

Úvod

Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je závažný nežádoucí účinek léčby hepariny navozený aktivací destiček, monocytů a endotelu protilátkami proti komplexu destičkový faktor 4 (PF4)/heparin nebo jiný glykosaminoglykan (GAG). Pacienti s HIT jsou ohroženi rozvojem žilní a/nebo tepenné trombózy.[1, 2] Včasná diagnóza a náležitá léčba alternativním antikoagulans může zabránit vzniku dalších komplikací. Nespolehlivá diagnostika sebou nese řadu úskalí. Pokračování v antikoagulaci heparinem na základě falešně negativního diagnostického výsledku představuje riziko progresse tohoto život ohrožujícího syndromu a zbytečná léčba alternativním antikoagulans při falešně pozitivním výsledku diagnostiky vede k neadekvátnímu nárůstu rizika hemoragických komplikací (10-20% velkých krvácení).[3, 4]

Podle všeobecně akceptovaných doporučení má diagnostika HIT probíhat v několika krocích. Po stanovení pravděpodobnosti HIT, nejčastěji pomocí 4T's skórovacího systému [5, 6] je indikováno provedení imunologických testů s cílem prokázat protilátky anti-PF4/heparin a v případě jejich průkazu v následujícím kroku funkčními testy potvrdit nebo vyloučit schopnost těchto protilátek aktivovat destičky.[7, 8]

Současná klinická praxe diagnostiky HIT v České republice (ČR) má řadu rezerv.[9] Neexistuje doporučený postup diagnostiky a léčby HIT, který by reflektoval naše podmínky a možnosti. Nevíme nic o incidenci HIT u nás. Skórovací systém 4T's je používán hrstkou expertů, většina lékařů indikujících antikoagulační léčbu hepariny s ním nemá vlastní zkušenosti a laboratorní diagnostiku indikuje nestandardně. Dovedávna nebyl v ČR dostupný žádný imunologický test prokazující patognomické anti-PF4/heparin třídy IgG.[10, 11] Rychlý imunologický test ID-PaGIA H/PF4 Antibody Test, BIO-RAD je používán v omezeném počtu laboratoří pracujících s gelovou centrifugací a kromě protilátek třídy IgG detekuje i klinicky nevýznamné protilátky IgA a IgM. Jen zcela výjimečně laboratoře interpretují výsledky EIA testů podle míry optické denzity (OD), což zvyšuje specifitu testu a standardizaci diagnostiky [11] a podle našich informací jen zlomek pracovišť využívá rutinně konfirmační krok s přidáním heparinu do reakční směsi s cílem dále zvýšit specifitu testu [13-15]. Citlivý funkční test serotonin release assay (SRA) je v ČR špatně dostupný (podle našich informací pouze ve dvou laboratořích) a proto mnohá centra stále využívají konvenční test optické agregace destiček indukované heparinem, který je omezeně senzitivní i specifický [1, 16, 17]. Výzkumné aktivity jednotlivých hematologických center jsou nejspíše díky nízké incidenci syndromu nevýznamné.

Cíle projektu Biobanka HIT

Projekt má za cíl vytvoření banky vzorků séra, plazmy a izolované deoxyribonukleové kyseliny (DNA) pacientů s možnou nebo prokázanou akutní heparinem indukovanou trombocytopenií z kooperujících pracovišť České republiky. Vzorky budou využívány pro:

- Stanovení sensitivity a specifity všech diagnostických testů dostupných v současnosti v České republice resp. jejich logických kombinací vytvářejících v praxi použitelné diagnostické algoritmy
- Externí kontrolu kvality laboratorní diagnostiky HIT
- Výzkumné účely

Metodika

Soubor pacientů

Vzorky krve pro separaci séra nebo plazmy a izolaci DNA budou nabírány u 300 po sobě jdoucích pacientů, kteří naplňují alespoň 1 z klinických kritérií HIT:

- Trombocytopenie pod $150 \times 10^9/l$ a/nebo pokles počtu destiček o 30-50% i když nadir zůstává na $150 \times 10^9/l$ vzniklý od 5. dne podávání nefrakcionovaného heparinu (UFH), nízkomolekulárního heparinu (LMWH) nebo fondaparinuxu
- Podobné změny počtu destiček vzniklé během prvních 24 hodin terapie u pacientů s anamnézou užívání těchto léků v posledních třech měsících
- U kardiologických pacientů pokles destiček od 4. pooperačního dne (den operace je den 0) nebo trombocytopenie perzistující déle než 4 dny po výkonu [18]

