

# KONFERENCE LABORATORNÍ HEMATOLOGIE

## PŘEDNÁŠKY

### L01

#### DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA LEUKOCYTÓZ V HEMATOLOGICKÉ LABORATOŘI

Mikulenková D., kolektiv

Morfologicko-cytochemická laboratoř, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Leukocytóza je v hodnotách krevního obrazu definovaná zvýšeným počtem leukocytů nad referenční mez pro dané pohlaví a věk (u dospělých jsou leukocyty vyšší než  $10 \times 10^9/l$ ). Příčina zvýšených hodnot leukocytů je obsáhlá (infekce, zánět, chirurgické výkony, hematologická onemocnění). Zvýšení leukocytů bývá nejčastěji podmíněno zvýšeným počtem neutrofilů při bakteriálních infekcích, druhé v pořadí bývá navýšení lymfocytů s celkovou leukocytózou u virových infekcí. Podstatně méně často bývá leukocytóza způsobena navýšením monocytů, eozinofilů či bazofilů. Raritně pak leukocytózu způsobuje v rámci hemato-onkologických onemocnění přítomnost četných leukemických buněk či celé vývojové řady granulopoézy v periferní krvi. Diagnostika leukocytóz v hematologické laboratoři je zaměřena na početní zhodnocení leukocytů a pečlivé mikroskopické zhodnocení nátěru periferní krve včetně zhodnocení morfologie erytrocytů a trombocytů. V diferenciální diagnostice je v některých případech nutné zhodnotit aspirát kostní dřeně, ev. i cytochemické vyšetření, které napomůže v diagnostice. Diagnostika leukocytóz je kompletní po vyšetření nátěru periferní krve a kostní dřeně dalšími vyšetřovacími metodami (průtoková cytometrie, histopatologický rozbor kostní dřeně a tkání, genetická vyšetření aj.).

### L02

#### T-PROLYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE – MORFOLOGICKY ZAJÍMAVÁ KAZUISTIKA

Juráňová J., Čerňan M., Lapčíková A., Pikalová Z.

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc

T-prolymfocytární leukemie (T-PLL) je velmi vzácné maligní lymfoproliferativní onemocnění vznikající nádorovou transformací prolymfocytů T-řady. Přestavuje přibližně 2 % všech lymfocytárních onemocnění a je charakteristické agresivním průběhem, vysokou lymfocytózou, často extrémní splenomegalií. Může být přítomno postižení kůže a lymfatických uzlin. Tato nemoc postihuje stejně často starší muže i ženy.

Prezentujeme morfoloicky zajímavou kazuistiku 61leté pacientky, která byla v 10/2017 pro extrémní nález leukocytózy v krevním obraze (KO), splenomegalií, hmatné uzliny a pruritus kůže odeslána praktickým lékařem k došetření na OKH Havířov. Zde v KO hyperleukocytóza (přes  $800 \times 10^9/l$ ) s dominující lymfocytózou, anemie, trombocytopenie, doplněno imunofenotypizační vyšetření PK a vyslovena suspekce na dg. T-PLL. Pacientka byla následně referována na naše pracoviště. V den přijetí na HOK FN Olomouc (6. 10. 2017) v KO přetrvávala hyperleukocytóza ( $810 \times 10^9/l$ ) s lymfocytózou ( $779,85 \times 10^9/l$ ) a v nátěru PK nalezeno 95 % lymfocytů, mladších s výrazným jádérkem, bohatší cytoplazmou i se zářezy v jádře. Současně bylo provedeno imunofenotypizační vyšetření PK, které spolu s dalšími vyšetřeními (prokázána klonalita TCR-beta, komplexní karyotyp) a s rozsahem postižení PK, KD, slezina, uzliny, potvrdilo dg. *de novo* T-PLL.

Pacientka byla iniciálně léčena cytoredukcí MabCampathem s pouze parciální odpovědí na terapii, proto podána chemoterapie Fludara + Endoxan + Mitoxantron, na které však onemocnění dále progredovalo. Od 11/2017 pokračovala v léčbě MabCampathem s eskalací dávek, s výrazným efektem, s dosažením kompletní regrese splenomegalie a s dosažením lymfocytopenie ( $0,01 \times 10^9/l$ ). V 1/2018 byla pacientka indikována k allogenní transplantaci KB. Avšak v 3/2018

dochází k progresi adenomegalie a leukocytózy, dle PET-CT obraz perzistence onemocnění a pro přidružené infekční komplikace byla pacientce podána cytoredukční léčba R-FCM. V 4/2018 dochází k další klinické i laboratorní progresi onemocnění a pacientka byla po vyřazení z transplantačního programu indikována k další symptomatické a cytoredukční léčbě. Postupně dochází k zhoršení celkového stavu a pacientka v 5/2018 umírá.

