

## LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

### **P47/2925. LABORATOŘ TESTŮ SLUČITELNOSTI JAKO SOUČÁST REGIONÁLNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘE**

**Bořutová N., Přidalová J., Holusková I., Galuszková D.** (Transfuzní oddělení FN, Olomouc)

Úvod: Příprava transfuze pro pacienty podléhá řadě nařízení. K přípravě transfuze je zapotřebí krevní vzorek pacienta a žádanka o transfuzní přípravky, které přijímáme na pracovišti Centrálního příjmu vzorků. Vzorky jsou následně zpracovávány v Laboratoři testů slučitelnosti. Metodika: Předtransfuzní vyšetření se skládá z vyšetření krevní skupiny pacienta, screeningu antierytrocytárních protilátek a vlastního testu slučitelnosti, který slouží k posouzení kompatibility erytrocytů dárce a plasmy příjemce. Jsou-li během předtransfuzního vyšetření zjištěny nějaké komplikace (např. pozitivní protilátkový nálezn, nejednoznačné určení krevní skupiny, pozitivní test slučitelnosti) musí být dále vzorek došetřen v Laboratoři speciální imunohematologie, kde po vyšetření zdravotní laborantka se specializací spolu s lékařem uzavře výsledek a doporučí další postup k výběru vhodného transfuzního přípravku pro pacienta. Do laboratoře Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Olomouc (TO FNOL) je denně přijímáno v průměru kolem 45 požadavků na předtransfuzní vyšetření nejen z různých oddělení FNOL, ale i ze širokého okolí a počet nakřížených transfuzních přípravků se pohybuje mezi 80 – 120 denně. Výsledky: Každý měsíc je přijímáno do Laboratoře testů slučitelnosti TO FNOL cca 1100 – 1300 požadavků o předtransfuzní vyšetření. V roce 2015 bylo přijato 13060 vzorků na předtransfuzní vyšetření. Z toho bylo 4550 požadováno v režimu statim a 8510 v režimu plán. V 780 případech bylo nutné přešetření v Laboratoři speciální imunohematologie. Závěr: Výsledkem naší práce je cílená a především účelná hemoterapie upravená podle potřeb pacienta.

### **P48/2964. MONITOROVÁNÍ HLADINY BCR/ABL1 TRANSKRIPTŮ U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ**

**Kolářková M., Křupková L., Divoká M., Slavík L., Papajík T.** (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Chronická myeloidní leukémie (CML) je nádorové myeloproliferativní onemocnění hematopoetické kmenové buňky s incidencí 1,0 až 1,5 nových případů na 100 000 obyvatel / rok. Kauzální příčinou vzniku

CML je přítomnost fúzního genu BCR-ABL1, který je výsledkem reciproké translokace t(9;22)(q34;q11). Fúzní gen BCR-ABL1 slouží jednak jako marker pro potvrzení klinické diagnózy CML a jednak jako marker pro sledování úspěšnosti léčby a monitorování minimální reziduální nemoci. Zavedení imatinib mesylátu a inhibitorů tyrozinových kináz druhé generace do klinické praxe výrazně ovlivnilo úspěšnost léčby CML pacientů. Nedílnou součástí terapie CML se stalo monitorování hladiny BCR-ABL1 transkriptů v periferní krvi. K tomu slouží standardizovaná metoda kvantitativní reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Q-RT-PCR) s použitím fluorescenčně značených sond. Jedná se o rychlou PCR v reálném čase, kdy výsledná hladina BCR-ABL1 transkriptů je vztažena k expresi kontrolního genu ABL1. V našem sdělení se zaměříme na význam monitorování hladiny BCR-ABL1 transkriptů u CML pacientů léčených inhibitory tyrozinových kináz. Pro názornost uvádíme 3 modelové situace léčebných odvodě, které mohou nastat.

