickú purpuru (TTP, s potvrdením ultra large multimérov) a u 3 pacientov sa nepotvrdila VWCH.

Na základe klinických prejavov a diagnostických výsledkov vrátane analýzy multimérov VWF sme pacientov zatriedili postupne do jednotlivých typov VWCH. V sledovanom súbore 58 pacientov s VWCH nám tvorilo 38 pacientov (66 %) s VWCH typ 1, 3 pacienti (5 %) s VWCH typ 2 (1 pacient VWCH typ 2N a dvaja pacienti VWCH typ 2A) a 4 pacienti (7 %) s VWCH typ 3; 3 pacienti (5 %) mali zmiešaný typ 1/2A VWCH a 10 pacientov (17 %) tvorilo bližšie neklasifikovanú skupinu.

Záver: Analýza multimérov VWF sa môže uplatniť u pacientov na určenie typu VWCH, určenie patomechanizmu, resp. zmeny niektorého procesu v metabolizme VWF, zhodnotenie prítomnosti multimérov VWF s HMW v koncentrátoch koagulačného faktora VIII s VWF a v koncentrácii VWF, a tiež pri monitorovaní liečebnej odpovede.

Táto metóda pomocou systému Hydrasys scan 2 je pre nás prínosom nielen v diagnostike VWCH, ale aj pri získanom von Willebrandovom syndróme i trombotickej trombocytopenickej purpury. Zlatým štandardom laboratórnej diagnostiky u pacientov s Heydeho syndrómom je práve uvedená gélová elektroforéza, vďaka ktorej sme v deň dodania vzorky potvrdili chýbajúce multiméry s vysokou molekulovou hmotnosťou (HMW multiméry). Prínosom a hlavnými výhodami analýzy poloautomatickým analyzátorom Hydrasys 2 scan v porovnaní s manuálnou analýzou je hlavne to, že ide o štandardizovanú metódu s reprodukovateľnými výsledkami, roztoky a gély sú vopred pripravené a výsledky sú interpretovateľné už v deň analýzy a môžu byť poskytnuté a nápomocné pre lekára a pre ďalší manažment liečby pacienta. Obmedzením metódy analyzátorom Hydrasys 2 scan je nemožnosť laboratórneho rozlíšenia podtypov VWCH typu 2A (IIA, IIE, IIC, IID) na úrovni tripletnej štruktúry jednotlivých multimérov a vyžaduje špecializované pracovisko s odbornou znalosťou a prístrojovým vybavením.

Podakovanie: Táto práca bola podporená projektami APVV – 16-0020, Vega 1/0168/16, Vega 1/0187/17 a Centra excelentnosti pre perinatologický výskum (CEPV II, ITMS 26220120036) a Centra excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET).

VPLYV VÝSLEDKOV MONITORINGU ZMIEN HEMOSTÁZY NA SEKUNDÁRNU ANTIKOAGULAČNÚ TROMBOPROFYLAXIU V TEHOTNOSTI

**Stančiaková L.¹, Dobrotová M.¹, Hollý P.¹, Žolková J.¹, Vadelová L.^{1,2},
Škorňová I.¹, Ivanková J.¹, Brunclíková M.¹, Jedináková Z.^{1,3}, Grendár M.^{4,5},
Kubisz P.¹, Staško J.¹**

¹Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie,
Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzitná nemocnica Martin, Martin, SR

²Martinské centrum imunológie, s.r.o., Martin, SR

³Centrum hemostázy a trombózy – Unilabs Slovensko, s. r. o., Martin, SR

⁴Laboratórium bioinformatiky a bioštatistiky, Martinské centrum pre biomedicínu
(Biomed Martin), Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska
fakulta v Martine, Martin, SR

⁵Oddelenie teoretických metód, Ústav merania, Slovenská akadémia vied,
Karlova Ves, SR

Úvod: V priebehu tehotnosti dochádza k rozvoju hyperkoagulability, ktorá by mala v konečnom dôsledku zabrániť nadmernému krvácaniu počas pôrodu. Heparín s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMWH) je odporúčaný v sekundárnej trombo-profylaxii u tehotných žien s anamnézou venózneho tromboembolizmu (VTE). Avšak existuje len niekoľko štúdií zameraných na výskum vplyvu LMWH na parametre hemostázy počas tehotnosti u pacientok s predchádzajúcou epizódou VTE nastavených na tromboprofylaxiu.

Ciele: Autori predstavujú výsledky prospektívnej a longitudinálnej štúdie zmien hemostázy u rizikových tehotných žien s anamnézou VTE.