*Práce byla podpořena grantem IGA-LF-2018-004.*

### L03

#### **AKUTNÍ LEUKEMIE SE SMÍŠENÝM FENOTYPEM – MORFOLOGICKÝ NÁLEZ A KAZUISTIKA**

**Šimečková R.**

*Morfologicko-cytochemická laboratoř ÚHK, Praha*

Akutní leukemie se smíšeným fenotypem (MPAL) patří mezi vzácná nádorová onemocnění. WHO klasifikace z roku 2016 ji zahrnuje do skupiny akutních leukemií nejasného původu. Blastické buňky v tomto případě vykazují znaky lymfoidní i myeloidní linie. Myeloidní linie je prokázána přítomností myeloperoxidázy (MPO) průtokovou cytometrií, imunohistochemicky nebo cytochemicky, v případě monocytární diferenciace musí být přítomny alespoň dva z následujících znaků: pozitivita nespecifické esterázy, pozitivita znaku CD11c, CD14, CD64, lysozym. T-linie je prokázána cytoplazmatickým znakem CD3 průtokovou cytometrií, či imunohistochemicky nebo povrchovým znakem CD3. B-linie je prokázána silně pozitivním znakem CD19 s nejméně jedním z následujících silně exprimovaných znaků: CD79a, cytoplazmatický CD22, CD10, nebo slabě pozitivním znakem CD19 s nejméně dvěma z následujících silně exprimovaných znaků: CD79a, cytoplazmatický CD22, CD10. Ve sdělení se formou kazuistiky zaměříme na morfologický nálezu této diagnózy.

### L04

#### **NENÍ LEUKOCYTÓZA JAKO LEUKOCYTÓZA – KAZUISTIKY DVOU PACIENTŮ S LEUKOCYTÓZOU ODLIŠNÉ ETIOLOGIE**

**Fátorová I., Dynterová A., Pešková E., Žák P.**

*IV. interní hematologická klinika FN, Hradec Králové*

Leukocytóza neboli zvýšení počtu leukocytů v periferní krvi je stav, který v hematologické laboratoři při vyšetření krevního obrazu vidáme velmi často. Etiopatogeneze leukocytóz je různorodá. Nejčastěji jde o reaktivní stavy, kdy je leukocytóza způsobena především zvýšením absolutního počtu neutrofilů nebo lymfocytů na podkladě akutního infekčního onemocnění. Další skupinou leukocytóz jsou závažná klonální hematopoetická onemocnění, kdy se většinou jedná o poruchu na úrovni kmenové buňky. V kostní dřeni dochází k patologické proliferaci leukocytů na různé úrovni jejich vývoje bez/anebo s vyzráváním a s následným vyplavováním těchto elementů do obvodové krve. Patří sem akutní leukemie, chronické myeloproliferativní stavy, některé lymfoproliferace a některá myelodysplasticko-myeloproliferativní onemocnění. Samostatnou kapitolou je skupina tzv. falešných nebo laboratorních leukocytóz, kdy při měření počtu leukocytů na analyzátoch krevních buněk mohou interferovat jiné buněčné populace, které jsou falešně připočítávány k leukocytům. Jedná se především o patologické stavy spojené s vysokým počtem erytroblastů vyplavovaných do periferní krve. Na dvou kazuistikách budeme prezentovat nálezu leukocytóz různé etiologie.

*Práce byla podpořena programem Progres-Q40/08.*

### L05

#### **LEUKOCYTÓZA U DĚTÍ POKAŽDĚ JINAK**

**Jelínková M., Zapletal O., Kokeszová M., Blatný J.**

*Oddělení dětské hematologie FN, Brno*

Hematologické analyzátoři jsou v dnešní době díky novým technologiím stále přesnější, výstupy z nich jsou obohaceny spoustou nových parametrů a výsledky jsou čím dál více srovnatelné s mikroskopickým diferencíálem leukocytů. I přes přibývajících moderních vyšetřovacích metod je diferencíální rozpočet leukocytů mikroskopicky stále důležitým a nepostradatelným vyšetřením, a to nejen v diferencíální diagnostice leukocytóz.

Tak jako u dospělých, tak i v dětském věku se mohou v souvislosti s leukocytózou vyskytovat závažné stavy. Ne každý „podezřelý“ krevní obraz však musí vždy znamenat závažnou diagnózu. Budou prezentovány krátké kazuistiky dětských pacientů s leukocytózou. Výběr pacientů je zaměřen na morfologické nálezy, se kterými se v denní praxi často nesečkáme.

## L06

### MIKROSKOPICKÁ DIAGNOSTIKA MALÁRIE A OSTATNÍCH KREVŇÍCH PARAZITŮ

Richterová L.

NRL pro diagnostiku tropických parazitárních infekcí, OKM Nemocnice Na Bulovce, Praha

Každoročně je do České republiky importováno okolo 30 případů malárie. Opakovaně se setkáváme i s onemocněním viscerální leishmaniózou. Tato onemocnění jsou život ohrožující a jejich včasná diagnóza hraje klíčovou roli v prognóze pacienta. Proto je zásadní, aby právě hematologové, kteří jako první odečítají krevní nátěry, byli schopni krevní parazity správně rozpoznat a na jejich přítomnost upozornit.