### **P49/2977. LZE VĚŘIT VÝSLEDKŮM „ANALÝZY ŽIVÉ KAPKY KRVE“?**

**Křupka M.** (Ústav imunologie LF a FN, Olomouc)

Darkfield Live Blood Analysis neboli analýza živé kapky krve v temném poli je komerčně nabízená metoda, která v posledních letech dosáhla v České republice značného rozšíření. Podle propagátorů této metody je možné její pomocí získat z jediné kapky krve komplexní obraz o zdravotním stavu pacienta. Podle webových stránek nabízejících tuto metodu „alternativní medicíny“ ji lze použít ke zjištění širokého spektra parametrů, jako je stav imunitního systému (alergie, autoimunita), potíže s krevním cukrem, viskozita krve, riziko infarktu či mrtvice, hladiny železa, kyseliny listové či vitamínu B12, ale i poněkud nejasné stavy jako je „stav detoxikace či překyselení organismu“ či „mykoza krve“. Objevují se i informace o možnosti využití k diagnostice nádorových chorob. Analýza živé kapky je nabízena většinou osobami bez oficiálního zdravotnického či biologického vzdělání za přímou úhradu a je založena na pozorování nefixovaného vzorku kapilární krve za využití mikroskopie v temném poli a digitální záznamové techniky. Cílem práce bylo pomocí jednoduchého experimentu přispět k objektivnímu popisu metody „analýzy živé kapky krve“ a reálnosti tvrzení o její využitelnosti v monitorování zdravotního stavu. Byla použita čerstvá kapilární krev dobrovolníka netr-

píciho výraznějšími zdravotními komplikacemi, která byla zpracována podle dostupných informací o používané metodice analýzy. Kromě toho byly vzorky také vystaveny různým vnějším vlivům, jako je naředění hyperosmotickým pufrům či hodinové stání při pokojové teplotě. Vzorky byly následně pozorovány pomocí mikroskopie ve fázovém kontrastu, která poskytuje podobné výsledky jako mikroskopie v temném poli. Získané snímky byly srovnány s fotografiemi, které jsou na webových stránkách provozovatelů „analýzy živé kapky krve“ uváděny jako vzor změn způsobených údajnou nerovnováhou organismu (často popisovanou jako tzv. překyselení) nebo reálnými patologickými stavy. Na základě získaných snímků a jejich srovnání se snímky provozovatelů popsané metody lze konstatovat, že většina jevů uváděných v pozorované krvi jako známka zdravotních problémů mohou být s vysokou pravděpodobností artefakty vznikající při zpracování vzorku (vzduchové bublinky, nečistoty) nebo přirozeně probíhající procesy (krevní srážlivost, vysychání preparátu s následným zakoncentrováním složek krevní plazmy a vznikem hypertonického prostředí s následnou tvorbou echinocytů či rouleaux forem). Vyhodnocení nepodléhá žádné standardizaci a je tak pravděpodobně výrazně zatíženo dojmy a individuálními názory jednotlivých pracovníků, což se také ukázalo v několika málo dostupných publikacích věnujících se tomuto tématu (1-3). Na základě těchto dat tak nelze předpokládat reálný praktický přínos komerčně nabízené metody „analýzy živé kapky krve“ pro sledování zdravotního stavu a je na místě varovat před vyvozováním jakýchkoliv závěrů z jejích výsledků. Podpořeno grantem IGA\_LF\_2016\_011. Literatura: 1. Teut M., Lüdtke R., Warning A. (2006) Reliability of Enderlein's darkfield analysis of live blood. *Altern Ther Health Med.* 12(4): 36-41. 2. El-Safadi S. Tinneberg H-R., Brück F., von Georgi R., Münstedt K. (2005) Erlaubt die Dunkelfeldmikroskopie nach Enderlein die Diagnose von Krebs? Eine prospektive Studie. *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd* 2005;12:148-151. 3. Ernst E. (2005-07-12). Intrigued by the spectacular claims made for Live Blood Analysis? Don't be. It doesn't work. *The Guardian*.

### **P50/2926. OPTICKÁ AGREGOMETRIE - POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ VYŠETŘENÍ V PLAZMĚ NEUPRAVOVANÉ A UPRAVENÉ NA STANDARDIZOVANÝ POČET TROMBOCYTŮ**

**Bultasová L., Korelusová I., Šlechtová J., Duspivová I. (FN Plzeň, ÚKBH, Plzeň)**

Naše hematologická laboratoř používá dlouhodobě pro vyšetření agregace trombocytů optickou metodou