Metódy: Odbery krvi boli realizované počas tehotnosti (T1-T4 v období 10.–12., 16.–18., 26.–28. a 35.–36. gestačného týždňa) a jedenkrát po šiestonedeľí (T5). Výsledky aktivity koagulačného faktora VIII (FVIII), funkcie proteínu S (PS), testu ProC Global a anti-Xa aktivity boli následne porovnané s kontrolnou skupinou zdravých netehotných žien.

Výsledky: Napriek sekundárnej tromboprofylaxii sme v testovanej skupine pacientok pozorovali signifikantný vzostup aktivity FVIII medzi T1 a T5 (p 0,0003), T3 a T5 (p 0,0007) a pri porovnaní odberov v čase T4 a T5 (p < 0,0001). Súčasne došlo k poklesu funkcie PS (T2-T5 vs. kontrolná skupina, p hodnota < 0,0001), ktorý sa podobne ako hodnota ProC Global testu nenormalizoval po šiestonedeľí – p < 0,0001 pri porovnaní kontrolnej skupiny a rizikových tehotných žien v intervale odberu krvi T5.

Záver: Pravidelné testovanie účinnosti LMWH v zmysle rutinného monitoringu anti-Xa aktivity s úpravou dávky LMWH nie je odporúčané. Naše výsledky naznačujú, že hemostáza nemusí byť úplne upravená 6–8 týždňov po pôrode.

Pod'akovanie: *Autori ďakujú podpore projektov Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-16-0020 a Vedeckej grantovej agentúry Vega 1/0549/19.*

ROTAČNÁ TROMBELASTOMETRIA V SEKUNDÁRNEJ TROMBOPROFYLAXII V TEHOTNOSTI

*Stančiaková L.¹, Dobrotová M.¹, Hollý P.¹, Žolková J.¹, Vadelová L.^{1,2},
Škorňová I.¹, Ivanková J.¹, Brunclíková M.¹, Grendár M.^{3,4}, Danko J.⁵,
Kubisz P.¹, Staško J.¹*

¹Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie,
Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzitná nemocnica Martin, Martin, SR

²Martinské centrum imunológie, s.r.o., Martin, SR

³Laboratórium bioinformatiky a bioštatistiky, Martinské centrum pre biomedicínu
(Biomed Martin), Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Martin, SR

⁴Oddelenie teoretických metód, Ústav merania, Slovenská akadémia vied,
Karlova Ves, SR

⁵Gynekologicko-pôrodná klinika, Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzitná nemocnica Martin,
Martin, SR

Úvod: U tehotných žien s anamnézou venózneho tromboembolizmu (VTE) je odporúčaná antikoagulačná tromboprofylaxia s použitím heparínu s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMWH). Avšak množstvo štúdií zameraných na použitie metódy rotačnej trombelastometrie (ROTEM®) v tejto skupine pacientok je limitované.

Ciele: Autori prezentujú výsledky prospektívnej longitudinálnej štúdie zmien hemostázy s využitím metódy (ROTEM®) u rizikových tehotných pacientok po prekonaní VTE.

Metódy: Vzorky krvi boli brané v nasledujúcich časových intervaloch: T1 počas 10.–12. týždňa tehotnosti, T2 v období 16.–18. gestačného týždňa, T3 medzi 26.–28. týždňom tehotnosti, T4 v období 35. –36. gestačného týždňa a T5 medzi 6.–8. týždňom po pôrode.

Výsledky času zrážania (CT), času tvorby trombu (CFT), uhla alfa (AA) a maximálnej pevnosti trombu (MCF) boli porovnávané medzi T1–T4 a T5, keď možno predpokladať, že uvedené parametre budú normalizované. Autori tiež porovnali výsledky s údajmi z kontrolnej skupiny.

Výsledky: Autori pozorovali skrátenie CFT v EXTEM teste (p 0,0007 od 26. gestačného týždňa v porovnaní s kontrolnou skupinou a v INTEM teste (p 0,002 od 35. týždňa tehotnosti), vzostup AA v EXTEM, INTEM a HEPTEM teste a perzistentný vzostup MCF vo všetkých spomínaných testoch. Podľa výsledkov bola následne individuálne upravovaná dávka LMWH.

Záver: Dokonca aj po šestonedeli bola hodnota AA v EXTEM teste strmšia v porovnaní s kontrolnou skupinou pri porovnaní s kontrolnou skupinou (p 0,0007). Toto by mohlo naznačovať, že hemostáza nie je úplne normalizovaná ani po 6–8 týždňoch po pôrode.