V této přednášce si představíme nejvýznamnější krevní parazity importované do České republiky. Přiblížíme si jejich životní cykly i četnost jejich výskytu. Hlavně se ale zaměříme na jejich diagnostiku, a to především na morfologii na krevních nátěrech.

Absolventi této přednášky by měli být schopni rozoznat jednotlivá vývojová stadia malarických plasmodií, odlišit leishmanie v nátěru kostní dřeně od mykotických infekcí a získat přehled o ostatních v krvi se vyskytujících parazitárních nálezích.

## L07

### PŘÍNOS CYTOMORFOLOGIE V DIAGNOSTICE PARAZITÁRNÍCH INFEKČÍ – LEISHMANIÓZA V KOSTNÍ DŘENI

Antošová M.<sup>1</sup>, Babáčková G.<sup>1</sup>, Kissová J.<sup>1,2</sup>, Buliková A.<sup>1,2</sup>, Penka M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické hematologie FN, Brno

<sup>2</sup>Lékařská fakulta MU, Brno

**Úvod:** V periferní krvi i kostní dřeně mohou být identifikovány různé druhy mikroorganismů, které mohou být viditelné v nátěrech periferní krve a kost-

ní dřeně. Možné jsou i abnormality krevního obrazu (např. anemie, trombocytopenie či eozinofilie). Významnou roli v diagnostice parazitárních infekcí hraje mikroskopické hodnocení nátěru periferní krve a kostní dřeně. Leishmanióza je onemocnění způsobené parazity rodu *Leishmania*, jejichž přenos na člověka probíhá komáry rodu *Phlebotomus* a *Lutzomia*. *Leishmanie* se mimo jiné vyskytují i v jižní Evropě. Parazité se replikují v makrofázích. Nejzávažnější je tzv. viscerální forma, která může být příčinou nejasné pancytopenie.

**Cíle:** Poukázat na význam vyšetření kostní dřeně v diagnostice leishmaniózy.

**Metody:** Autoři prezentují případ pacienta s leishmaniózou zachycenou při vyšetření aspirátu kostní dřeně. Přiloženy jsou i mikroskopické snímky s nálezem leishmanií. Preparáty kostní dřeně jsou barveny na hematologickém analyzátoru Sysmex SP-1000i, hodnoceny na mikroskopu Olympus BX51 a dokumentovány kamerou Olympus DP71.

**Výsledky:** Kazuistika, pacient \*1949, od září 2012 sledován na hemato-onkologické klinice pro monoklonální gamapatií, od března 2013 pak léčen pro symptomatický mnohočetný myelom a od listopadu 2013 na studiové udržovací léčbě. V červnu 2016 byl pacient hospitalizován k došetření progredující pancytopenie při podezření na progresi základního onemocnění. Provedena trepanobiopsie, kde v nátěrech kostní dřeně nalezeny leishmanie.

**Závěr:** Mikroskopické vyšetření kostní dřeně je velmi užitečnou a přínosnou metodou v diagnostice viscerální leishmaniózy.

## L09

### EOZINOFILNÍ LEUKOCYTÓZA U MLADÉHO PACIENTA

Zuchnická J.<sup>1</sup>, Benková K.<sup>1</sup>, Mihályová Fečková J.<sup>1</sup>, Plonková H.<sup>1</sup>, Richterová P.<sup>1</sup>, Hájek R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hematoonkologická klinika FN, Ostrava

<sup>2</sup>Lékařská fakulta OU, Ostrava

**Úvod:** Eozinofilní leukocytóza může provázet širokou škálu nehematologických onemocnění. Vzácněji jde o klonální proliferaci a poruchu kmenové buňky v kostní dřeně, zvýšený počet eozinofilů je součástí neoplastického klonu. Objasněním etiologie a včasnou kauzální léčbou se snažíme zabránit poškození orgánů eozinofilními leukocyty v důsledku uvolnění obsahu eozinofilních granulí.

**Metody:** V klinické praxi se nejčastěji setkáváme se sekundární eozinofilii, která je reaktivní odpovědí organismu na zvýšenou produkci cytokinů (zvláště IL-5). Vzácněji jde o klonální proliferaci a poruchu kmenové buňky v kostní dřeni, kdy zvýšený počet eozinofilů je součástí neoplastického klonu. Pro myeloproliferativní typ hypereozinofilie je diagnostickým znakem průkaz klonality procesu (přestavba PDGFRA, PDGFRB, FGR1 nebo PCM-1-JAK2), případně jsou splněna kritéria pro chronickou eozinofilní leukemii (CEL NOS) dle WHO 2016, u lymfocytárního typu hypereozinofilie je průkazný nález abnormální populace T-lymfocytů (CD3-, CD4+ nebo CD3+, CD4-, CD8-). Idiopatický hypereozinofilní syndrom je pak diagnózou *per exclusionem*. Na případu nemocného s významnou eozinofilní leukocytózou prezentujeme diferenciatně diagnostický přístup k hypereozinofilii, morfologické nálezy v periferní krvi a kostní dřeni.