- Progrese stávající nebo vznik nové trombotické epizody přes adekvátní dávkování uvedených antitrombotik
- Kožní nekróza v místech podkožní (s.c.) aplikace heparinů
- Krvácení do nadledvin jako následek trombózy *vv. suprarenales*
- Anafylaktoidní reakce vzniklá během 30' po i.v. bolusové injekci heparinů
- Další projevy HIT (diseminovaná intravaskulární koagulace – DIC apod.)[1,3,8]

S ohledem na nízkou incidenci HIT budou klinická vyšetření a odběry vzorků krve prováděny na kooperujících hematologických pracovištích v rámci celé České republiky. Široké spektrum pracovišť různě velkých a zaměřených předpokládáme zajistí podstatně reprezentativnější soubor pacientů.

Stanovení klinické pravděpodobnosti HIT

Klinická pravděpodobnost HIT bude stanovena s využitím 4T skórovacího systému (viz tabulka číslo 1).[5, 6,8] Klinické hodnocení pravděpodobnosti HIT a jeho výsledek rozdělující pacienty do skupin nízké (4T's 0-3 = body), střední (4T's 4-5 = bodů) a vysoké (4T's = 6-8 bodů) pravděpodobnosti HIT zapíše odesílající klinik spolu s krátkou epikrizou a s dalšími nezbytnými informacemi do průvodního protokolu [Průvodka k materiálu odesílaného do biobanky vzorků séra, plazmy a DNA pacientů s možnou nebo prokázanou HIT](#). Výsledek hodnocení pravděpodobnosti HIT bude po přijetí materiálu do našeho centra přehodnocen. Laboratorní testování bude prováděno u všech vzorků bez ohledu na pravděpodobnost HIT s cílem definovat specifitu a senzitivitu vlastního klinického hodnocení. Kromě toho bude dále stanovena senzitivita a specifita logických kombinací klinického hodnocení s výsledky vybraných laboratorních metod – validaci jednotlivých kroků resp. kompletních diagnostických algoritmů.

Odběry krve a zpracování odebraného materiálu v odesílajícím centru

Vzorky krve pro separaci séra nebo plazmy a izolaci DNA (tj. 5 zkumavek o objemu 7,5 ml pro separaci séra, 4 zkumavky o objemu 2,8 ml pro separaci plazmy a 1 zkumavka s EDTA aa 4 ml pro izolaci DNA) a event. pro vyšetření krevního obrazu (tj. 1 zkumavka s EDTA o objemu 2,8 ml) budou odebírány po podpisu informovaného souhlasu (Informovaný souhlas pacienta k odběru vzorků krve a skladování séra, plazmy a izolované deoxyribonukleové kyseliny v biobance vzorků pacientů s možnou nebo prokázanou heparinem indukovanou trombocytopenií) běžnou venepunkcí.

Identifikace pacienta/vzorků: Každý pacient bude veden pod specifickým kódem, který mu přidělí pracovníci Kliniky hematologie FN Ostrava.

Příklad kódu:HIT-01-001

01 je číselné označení centra (bude centru přiřazeno naším pracovištěm)

001 je pořadové číslo pacienta v centru

Na každém odesílajícím centru bude vedena evidence pacientů a jejich kódů. Všechny vzorky musí být označeny přiděleným kódem pacienta, a zda se jedná o plazmu (HIT-01-001-plazma), sérum (HIT-01-001-sérum), krev pro izolaci DNA (HIT-01-001-DNA), srážlivou krev (HIT-01-001-srážlivá krev), citrátovou krev (HIT-01-001-citrátová krev) nebo vzorek na krevní obraz (HIT-01-001-KO).Na průvodku se uvede kód pacienta, popř. iniciály, datum narození apod.

Zpracování vzorků: Sérum bude získáno centrifugací 10 minut při 1600 g, plazma centrifugací 15 minut při 2500 g. Sérum bude rozděleno do 18 alikvotů po 0,5 ml a 3 alikvoty po 1 ml a plazma do 8 alikvotů po 0,5 ml. Alikvotovaný a řádně označený materiál (jméno pacienta, rodné číslo, datum odběru, plasma/sérum) zamrazit nejlépe při -80°C (minimálně při -40°C). DNA se izoluje z plné krve. Uchovávání vzorků plné krve pro izolaci DNA v -80°C ne déle než 4 měsíce, izolování DNA v sériích po 8 vzorcích.