na přístrojích řady AFACT plazmu s upraveným počtem trombocytů na 250.10E9/l. Připravuje se smísením plazmy bohaté na destičky s plazmou chudou na destičky v poměru závislém na počtu trombocytů v každé z nich. Na základě doporučení výrobce pro analyzátor AFACT 4004 a Doporučení pro standardizaci optické agregometrie SSC/ISTH z 12/2012 jsme porovnávali výsledky vyšetření agregace trombocytů v plazmě upravené na standardizovaný počet trombocytů (250.10E9/l) a plazmy s neupraveným počtem trombocytů. Počet trombocytů v neupravené plazmě se pohyboval v rozmezí 317-600.10E9/l. Pro vyšetření byly použity induktory v uvedených koncentracích: ADP (10 uM/l), kolagen (100 ug/ml), kys. arachidonová (5 mg/ml), ristocetin (1,5 mg/l a 0,7 mg /l). Celkem bylo vyšetřeno 29 pacientů. Závěr: Při použití induktorů ADP, kolagenu, kyseliny arachidonové a ristocetinu o koncentraci 1,5 mg/l nebyly zjištěny rozdíly ve výsledcích maximální amplitudy agregace trombocytů v upravené a neupravené plazmě (rozdíl výsledků se pohyboval v rozmezí 0,5-6,0 %). Byl zjištěn rozdíl mezi výsledky vyšetření strmosti agregace křivky (11-18 %) - výsledky vyšetření neupravené plazmy jsou povševně vyšší než z plazmy upravené, což lze vysvětlit vyšším počtem reagujících trombocytů. Významnější rozdíl mezi výsledky vyšetření z upravené a neupravené plazmy byl zjištěn ve výsledcích maximální amplitudy agregace trombocytů po ristocetinu o koncentraci 0,7 mg/l a sice 26,4 %, kdy po standardizaci počtu trombocytů na nižší počet je agregabilita trombocytů naopak vyšší než v plazmě neupravené. Také ve výsledcích strmosti křivky agregace trombocytů v uvedené koncentraci ristocetinu bylo dosaženo v upravené plazmě o 17 % vyšších hodnot. Toto zjištění bude ověřováno proměřením dalších vzorků a zvětšením hodnoceného souboru.

### **P51/2929. CHARAKTERIZÁCIA VRODENÝCH ERYTROCYTÓZ**

**Králová B., Fialová Kučerová J., Kapraľová K., Pospíšilová D., Horváthová M., Divoký V. (Ústav Biologie LF UP, Olomouc; Dětská klinika FNOL, Olomouc)**

True polycythemia (or erythrocytosis) is characterized by increased red cell mass, which can be accompanied by elevated hemoglobin and hematocrit. Primary polycythemias result from either inherited germline mutations in erythropoietin receptor (EPOR) or acquired somatic mutations in Janus kinase 2 (JAK2). They are characterized by augmented sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin (EPO) and reduced/low-normal EPO levels. Recently, mutations in a negative regulator of EPOR/JAK2 signaling, LNK, were reported

in erythrocytoses with low EPO levels. Mutations in molecules involved in hypoxia signaling, which regulates the production of red blood cells, are associated with secondary polycythemia characterized by elevated/high-normal EPO levels and EPO hypersensitivity of erythroid progenitors in most of the cases. These include mutations in von Hippel Lindau (VHL, recessive inheritance), alpha subunit of hypoxia inducible factor 2 alpha (HIF2-alpha) and prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) (both dominant inheritance). During the last ten years we have collected a cohort of twenty-six patients with congenital polycythemia. The *in vitro* hematopoietic colony assay revealed EPO hypersensitivity of erythroid progenitors in sixteen of them. Subsequently, these patients were subjected to mutational screening of known polycythemia-related genes. A previously published EPOR mutation (5967insT), leading to a loss of the negative regulatory domain of EPOR, was detected in two unrelated pediatric patients. A known mutation in HIF2-alpha (p.G537R), which is responsible for increased HIF signaling, was found in two unrelated children. In one pediatric patient with signs of a myeloproliferative disease in the bone marrow, two heterozygous mutations in JAK2 (p.E846D and p.R1063H) were detected. These two JAK2 substitutions (inherited from healthy parents) cooperate to augment JAK2 signaling and cause the disease. A single nucleotide polymorphism (SNP) in a gene coding for LNK (rs3184504, p.R262W), was revealed in five cases. This polymorphism is associated with increased production of multiple inflammatory and immunomodulatory cytokines. One of these patients also inherited a previously described p.P488S mutation in EPOR. However, although reported in a polycythemia patient, the direct causality of this EPOR mutation with the development of erythrocytosis was not confirmed. Nevertheless, it is possible that in our patient the EPOR P488S and LNK R262W may cooperate in generating the disease phenotype. In addition, this patient was shown to be a homozygote for SNP rs2230724 in JAK2, known to be associated with increased risk of acute leukemia and gastric cancer development. This JAK2 rs2230724 SNP was detected also in five additional patients with otherwise negative mutational screening; in two of them together with SNP rs3184504 in LNK. We conclude that in the majority of congenital polycythemia cases the causative defect remains to be elucidated. We propose that in addition to possible new targets in EPOR/JAK2 or HIF signaling pathway, some of the patients may harbor a predisposing mutation/polymorphism and the full disease phenotype develops as a result of interaction with some other congenital or acquired lesion.