Jednalo se o mladého muže s anamnézou 5 dní trvajících průjmů, bolestí břicha, subfebrilií.

Laboratorně bez elevace zánětlivých parametrů (CRP v normě), s leukocytózou, progredující eozinofilii (hodnoty  $1,01 \times 10^9 \rightarrow 13,7 \times 10^9/l$ ), normálními hodnotami hemoglobinu i trombocytů, elevací LDH. Zahájena symptomatická terapie a komplexními diferenciatně diagnostickými postupy pátráno po etiologii eozinofilie.

**Výsledky:** Vstupně byla vyloučena infekční etiologie průjmů, negativní bylo vyšetření stolice na parazitární infekce. Vyšetřením břicha počítačovou tomografií byla prokázána mezenterální lymfadenopatie, rozšíření střevní stěny jejunu. Nemocný byl vyšetřen gastroenterologem, provedena koloskopie, vše s negativním nálezem. Indikováno celotělové PET/CT vyšetření, vyšetření kostní dřene s cílem potvrdit/vyloučit klonalitu eozinofilie, případně prokázat/vyloučit infiltraci kostní dřene lymfoproliferací.

**Závěr:** Ať je příčina eozinofilie jakákoliv, eozinofily mohou vést k poškození orgánů, především srdce, plic, kůže, centrálního a periferního nervového systému. Vedle infiltrace tkání eozinofily je hlavní příčinou poškození uvolnění obsahu granul eozinofilů. Včasná diagnostika a kauzální terapie je nutná k zabránění či minimalizaci orgánového poškození.

## L11

### ZÍSKANÁ HEMOFILIE, DIAGNOSTIKA, LÉČBA

Salaj P.<sup>1</sup>, Dulíček P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

<sup>2</sup>IV. interní hematologická klinika LF UK a FN, Hradec Králové

V našem sdělení se zabýváme analýzou souboru 58 pacientů se získanou hemofilií v období 1994–2018 (31 mužů, 27 žen), průměrného věku 67 let. Stran původu onemocnění jsme došli k následujícím výsledkům: autoimunitní původ 29 %, onkologické onemocnění 29 %, idiopatická forma 48 %, smíšené etiologie u pěti nemocných, u jedné ženy v souvislosti s porodem. Stran klinické manifestace krvácivých projevů: kůže a podkoží 67,9 %, svalové 12,4 %, CNS 5,2 %, GIT 4,4 %, hematurie 3,0 %, dutina ústní 2,5 %, retroperitoneum 1,6 %, hemothorax 1,4 %, metroragie 1,1 %, epistaxe 0,3 %. U 5 % pacientů nedošlo ke krvácení. Laboratorní výsledky: aPTT – poměr 4,2 v průměru (2,6 medián), FVIII 4,5 (0–33), inhibitor v průměru 118 (medián 35).

**Metoda:** Terapie se skládá ze dvou kroků: zástavy krvácení (aplikace preparátu s bypassovou aktivitou) a imunopresivní terapie. Terapie 1. volby tvoří kombinace kortikoidy + cyklofosamid, která byla použita u 98 % pacientů. Intravenózní imunoglobulin jako podpůrná terapie byl použit v 36 % případů. Při terapii rezistentních forem byl použit cyklosporin v 17 %, nyní to je anti-CD20 protilátka (14 %). U jednoho pacienta byla použita imunoabsorpce s titrem inhibitoru nad 1600 BU. Bez potřeby bypassové terapie bylo 38 %, rFVIIa byl účinný v 92 %.

**Výsledky:** 52 % atak ukončeno remisí, čas navození CR byl dosažen v průměru za 115 dnů, v 29 % atak bez remise, 19 % atak ukončeno úmrtím. Jako rizikový faktor pro časnou úmrť byl nalezen pouze věk a onkologická diagnóza. Jako rizikový faktor pro relapsy byla přítomnost autoimunitního onemocnění. U žen je větší pravděpodobnost relapsu onemocnění.

**Závěr:** Náš společný soubor jen potvrzuje, že tito jedinci by měli být léčeni v centrech mající s managementem těchto nemocných vlastní zkušenosti.