Transport vzorků

Pro transport vzorků bude využíváno společnosti PPL, nejspíše služby Express garantující dovoz vzorků do 24 hodin, resp. doručení zásilky do 10:00 hodin následujícího dne od vyzvednutí. Po uzavření smlouvy PPL dodá etikety se specifickým kódem (symbolizuje plátce), nutno doplnit adresu odesílatele a příjemce (lze použít stejnou etiketu pro všechna zasílající centra). Etiketa bude nalepována na transportní balíček.

Tabulka číslo 1: Skórovací systém 4T's [5,6,8]

	Skóre = 2	Skóre = 1	Skóre = 0
Trombocytopenie <ul style="list-style-type: none"> • Porovnej nejvyšší a nejnižší počet destiček v období jejich poklesu a urči % poklesu (vyber jen jednu možnost) 	<ul style="list-style-type: none"> • >50% pokles počtu destiček a nadir $\geq 20 \times 10^9/l$ bez operačního výkonu v posledních 3 dnech 	<ul style="list-style-type: none"> • >50% pokles počtu destiček ale anamnéza operace v posledních 3 dnech nebo • Jakákoli kombinace poklesu destiček a nadiru nesplňující kritéria Skóre 2 nebo Skóre 0 (např. 30-50% pokles destiček nebo nadir $10-19 \times 10^9/l$) 	<ul style="list-style-type: none"> • <30% pokles počtu destiček • jakýkoli počet destiček s nadirem $< 10 \times 10^9/l$
Doba poklesu počtu destiček nebo trombózy nebo kožní nekrózy či jiného projevu HIT <ul style="list-style-type: none"> • Den 0 = první den posledního podání heparinů (vyber jen jednu možnost) 	<ul style="list-style-type: none"> • Pokles destiček 5-10 den po zahájení podávání heparinů • Pokles destiček během prvního dne po zahájení podávání heparinů při anamnéze podání heparinů v posledních 5-30 dnech 	<ul style="list-style-type: none"> • Nejistý pokles počtu destiček 5-10 den po zahájení podávání heparinů (např. chybějící výsledek) • Pokles destiček během prvního dne po zahájení podávání heparinů při anamnéze podání heparinů v posledních 30-100 dnech • Pokles destiček po 10. dni aplikace heparinů 	<ul style="list-style-type: none"> • Pokles počtu destiček ≤ 4 den bez anamnézy předchozí aplikace heparinů v posledních 100 dnech
Trombóza nebo jiný klinický projev HIT <ul style="list-style-type: none"> • (vyber jen jednu možnost) 	<ul style="list-style-type: none"> • Potvrzená nova trombóza (žilní nebo tepenná) • Kožní nekróza v místě injekce heparinů • Anafylaktoidní reakce na i.v. aplikaci heparinů • Krvácení do nadledvin 	<ul style="list-style-type: none"> • Rekurentní žilní trombóza u pacienta s terapeutickou antikoagulací • Možná trombóza (před plánovaným potvrzením zobrazovací metodou) • Erytém v místě aplikace heparinu 	<ul style="list-style-type: none"> • možná trombóza
Jiná příčina trombocytopenie** <ul style="list-style-type: none"> • Dva body za kožní 	<ul style="list-style-type: none"> • Neexistuje žádné jiné vysvětlení poklesu počtu 	Jiná příčina poklesu počtu destiček je možná	Jiná příčina poklesu počtu destiček je přítomná

<p>nekrózu v místě aplikace heparinů i když není přítomná trombocytopenie</p> <ul style="list-style-type: none"> • (vyber jen jednu možnost) 	<p>destiček</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sepse bez ověřeného mikrobiálního fokusu • Trombocytopenie spojená se zahájením umělé plicní ventilace • Jiné 	<ul style="list-style-type: none"> • Operace v posledních 72 hodinách • Potvrzená bakteriémie/fungémie • Chemo- nebo radioterapie v posledních 20 dnech • DIC jiného původu než HIT • Potransfúzní purpura • Trombocytopenie < $20 \times 10^9/l$ u pacienta užívajícího léky s potenciálem polékové trombocytopenie (viz níže) • Nenekrotizující kožní léze v místě aplikace LMWH • Jiné
<p>Léky s potenciálem polékové imunitní trombocytopenie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Relativně častý výskyt trombocytopenie: inhibitory glykoproteinu IIb/IIIa (abciximab, eptifibatid, tirofiban), chinin, chinidin, sulfonamidy, karbamazepin, vancomycin • Méně častý výskyt trombocytopenie: aktinomycin, amitryptilin, amoxicillin/piperacilin/nafcilin, cefalosporiny (cefazolin, ceftazidim, ceftriaxon), celecoxib, ciprofloxacin, esomeprazol, fexofenadin, fentanyl, fucidin, furosemide, soli zlata, levofloxacin, metronidazol, naproxen, oxaliplatin, fenotyoin, propranolol, propoxyfen, ranitidine, rifampicin, suramin, trimethoprim a další 			

Objednávka transportu vzorků: Odesílající centrum bude transport objednávat nejlépe den před odběrem (nejpozději v den odběru do 10:00 hodin), nahlásí IČO (označuje uzavřenou smlouvu), místo vyzvednutí zásilky a čas vyzvednutí. V den odeslání zásilky bude odesílající centrum informovat kontaktní osobu ve FNO (telefonicky, elektronickou poštou).