ROTEM sa zdá byť užitočnou metódou na individuálne posúdenie ukončenia sekundárnej antikoagulačnej tromboprofylaxie.

PodĎakovanie: Autori ďakujú podpore projektov Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-I6-0020 a Vedeckej grantovej agentúry Vega 1/0549/19.

DEFICIT ANTITROMBÍNU III – KAZUISTIKA

Stančiaková L., Hollý P., Škorňová I., Ivanková J., Kubisz P., Staško J.

Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie,

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine,

Univerzitná nemocnica Martin, Martin, SR

Úvod: Antitrombín III ako predstaviteľ prirodzených antikoagulancií pôsobí ako inhibítor trombínu a aktivovaných foriem koagulačných faktorov IX, X, XI, XII, kalikreínu a plazmínu. Deficit antitrombínu vedie k 3–7-násobne zvýšenému riziku venózneho tromboembolizmu (VTE) v porovnaní s inými trombofilnými stavmi. Tento klinický nález môže byť vrodený alebo získaný. Vrodený deficit antitrombínu je raritný trombofilný stav vrodený autozómovo dominantným spôsobom.

Ciele: Autori predstavujú kazuistiku 75-ročného pacienta s manažmentom opakovaných trombotických komplikácií a deficitom antitrombínu.

Kazuistika: U diskutovaného pacienta sa napriek antikoagulačnej liečbe vrátane nefrakcionovaného heparínu (UFH), heparínu s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMWH) a priamych perorálnych antikoagulancií opakovane vyvinuli tromboembolické komplikácie.

Záver: Deficit antitrombínu je vysokorizikový trombofilný stav so zriedkavou prevalenciou.

Napriek plnej antikoagulačnej liečbe sa môže vyvinúť opakovaná tromboembolická epizóda so závažnými následkami. Preto títo pacienti vyžadujú intenzívny monitoring účinnosti antikoagulačnej liečby.

Podakovanie: Autori ďakujú podpore projektov Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-16-0020 a Vedeckej grantovej agentúry Vega 1/0549/19.

PRÍNOS ROTAČNEJ TROMBELASTOMETRIE V PERIOPERAČNOM MANAŽMENTE PACIENTOV S VRODENOU KOAGULOPATIOU

*Steranková M.¹, Šimurda T.¹, Dobrotová M.¹, Žolková J.¹, Škorňová I.¹,
Brunclíková M.¹, Staško J.¹, Cibula Z.², Nečas L.²*

*¹Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie,
Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta
a Univerzitná nemocnica v Martine*

*²Klinika ortopédie, Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta a Univerzitná nemocnica v Martine*

Úvod: Ťažká kĺbová degenerácia (atrofia) je častou komplikáciou u pacientov s vrodeným krvávacým ochorením, kvôli ktorej musia podstúpiť ortopedickú operáciu. Rotačná tromboelastometria (ROTEM) umožňuje u týchto pacientov efektívne sledovať hemostatickú liečbu s možnosťou špecifického liečebného zásahu.

Materiál a metodika: Referujeme o perioperačnom manažmente u 21 a 22ročných pacientov s von Willebrandovou chorobou typu 3 (vWCH) a ťažkou hemofiliou A (HemA) pri artrodéze členka. V perioperačnom manažmente boli použité štandardné laboratórne testy a terapia riadená ROTEM.

Výsledky: Pacientovi s vWCH bolo predoperačne podaných 30 IU/kg koncentráty FVIII/vWF. Bazálne hodnoty pred substitúciou boli: FVIII: 34 %, aktivita vWF: 16 %, antigén vWF: 30 %, aPTT: 32,4 s a čas zrážania (CT) INTEM: 178 s. Po operácii sa tieto hladiny normalizovali: FVIII: 103,5 %, aktivita vWF: 84 %, antigén VWF: 138 % a aPTT: 29,2 s. Počas prvých 48 hodín po operácii sa pacientovi podávalo 20 IU/kg FVIII/vWF každých 8 hodín. Pacient bol prepustený domov po 96 hodinách s aPTT 26,8 s a kontrolným CT INTEM 148 s. Pacientovi s ťažkou HemA bol predoperačne podaný rFVIII 50 IU/kg. Po operácii bola hladina FVIII 78 % a CT INTEM bolo 255 s. Počas prvých 24 hodín po operácii bol pacientovi podávaný rFVIII 30 IU/kg každých 8 hodín. Hladina FVIII bola udržiavaná na 89 ± 1 % a CT INTEM 200 ± 5 s. V prvý a druhý pooperačný deň sa dávka rFVIII navýšila na 35 IU/kg každých 12 hodín. Úroveň FVIII dosiahla 76–66 % a CT INTEM 174–181s. Na základe CT INTEM a hladiny FVIII sa dávka rFVIII znížila na 20 IU/kg každých 12 hodín. Na 7. pooperačný deň bol pacient prepustený domov s hladinou FVIII 52 % a CT INTEM 82s. U oboch týchto pacientov neboli perioperačne pozorované krvácavé a naopak ani trombembolické komplikácie.