## L12

### LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA A DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA U PACIENTŮ S PODEZŘENÍM NA AKUTNÍ ATAKU TROMBOTICKÉ MIKROANGIOPATIE

Gumulec J.<sup>1,6</sup>, Kořístek Z.<sup>1,6</sup>, Šimětka O.<sup>2,6</sup>, Kovářová P.<sup>3</sup>, Martínek J.<sup>4</sup>, Kaspřák D.<sup>1,5</sup>, Vrublová P.<sup>1</sup>, Broskevičová L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika hematologie FN, Ostrava

<sup>2</sup>Gynekologicko-porodnická klinika FN, Ostrava

<sup>3</sup>Krevní centrum FN, Ostrava

<sup>4</sup>Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, FN, Ostrava

<sup>5</sup>SPADIA LAB, a.s., Ostrava

<sup>6</sup>Lékařská fakulta Ostravské univerzity

**Úvod:** Trombotické mikroangiopatie (TMA) jsou vzácně se vyskytující onemocnění spojená se závažnou morbiditou a mortalitou, jsou-li nepoznaná, pozdě nebo neadekvátně léčená. Diagnosticko-terapeutický postup musí být rozhodný. V klinické praxi je užitečné, když se nejen v terapii, ale i v diagnostice a diferenciální diagnostice postupuje podle validovaného protokolu. V přednášce shrnujeme aktuální doporučení a vlastní zkušenosti prvotní diagnostiky u pacientů s možnou akutní atakou TMA.

**Diagnostický algoritmus:** Na TMA je třeba myslet kdykoli se objeví mikroangiopatická hemolytická anemie (MAHA) s různě významným poklesem počtu destiček a s jinak nevysvětlitelnou orgánovou symptomatologií. Přestože nejčastější projevy vycházejí z poškození nervové soustavy a ledvin, bývá spektrum orgánového poškození velmi pestré a navíc mohou klinický i laboratorní obraz TMA zkreslovat nebo maskovat stavy, které TMA spouštějí. Protože je mortalita a morbidita neléčené TMA vysoká a protože v době počátečních příznaků nelze určit, o který typ TMA jde, je nezbytné zahájit léčbu výměnnými plazmaferézami do 4–8 hodin na základě výsledků dobře dostupných v kterékoli laboratoři = hemolytická anemie provázená poklesem počtu destiček a zvýšením počtu schistocytů s negativním přímým antiglobulinovým testem a se zvýšením aktivity laktátdehydrogenázy (MAHAT) u pacienta s dynamicky se měnícím klinickým a laboratorním obrazem postižení nejméně jednoho orgánového systému. Tento závěr je možné kdekoli a kdykoli udělat do 3–6 hodin. Pro navazující diferenciální diagnostiku je naprosto zásadní, aby odběry krve pro významná vyšetření (ADAMTS13, jeho inhibitor, regulační proteiny komplementu atd.) byla provedena před aplikací plazmy nebo výměnnou plazmaferézou. Alikvoty plazmy a séra, ev. materiál pro izolaci DNA je třeba zamrazit

a evidovat. I tohle je součástí dobrého diagnosticko-terapeutického algoritmu.

**Závěr:** MAHAT je možné prokázat na základě několika dobře dostupných vyšetření do 3–6 hodin. Zavedení a respektování diagnosticko-terapeutického algoritmu významně zlepšuje vyhlídky pacientů s TMA.

*Podpořeno projektem MZ ČR – RVO FNOs/2017 a Edukační grant fy Alexion GRC101605-P.*

## L13

### VÝZNAM STANOVENÍ D-DIMERŮ V GRAVIDITĚ

Ivanová E., Dulíček P., Sadílek P.

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

D-dimer je proteinový fragment vznikající působením plazminu na fibrinovou sraženinu stabilizovanou příčnými vazbami, které vznikly působením F XIII. Tento proces se nazývá fibrinolýza. Konečný produkt odbourávání, D-dimer, je složen z jedné proteinové podjednotky E a ze 2 D podjednotek spojených příčnou vazbou (plazmin neštěpí tyto příčné vazby). Právě kvůli obsahu dvou D-podjednotek se označuje produkt jako D-dimer. Tento test byl zaveden u nás již před 26 lety s cílem využít negativně prediktivní hodnoty při vylučování venózního tromboembolismu (VTE). Při každém stavu organismu (např. zánět, nádor aj.) dochází k aktivaci koagulace a fibrinolýzy, proto nacházíme u těchto stavů zvýšené D-dimery. K tomu dochází i fyziologicky u žen v graviditě. Fyziologicky tedy hladina v graviditě stoupá a na základě mnoha studií s velkým počtem žen je dáno i fyziologické rozmezí pro jednotlivé trimestry v graviditě. Jsou však i individuální odchylky. Nicméně jsou ženy, které mají zvýšené hodnoty (někdy i významně), a přesto nejsou zatížené žádnou těhotenskou komplikací (eklampsie, HELLP syndrom aj.), a to ani VTE. Stejně tak jsou ženy, které mají naprosto normální hodnoty D-dimerů v graviditě. V našem sdělení se zabýváme následujícími otázkami: Které ženě vyšetření indikovat a jak na výsledky reagovat. V praxi lze vidět mnoho testování, dokonce nasazování LMWH až do dávek terapeutických a jiná opatření, která nevycházejí z medicíny založené na důkazech a mohla by vést ke krvácivým komplikacím.