### **P52/2987. ZÁVISLOST ÚČINNOSTI NÍZKOMOLEKULÁRNÍHO HEPARINU (STANOVENÉ TESTEM ANTI XA) NA HLADINĚ ANTITROMBINU - KAZUISTIKA GRAVIDNÍ PACIENTKY S DEFICITEM ANTITROMBINU**

**Procházková J., Slavík L., Úlehlová J., Palová M., Hluší A. (HOK LF a FN, Olomouc)**

24-letá pacientka se poprvé dostavila na naše pracoviště v 8. týdnu 3. gravidity (předchozí 2 těhotenství skončila spontánním abortem). V anamnéze dále léčená hypertenze a ischemická cévní mozková příhoda před 2 lety, tehdy v rámci celkového vyšetření zjištěn deficit antitrombinu s kauzální mutací c.2759c-t v homozygotním stavu. Hladina antitrombinu se pohybovala mezi 20-30%. Pacientka byla léčená LMWH v profylaktické dávce (vyšší nebyla možná z důvodu gynekologického krvácení) v kombinaci s ASA. Na začátku II. trimestru došlo k recidivě CMP – s expresivní afázií a pravostrannou hemiparézou s nálezem ischemie v povodí ACM vlevo (dle MRI). Trombolytická terapie nebyla indikována pro nesouhlas pacientky. Při terapii léčebnou dávkou LMWH a substitucí antitrombinu došlo k rychlé úpravě hybnosti, přetrvávala mírná expresivní afázie. Pacientka převedena na warfarin, na kterém stabilizována až do 29. týdne gravidity, kdy došlo k rozvoji preeklampsie. Pro nutnost předčasněho ukončení gravidity převedena na léčebnou dávku LMWH se substitucí antitrombinu. Při antihypertenzivní a symptomatické terapii došlo ke stabilizaci stavu, gynekology rozhodnuto o odložení porodu pro nezralost plodu. Ve 30. týdnu došlo k intrauterinnímu úmrtí plodu. Po porodu byla opět zavedena antikoagulační terapie warfarinem, která pokračuje dosud. Pacientka je bez neurologického deficitu. Graf znázorňuje závislost hladiny anti Xa na hladině antitrombinu (měření byla prováděna před a po substituci antitrombinu ve stejném časovém odstupu od podání LMWH). Naše pozorování potvrzuje význam antitrombinu jako kofaktoru nízkomolekulárních heparinů a podporuje nutnost substituce antitrombinu v terapii trombotických komplikací při jeho nedostatku.

### **P53/2928. DIAGNOSTIKA VON WILLEBRANDOVY CHOROBY NA ÚKBH FN PLZEŇ**

**Korelusová I., Hajšmanová Z., Šlechtová J., Švajcrová J., Petrmichlová D. (FN Plzeň, ÚKBH, Plzeň)**

Von Willebrandova choroba (vWch) je nejčastější vrozené krvácivé onemocnění. Příčinou je nedostatek nebo funkční defekt von Willebrandova faktoru (vWF).

Důsledkem je snížená koagulační aktivita FVIII a porušená adhezivní funkce destiček. Klinické projevy závisí na tíži strukturálního nebo kvantitativního defektu vWF. Typické je krvácení ze sliznic, zejména z nosu a dásní, kožní krvácení či protrahované krvácení po poranění. vWch se dle klasifikace z roku 2006 dělí na 3 typy. Typ 1 a 3 je kvantitativní deficit vWF, u typu 1 se jedná o parciální, u typu 3 o úplný nedostatek vWF, přičemž struktura a funkce vWF jsou u typu 1 normální. Typ 2 je definován jako kvalitativní čili strukturální defekt vWF provázený poruchou funkce zejména vysokomolekulárních multimerů. U typu 2 rozlišujeme na základě analýzy struktury multimerů ještě několik subtypů. Zcela jednoznačnou diagnostiku vWch umožňuje molekulárně genetické vyšetření. Panel diagnostických testů vWch na našem pracovišti zahrnuje testy screeningové (krevní obraz, krvácivost metodou Simplate, aPTT), základní (FVIII:C, vWF:Ag, funkční testy vWF:RCo, vWF:CB) a specifické (provádíme RIPA - ristocetinem indukovaná agregace destiček). Na základě výpočtu diskriminačního poměru, který hodnotí funkci vůči hladině vWF, jsme schopni rozlišit kvantitativní a kvalitativní poruchu vWF (typ 1 a 3 od typu 2). Vysoce specifické diagnostické testy neprovádíme rutinně, vzorky zasíláme na specializovaná pracoviště. V lednu 2015 jsme do vyšetřovacího panelu přidali další funkční test - test vazebné kapacity kolagenu (vWF:CB, výrobce Corgenix). vWF:CB se provádí ELISA kitem REAADS Collagen Binding Assay Test Kit (96 well kit), kdy kolagen pokrývá povrch jamky mikrotitrační destičky. Referenční plazma a kontrolní plazmy jsou součástí kitu. Výsledné hodnoty vWF:CB v % se odečítají z nastavené kalibrační