Záver: Kombinácia štandardného koagulačného vyšetrenia a ROTEM predstavuje adekvátnu metódu pre návrh perioperačného manažmentu a predikciu krvácania u pacientov s vrodenými krvávacými ochoreniami.

Táto práca bola podporená projektami Vega 1/0436/21, Vega 1/0479/21, Agentúra na podporu výskumu a vývoja APVV-16-0020.

DISTRIBUČNÁ ŠÍRKA MONOCYTOV – VČASNÝ MARKER SEPSY

Urdžíková I., Škorňová I., Staško J.

Klinika hematológie a transfúziológie, Univerzitná nemocnica Martin

Kľúčové slová: monocyty, sepsa, indikátor.

Úvod: Sepsa predstavuje v medicíne závažný problém s vysokou mortalitou. Je to život ohrozujúce zlyhávanie orgánov, spôsobené neadekvátnou reakciou organizmu na infekciu. Diagnostika sepsy je náročná, keďže symptómy sú nezreteľné, variabilné a málo špecifické. Z tohto dôvodu sa liečba môže oddaľovať a finančne zvyšovať. S rýchlo rozvíjajúcim sa odborom *in vitro* diagnostiky pribúda množstvo biomarkerov, ktoré slúžia k včasnej diagnostike sepsy. Takýmto biomarkerom je aj distribučná šírka monocytov (MDW – monocyte distribution width), ktorá vypovedá o morfologickej variabilite monocytov. Zmena v MDW je zachytená meraním rozptylu a objemu monocytov. Tento parameter rýchlo reaguje na vstup antigénu do organizmu.

Cieľ: Cieľom nášho pozorovania bolo využitie ukazovateľa sepsy (MDW) u pacientov na klinike anestéziológie a intenzívnej medicíny. Nameraná hodnota MDW bola poskytnutá lekárom ako doplnkový parameter v rámci diagnostiky sepsy.

Metódy a výsledky: Ako súčasť rutinného vyšetrenia krvného obrazu s päťpopulačným diferenciálnym rozpočtom leukocytov sme vyšetrovali aj distribučnú šírku monocytov. Diskriminačná hodnota (cut-off) bola určená na základe výsledkov merania 50 vzoriek od zdravých darcov vo veku od 18–60 rokov a bola stanovená na 20,0. Táto cut-off hodnota je v súlade s hodnotou získanou v štúdií* pre dospelú populáciu, na ktorú sa odvoláva aj výrobca v príručke pre používateľa k MDW**. Vzorky boli odobrané do K2 EDTA a merali sa do 2 hodín po venepunkcii. Na meranie sa používal hematologický analyzátor DxH 900 (Beckman Coulter, USA), ktorý charakterizuje bunky v takmer natívnom stave pomocou merania objemu, konduktivity a rozptylu laserového svetla. Týmto spôsobom je možné merať aj veľmi malé zmeny v morfológii buniek. Ak analyzátor nameral hodnotu MDW > 20,0, upozornil na to laborantku zadržaním výsledku. Následne laborantka k výsledku doplnila informáciu, že výsledok MDW > 20,0 môže súvisieť s vyšším rizikom sepsy. Hodnota MDW < 20,0 je spojená s nižším rizikom sepsy.

Záver: Pri diagnostike sepsy je rýchlosť kľúčovým faktorom, čo nám hodnota MDW poskytuje. Poskytnutý parameter je významne nápomocný pri včasnej diagnostike sepsy a následne pre jej liečbu. Sepsa sa laboratórne potvrdzuje aj ďalšími biochemickými markermi ako prokalcitonín, laktát, CRP a mikrobiologickým vyšetrením. Naším cieľom je poskytovať tento parameter hlavne oddeleniu urgentného príjmu, kde by mohol významne pomôcť v diagnostike a manažmente liečby pacienta.