**L14****STANOVENÍ ANTIXA V GRAVIDITĚ KOMU, KDY A PROČ?****Dulíček P., Ivanová E., Sadílek P.***IV. interní hematologická klinika LF UK a FN, Hradec Králové*

Výskyt venózního tromboembolismu (VTE) se udává v graviditě 1/1000. Toto riziko je zvýšeno při přítomnosti vrozeného trombofilního stavu, obezity, u starších rodiček či v případě získaných trombofilních stavů. Dle doporučených postupů je pak v případě potřeby žena zajištěna LMWH v dávce profylaktické či vyšší profylaktické a termín nasazení je na odborníkovi v této oblasti. Některá doporučení jsou pro monitorování anti-Xa s cílovou hodnotou až 0,3 IU/ml. Ne všichni s tímto doporučením souhlasí a argumentují nulovou hodnotou anti-Xa v 2. polovině dávkovacího schématu.

1. cílem sdělení je naše doporučení kdy, komu a proč anti-Xa v této profylaktické indikaci monitorovat.
2. cílem sdělení je pak problematika monitorování anti-Xa v léčbě VTE v graviditě. Zde dochází v praxi i k navyšování dávky LMWH (bez ohledu na hmotnost) v případě, že hodnota anti-Xa je pod 0,5 IU/ml. Je nutné si uvědomit, že heparin působí i jinak než jen proti F Xa, ale také proti trombinu a aktivací TFPI.

**L15****VROZENÉ KOMBINOVANÉ DEFEKTY PLAZMATICKÝCH FAKTORŮ****Matýšková M., Zavřelová J., Šlechtová M.***Oddělení klinické hematologie FN, Brno*

Výskyt vrozených kombinovaných defektů patří mezi velmi vzácná onemocnění. Příčinou může být jednak koincidence dvou genetických defektů, jeden defekt postihující více faktorů (krvácení může být primární projev postižení, ale i součást dalších projevů), nebo cytogenetický defekt (syndrom delece 13q34). Nejčastější z defektů postihující více faktorů (F) je snížení FV a FVIII (typ I) a nedostatek K-dependentních faktorů (typ III).

Kombinace snížení FV a FVIII (typ I) byla poprvé zaznamenána v roce 1954. Dědičnost je většinou autozomálně recesivní. U některých rodin se jedná o výskyt dvojitých heterozygotů pro hemofilii A a defekt FV. U dalších je přítomna buď mutace na chromozomu 18 v části kódující tzv. lektin manózu vázající protein (LMAN1), nebo na chromozomu 2 v genu MCFD2 (multiple coagulation factor deficienty 2 gene). LMAN1 zajiš-

tuje transport FV a VIII přes endoplazmatické retikulum – Golgiho aparát. MCFD2 kóduje protein, který se váže v komplex s LMAN1 a má funkci kofaktoru při intracelulárním přenosu faktorů. Vadné proteiny nejsou schopny vázat a přenášet FV a FVIII, tím dochází k jejich nedostatku. Hladina faktorů se pohybuje mezi 5–30 %. U postižených jsou lehké až střední krvácivé projevy.

Mnohočetný nedostatek K-dependentních faktorů (označován také jako typ III) – FII + VII + IX + X současně s proteinem C a S je autozomálně recesivně dědičný. Jedná se o poruchu jaterní karboxylace – defekt na chromozomu 2 v GGX genu (gen pro gama-glutamyl karboxylázu), jednak mutace v genu VKORC1 (vitamin K epoxid reduktase komplex subunit 1). Postiženy jsou všechny K-dependentní proteiny, tzn. i proteiny kostního metabolismu. U části nemocných je popsána klinická odpověď na vysoké dávky K vitamínu. V některých případech jsou nositelé asymptomatictí, většinou se však setkáváme s těžkými krvácivými projevy. Laboratorní nálezy odpovídají typu defektu a hloubce postižení.

**L16****DIAGNOSTIKA REZISTENCE NA PROTIDESTIČKOVOU LÉČBU****Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Procházková J., Palová M., Hluší A.***Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc*

**Úvod:** Vyšetřování destičkových funkcí tvoří již dlouhou dobu nedílnou součást laboratorního vyšetření poruch hemostázy. Na tomto podkladě byl v posledních letech prováděn vývoj nových laboratorních metod, které byly využity k monitoraci selhávání antiagregační terapie. Nejprve byl tento fenomén popsán při podávání kyseliny acetylsalicylové a následně u thienopyridinů.

**Metoda:** Vyšetření agregační schopnosti trombocytů byla provedena metodou optické agregometrie (LTA) a imedanční vícekanálové agregometrie (MEA) na přístroji Multiplate. Pro indukci agregační schopnosti byla využita v případě měření rezistence na kyselinu acetylsalicylovou jako induktor kyselina arachidonová, resp. u rezistence na thienopyridiny indukce adenosin difosfátem za blokování receptoru P2Y12 prostaglandinem E1. Pro zjištění genetických příčin rezistence na protidestičkovou léčbu byla vyšetřena přítomnost polymorfismů destičkových receptorů GP III (HPA-1; rs5918), P2Y12 (H1/H2 haplotype; rs2046934), P2Y12 (34C>T; rs6785930) a COX-1 (-842A>G; rs10306114)

za použití analýzy křivek tání na LightCycler 480 (ROCHE).