křivky při vlnové délce 450 nm proti referenčnímu filtru 650 nm na fotometru Reader 530 (Athos Labtec Instrument GmbH Rakousko). Výrobce kitu doporučuje zároveň i stanovení antigenu vWF (vWF:Ag), které jsme respektovali. Stanovení bylo prováděno ELISA kitem - REAADS VON WILLEBRAND FACTOR ANTIGEN KIT ELISA (96 wells) - v jamkách mikrotitrační destičky je navázána specifická protilátka anti-human vWF. Referenční plazma ke kalibraci je součástí kitu. Výsledné hodnoty vWF:Ag v % byly odečteny z nastavené kalibrační křivky při vlnové délce 450 nm proti referenčnímu filtru 650 nm rovněž na fotometru Reader 530. Správná kalibrace vWF:CB, vWF:Ag byla ověřena kontrolním materiálem Control N a Control P (firma Siemens), naměřené hodnoty vWF:Ag a vWF:CB byly v povolených referenčních mezích. Od ledna 2015 do března 2016 jsme vyšetřili vzorky plazmy kontrolní skupiny (20 zdravých dobrovolníků - muži, ženy) a 112 pacientů s již známou diagnózou vWch, s poruchami koagulace a krvácivými stavy. K vyhodnocení jsme použili výpočet diskriminačního poměru R (tj. poměr vWF:CB/vWF:Ag). U zdravých lidí je  $R=1$ , u pacientů s vWch typu 1 je R v rozmezí 0,5-1,0, u pacientů s typem 2 vWch je  $R < 0,5$ . V případě výsledků kontrolní skupiny se R pohybovalo v rozmezí 1,0-1,3. U pacientů s diagnostikovanou vWch byl poměr R od 0,1-1,3; u pacientů s krvácivými stavy, resp. poruchou koagulace od 0,4-1,6. U pacientů s  $R < 0,5$  byla provedena další vyšetření na specializovaném pracovišti k upřesnění diagnózy, např. přímé vyšetření struktury velkých multimerů. Metodika výše uvedených ELISA testů byla zvládnuta, od ledna 2016 jsou standardní součástí vyšetřovacího panelu vWch.

## PODPŮRNÁ PÉČE

### **P54/2937. PRIMÁRNÍ ANTIMYKOTICKÁ PROFYLAXE MICA FUNGINEM, V DÁVCE 50 MG NA DEN, U DOSPĚLÝCH PACIENTŮ BĚHEM INDUKČNÍ CHEMOTERAPIE AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE (ALL): HODNOCENÍ Z POHLEDU BĚŽNÉ KLINICKÉ PRAXE**

Kabut T., Folber F., Šálek C., Procházková J., Rolencová M., Kocmanová I., Kouba M., Weinbergerová B., Cetkovský P., Mayer J., Ráčil Z. (Interní hematologická a onkologická klinika Fakultní nemocnice, Brno; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Oddělení klinické mikrobiologie FN, Brno)

Úvod: Invazivní mykotické infekce (IFI) během léčby akutních leukémií bývají spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou. Zatímco u pacientů intenzivně léčených s akutní myeloidní leukémií je primární antimykotická profylaxe (PAP), především posakonazolem, zavedenou praxí, standardizované postupy PAP u pacientů s ALL chybí. Hlavní problém představuje zejména riziko interakcí azolových antimykotik, účinných proti vláknitým houbám, s cytostatiky používanými v rámci intenzivní léčby ALL. Volba vhodné PAP u pacientů s ALL je proto složitá, přičemž v mnoha případech pacienti pak zůstávají bez dostatečné ochrany proti vláknitým houbám. Cíl: Hodnocení efektivity a bezpečnosti PAP micafunginem (50 mg/den) během indukční léčby do-