*klinická štúdia zahŕňajúca celkovo 2158 vzoriek od zdravých darcov vykonaná na pohotovostných oddeleniach v USA; ** UniCel DxH 900 Series With System Manager Software Coulter Cellular Analysis System, Early Sepsis Indikator Application Addendum 2020 (Beckman Coulter)

POROVNÁNÍ POČTU NEZRALÝCH GRANULOCYTŮ STANOVENÝCH POMOCÍ HEMATOLOGICKÉHO ANALYZÁTORU SYSMEX XN, DÁLE POMOCÍ DIGITÁLNÍ MORFOLOGIE SYSMEX DI-60 S MIKROSKOPICKÝM VYŠETŘENÍM

Výtisková S.¹, Lacková M.², Klinerová J.¹, Bourková L.¹, Penka M.¹

¹*Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno*

²*Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno*

Promyelocyty, myelocyty a metamyelocyty jsou nezralé formy granulocytů (IG). Při vybraných patologických stavech opouští prostředí kostní dřeně a vyplavují se do periferní cirkulace. Tato studie se zabývá porovnáním relativního počtu nezralých granulocytů (IG%) stanovených pomocí hematologického analyzátoru Sysmex XN, dále pomocí digitální morfologie Sysmex DI-60 s mikroskopickým vyšetřením.

	Analytická metoda	Provedení
1	Vyšetření pomocí analyzátoru Sysmex XN-3100	Plně automatizované
2	Vyšetření pomocí digitální morfologie Sysmex DI-60	Poloautomatizované
3	Vyšetření pomocí světelného mikroskopu	Manuální

K analýze byl použit soubor 103 patientských vzorků (82 vzorků, u nichž analyzátor Sysmex XN-3100 vydal příznak IG Present, tj. IG% > 1,9 % a 21 vzorků, u nichž analyzátor Sysmex XN-3100 nehlásil příznak IG Present, tj. IG% < 1,9 %). Pro porovnání 3 různých metod vyšetření IG% byla provedena párová analýza dat pro každou dvojici metod. Shapiro-Wilkův test pro normální distribuci dat vykázal velmi významnou odchylku od normality (p-hodnota <0,0001) ve všech 3 souborech dat. Proto byly pro následnou analýzu dat použity pouze neparametrické testy: Passing-Bablokova regrese, Bland-Altmanův graf a Mountain Plot.

Následná statistická analýza dat odhalila, že počet IG% na analyzátoru Sysmex XN-3100 byl systematicky vyšší než počet IG% naměřený pomocí digitální morfologie DI-60 nebo manuální mikroskopie. Rozdíl byl nejvýraznější v počtu IG ≥ 10 % na analyzátoru Sysmex XN-3100. V případě dysplazie napříč subpopulacemi leukocytů vydával hematologický analyzátor Sysmex XN-3100 nespolehlivé výsledky označené hvězdičkou. Použití výhradně automatizovaných metod je v takových

průměrný Δ IG%/ vzorky	Δ (Sysmex XN-3100 a Sysmex DI-60)	Δ (Sysmex XN-3100 a mikroskopie)	Δ (DI-60 a mikroskopie)
všechny vzorky (103)	4,65 pp	4,94 pp	0,30 pp
vzorky s IG% Sysmex XN-3100 ≥ 10 % (37)	7,73 pp	8,08 pp	0,35 pp
jen vzorky validní IG% Sysmex XN-3100 (41)	2,24 pp	2,24 pp	0,004 pp

případech nedostatečné. Digitální morfologie DI-60 a manuální mikroskopický diferenciál leukocytů nevykazovaly významné rozdíly v počtu IG%.

Analýzátor Sysmex XN-3100 se ukázal jako nejvhodnější a rychlá metoda pro analýzu vzorků s fyziologickou morfologií leukocytů a nezralých granulocytů. Digitální morfologie DI-60 nevykazovala významné odchylky od mikroskopického hodnocení a její výhodou je částečná automatizace procesu, nevýhodou pak neschopnost dosáhnout vždy požadovaného množství 100 hodnocených buněk, a to i u vzorků s leukocytózou. Mikroskopická analýza by měla být vždy upřednostňována u vzorků s dysplastickými formami leukocytů a nezralých granulocytů.

**XXVIII. ČESKO - SLOVENSKÁ KONFERENCE
O TROMBÓZE A HEMOSTÁZE
&
XX. ČESKO - SLOVENSKÁ KONFERENCE
LABORATORNÍ HEMATOLOGIE**

SBORNÍK ABSRAKT

Vydavatel: HANZO Production, Piletická 486, Hradec Králové,
tel./fax +420 493 814 037

Grafická úprava: Jiří Procházka, Hradec Králové

1. vydání