**Soubor:** V naší práci shrnujeme možnosti monitorace selhání protidestičkové léčby u kyseliny acetylsalicylové, resp. thienopyridinů, na souboru 101, resp. 84 pacientů se stabilní ICHS jednotlivými funkčními technikami a zjištění jejich příčin ať už získaných nebo geneticky podmíněných.

**Výsledky:** Stanovili jsme cut-off optické agregační metody pro aspirinovou rezistenci na 25 % reziduální aktivity destiček. Porovnání optické a imedanční agregometrie vykazuje statistickou korelaci ( $p = 0,01$ ) při takřka totožném výskytu rezistence v souboru 22,22 % LTA vs. 22,21 % MEA. Obdobně jsme stanovili cut-off pro klopogrelou rezistenci na 47 % reziduální aktivity destiček a opět jsme prokázali statistickou korelaci metod ( $p = 0,03$ ) při shodném výskytu rezistence 10,9 % LTA vs. 11,9 MEA. Stanovení genetických polymorfismů vykazovalo statistickou korelaci s výskytem rezistence pouze u COX-1 receptoru.

**Závěr:** LTA přináší srovnatelné výsledky jako MEA za podmínek aplikace stejných indukčních mechanismů pro sledování účinku jednotlivých léků. Monitorace genetických predispozic pacientů pro selhání léčby má velmi omezený význam, jelikož ostatní faktory predisponující selhání léčby jsou důležitější.

*Podpořeno granty LF-2018-004 a MZ ČR – DRO (FNOL 00098892).*

## L17

### VYUŽITÍ TABLET DOACS STOP

Sadílek P., Tučková G., Dytrychová V., Fátorová I., Dulíček P.

IV. interní hematologická klinika – laboratoř LF UK a FN, Hradec Králové

U pacientů léčených DOACs dochází k více či méně významnému ovlivnění řady koagulačních testů. Takové výsledky jsou pro kliniku prakticky nepoužitelné. Správný výsledek lze získat jedině po vysazení léčby a odeznění jejího účinku, pokud je však možné vzhledem ke klinickému stavu pacienta léčbu vysadit. Novou možností je použití tzv. DOACs Stop tablet, které léčivo z vyšetřované plazmy účinně vyváží. Jedna tableta poslouží k přípravě 0,5–1,5 ml plazmy zbavené DOACs a dle výrobce odstraní až 99,9 % léčiva z vyšetřované plazmy. Tableta dokáže z plazmy odstranit dabigatran, rivaroxaban, apixaban i edoxaban.

Cílem naší studie bylo vyzkoušet účinek těchto tablet a odstranit či alespoň snížit vliv DOACs na vybrané koagulační testy, u kterých je výrazné ovlivnění známé. Od každého léčiva jsme vybrali tři patientské vzorky s různými koncentracemi léčiva a u každého z nich jsme změřili vybranou paletu testů před a po aplikaci tablety DOACs Stop. U vzorků s dabigatranem byla vyšetřena před i po aplikaci tablety koncentrace léčiva v plazmě, protrombinový test, APTT, trombinový test, ředěný test s jedem Russelovy zmiže (dRVVT), neutralizační test s hexagonálními fosfolipidy, antitrombin, protein S a koagulační faktory II, VIII a IX. U xabanů jsme vyšetřili opět koncentraci léčiva před a po aplikaci tablety, protrombinový test, APTT, dRVVT, neutralizační test s hexagonálními fosfolipidy, anti-Xa aktivitu kalibrovanou na LMWH a koagulační faktory VIII, IX a X.

Z našich prvních výsledků je patrné, že tablety DOACs Stop významně snižují koncentraci DOACs ve vyšetřované plazmě. Efekt samozřejmě závisí na koncentraci léčiva. Čím vyšší je počáteční koncentrace léčiva ve vyšetřovaném vzorku, tím vyšší je i koncentrace zbytková po aplikaci DOACs Stop tablety.

Jedná se o jednoduchý, rychlý a relativně levný nástroj k odstranění DOACs z vyšetřovaného vzorku plazmy v případech, kdy je potřeba rychle a co nejpřesněji změřit testy, které jsou příslušnou antikoagulační léčbou mnohdy významně ovlivněny.

*Práce byla podpořena programem Progres-Q40/08.*

## L18

### PŘÍMÉ INHIBITORY KOAGULACE – ČASTÉ LABORATORNÍ KONZULTACE

Malíková I., Teplá E., Mráková A., Kvasnička J., Kvasnička T.

ULBLD Centrální hematologické laboratoře a Trombotické centrum VFN, Praha

Při podávání antikoagulační léčby je hemostatický systém ovlivněn různým způsobem závislým na druhu použitého antikoagulantia. S kumarinovými preparáty a hepariny mají lékaři i laboratoře dostatek zkušeností a testy pro jejich monitorování jsou již v laboratořích zavedeny. Kolem stanovení hladin přímých inhibitorů koagulace se doposud vyskytuje stále mnoho otázníků.