Transportní balíček: Varianta 1 – centrifugace na centru (nejspolehlivější): alikvoty sérum/plazma v kryotubách + zkumavka na izolaci DNA bude uložena do Specimen Transport bag (speciální transportní sáček pro vzorky); varianta 2 – centrifugace u nás (jen v případech krátkého transportu do 4 hodin): zkumavky na odběr sérum/plazma + zkumavka na izolaci DNA bude uložena do Specimen Transport bag (speciální transportní sáček pro vzorky); chlazení po dobu transportu: k balíčku přidat chladicí bloček, bloček 48 hod. před transportem uložit do -20°C. Vše vložit do bublinkové obálky včetně průvody, na obálku nalepit etiketu s vyplněným odesílatelem a příjemcem.

Laboratorní testování

Laboratorní testování bude probíhat na pracovištích Oddělení klinické hematologie (úsek speciálních koagulací) a Kliniky hematonekologie (laboratoře biobanky) podle obecného diagnostického algoritmu (viz graf číslo 1: Obecný algoritmus diagnostiky HIT). U všech vzorků budou prováděna následující stanovení:

Krevní obraz pacienta: krevní obraz s diferenciálním rozpočtem leukocytů a stanovením počtu retikulocytů resp. frakce nezralých destiček.

ID-PaGIA H/PF4 Antibody Test, BIO-RAD: Rychlý imunologický test detekující protilátky třídy IgG, A a M ze séra pacienta, které způsobí aglutinaci částic polymeru s navázaným komplexem PF4/heparin. Podle studie srovnávající test s podobně polyspecifickým ELISA

Graf číslo 1: Obecný algoritmus diagnostiky HIT

Podezření na HIT [1,3,8,18]
<ol style="list-style-type: none"> 1. trombocytopenie pod $150 \times 10^9/l$ a/nebo pokles počtu destiček o 30-50% i když nadir zůstává na $150 \times 10^9/l$ vzniklý od 5. dne podávání nefrakcionovaného heparinu (UFH), nízkomolekulárního heparinu (LMWH) nebo fondaparinuxu 2. podobné změny počtu destiček vzniklé během prvních 24 hodin terapie u pacientů s anamnézou užívání těchto léků v posledních třech měsících 3. u kardiochirurgických pacientů pokles destiček od 4. pooperačního dne (den operace je den 0) nebo trombocytopenie perzistující déle než 4 dny po výkonu 4. progresse stávající nebo vznik nové trombotické epizody přes adekvátní dávkování uvedených antitrombotik 5. kožní nekróza v místech podkožní (s.c.) aplikace heparinů 6. krvácení do nadledvin jako následek trombózy <i>vv. suprarenales</i> 7. anafylaktoidní reakce vzniklá během 30' po i.v. bolusové injekci heparinu 8. další projevy HIT (diseminovaná intravaskulární koagulace – DIC apod.)

Stanovení pravděpodobnosti HIT s využitím 4T's skóre [5,6,8]		
Nízká pravděpodobnost (0-3 body)	Střední pravděpodobnost (4-5 bodů)	Vysoká pravděpodobnost (6-8 bodů)

Rychlé imunologické testy		
ID-PaGIA H/PF4 Antibody Test, BIO-RAD	STIc Expert HIT, STAGO	HemosILAcuStar HIT-IgG(PF4-H)

Citlivé a specifické ELISA testy	
Zymutest HIA MonoStripIgG, HyphenBioMed	AsserachromHPIA – IgGStago
Stanovení rozmezí OD + varianta s nadbytkem heparinu	Stanovení rozmezí OD + varianta s nadbytkem heparinu