**Cíl:** Cílem naší studie bylo posoudit, jaké změny v hemostáze vykazuje působení přímých inhibitorů trombinu (dabigatran etexilate) a faktoru Xa (rivaroxa-

ban, apixaban a edoxaban) a jak se na míře ovlivnění podílí hladina léku v krvi.

**Metoda:** U souborů pacientů užívajících antikoagulační léčbu (Pradaxa 150 mg 2krát denně, Xarelto 20 mg 1krát denně, Eliquis 5 mg 2krát denně a Lixiana 30 mg 1krát denně) byl proveden odběr žilní krve v době minimální dávky léku a 2 hodiny po podání další dávky a následně byla vyšetřena kompletní koagulace, včetně testů monitorujícího antikoagulační léčbu. Zároveň byly vyšetřeny speciální testy pro vyloučení trombofilního stavu.

**Výsledky:** U většiny jedinců nebyl prodloužen protrombinový čas a hladina fibrinogenu. Stanovení proteinu C, S a LA bylo ovlivněno a došlo i k výraznému snížení generace trombinu a prodloužení nástupu generace trombinu.

**Závěr:** U vyšších hodnot koncentrace přímých inhibitorů koagulace, která vyjadřuje účinnost léčby, dochází k výraznému ovlivnění výsledků LA, především testu dRVVT, dále dochází k výraznému zvýšení hladiny proteinu S. Při celkovém posouzení trombofilního stavu je potřeba toto ovlivnění brát v úvahu. U hodnoty AUC a Peak Thrombin, které vyjadřují endogenní trombinový potenciál a maximální koncentraci trombinu, dochází k výraznému poklesu v závislosti na podané dávce použité antikoagulační léčby, takže je zřejmý velký vliv na generaci trombinu. Při vysazení léku může normální generace trombinu indikovat vymizení účinku léčby.

*Studie byla podpořena RVO-VFN64165/2018.*

## L19

### INTERFERENCE V DIAGNOSTICE LUPUS ANTIKOAGULANS

Zavřelová J., Chytrá D., Buliková A., Penka M.

*Oddělení klinické hematologie FN, Brno*

**Úvod:** Lupus antikoagulans (LA) je skupina antifosfolipidových protilátek, které jsou diagnostikovány na

základě jejich schopnosti ovlivňovat na fosfolipidech (PL) závislé reakce krevního srážení. Laboratorní diagnostika LA je komplikovaná, protože neexistuje 100% citlivý test, a dle stávajících doporučení SSC ISTH 2009, BCSH 2012 a CLSI 2014 zahrnuje screening – průkaz prodloužení fosfolipid závislých testů, průkaz inhibitoru a konfirmaci – průkaz fosfolipidové závislosti inhibitoru v přítomnosti nadbytku PL. Nedílnou součástí diagnostiky LA je vyloučení jiných koagulopatií a ovlivnění antitrombotickou léčbou. Důležitým předpokladem správné diagnostiky LA je také dodržení preanalytických podmínek, volba testů a standardizace vyšetření nastavením vlastních cut-off pro jednotlivé parametry.

**Cíl:** V práci prezentujeme zkušenosti s diagnostikou LA v přítomnosti jiných koagulopatií, interferujících složek krve, a ovlivnění léčbou (heparin, kumariny (VKA), přímé inhibitory F Xa a F IIa (DOAC)).

**Metoda:** 1. APTT: screening a korekce PTT-LA (Stago), konfirmace Actin FS (Siemens) a test HNP Staclot LA (Stago); 2. RVVT: screening a korekce DVV Test, konfirmace DVV Confirm (Sekisui); 3. SCT: screening, korekce, konfirmace HemosIL SCT (IL) na koagulometrech STA R Evolution, ST4Bio.

**Výsledky:** K vyloučení jiných koagulopatií provádíme základní koagulační testy, vyšetření koagulačních faktorů s použitím APTT se sníženou citlivostí k LA (v diluci)/fotometrickou metodou. K odlišení specifického inhibitoru využíváme průkaz specifity inhibitoru a dRVVT. Současný výskyt obou inhibitorů je možný. Při léčbě VKA vyšetřujeme LA ve směsi 1 : 1 s normální plazmou při PT-INR = 1,5–3,0. Při léčbě LMWH s odběrem nejlépe před aplikací používáme reagentie s neutralizací heparinu (RVVT, HNP). Dabigatran interferuje se všemi testy, xabany interferují více v dRVVT než v dAPTT. Při léčbě DOAC na rozdíl od VKA nedochází ke korekci, ale konfirmace je negativní.

**Závěr:** Vyšetření LA by mělo být prováděno mimo akutní stavy, před zahájením/s odstupem od přerušení antikoagulační léčby/před podáním další dávky DOAC. Interpretace výsledků testů LA musí být prováděna v kontextu všech laboratorních vyšetření včetně dalších aPL protilátek, s léčbou a klinickými projevy.