Funkční testy		
Optická agregometrie z PRP	Impedanční agregometrie z WB	Serotonin release assay

testem (PVS/PF4 IgG/A/M HAT GTI[®], Brookfield) v souboru 213 pacientů s podezřením na HIT je senzitivita testu 95,5%, specificita 91,6%, pozitivní prediktivní hodnota 56,8% a negativní prediktivní hodnota 99,4%. Negativní výsledek testu ve skupině pacientů s nízkou nebo střední pravděpodobností HIT dle 4T's umožňuje vyloučit HIT. U ostatních pacientů (pozitivní výsledek ve všech rizikových skupinách i negativní výsledek ve skupině vysokého rizika) je diagnóza možná nebo pravděpodobná a je nutné provést další testy k potvrzení či vyloučení HIT.[26] Zařazení této dobře ověřené a často publikované metody do našeho projektu umožní přímé srovnání s ostatními dostupnými rychlými skrínigovými testy (STIc Expert HIT STAGO a HemosILAcuStar HIT-IgG(PF4-H)).

STIc Expert HIT, STAGO: Rychlý imunologický test pro kvalitativní detekci protilátek třídy IgG proti komplexu PF4/heparin na principu flowimmunoassay. Ve studii 452 pacientů s možnou HIT (hodnocení pravděpodobnosti podle 4T's) byl porovnán se dvěma monospecifickými IgG ELISA testy, s D-PaGIA H/PF4 Antibody Test, BIO-RAD a s funkčním testem heparinem indukované aktivace destiček. Ze srovnání vyplývá negativní prediktivní hodnota testu 100% a nejnižší výskyt falešně pozitivních výsledků (n=29).[27] Zařazení testu do studie umožní zhodnotit jeho roli v navrhovaném diagnostickém algoritmu.

HemosILAcuStar HIT-IgG(PF4-H): Rychlá, plně automatizovaná metoda stanovení specifických IgG resp. polyspecifických IgG/A/M proti komplexu PF4/heparin. Ze studií vyplývá vysoká senzitivita a negativní prediktivní hodnota obou testů (100%), vyšší specificita monospecifického IgG testu ve srovnání s polyspecifickým (85-96,5% vs 73-81,2%)[28, 32] a podle recentní studie na souboru 448 pacientů s možnou HIT podobně vysoká senzitivita (>95%) a srovnatelný rozdíl ve specificitě (96% vs 78%)[29].

Předpoklad je, že monospecifické IgG testy STIc Expert HIT STAGO a HemosILAcuStar HIT-IgG(PF4-H) budou mít v přímém srovnání s ID-PaGIA H/PF4 Antibody Test BIO-RAD na vlastním souboru pacientů vyšší specificitu i prediktivní hodnotu což by při srovnatelné nebo vyšší senzitivě nových testů umožnilo 1) zlepšit dostupnost diagnostiky, 2) snížit četnost

falešně pozitivních výsledků, 2) zrychlit diagnostiku a 3) redukovat potřebu hůře dostupných ELISA a funkčních testů a tedy náklady na vyšetření.

Zymutest HIA MonoStriplgG, HyphenBioMed: Jde o monospecifickýIgG ELISA test pro detekci protilátek proti komplexu PF4/heparin. Ze studie srovnávající test s PF4 Enhanced[®] Solid Phase ELISA GTiDiagnostics v souboru 459 pacientů s podezřením na HIT vyplynula vysoká negativní prediktivní hodnota (NPV) obou testů (100%) a podobně vysoká pozitivní prediktivní hodnota (PPV). Implementace konfirmačního kroku s nadbytkem heparinu zvýšilo PPV obou testů, ale snížila NPV testu Zymutest HIA MonoStriplgG.[30] Z jiných studií vyplývá vysoká specifita monospecifickéhoIgG testu (90-100%).[31, 32] Problémem je podle našeho názoru výrobcem udávané poměrně úzké rozmezí optické denzity (OD) mezi negativním ($OD < 0,3$) a pozitivním výsledkem ($OD > 0,5$). Cílem studie je stanovit míru OD, která predikuje nejen pozitivitu testu ale především vysoké riziko HIT definované silnou pozitivitou SRA (≥ 50 uvolnění serotoninu) podobně jako to stanovili Warkentin et al. pro jiné ELISA testy.[39] Séra proto budou rozdělena do skupin podle výše OD (0,3-1,0, 1,0-1,5, 1,5-2,0 a $> 2,0$) a pro každou skupinu bude definována pravděpodobnost silné positivity SRA.

AsserachromHPIA – IgGStago: Jde o monospecifickýIgG ELISA test pro detekci protilátek proti komplexu PF4/heparin, u kterého doposud nebyla publikována studie ověřující jeho vlastnosti v klinické praxi (publikovaná byla jen studie s polyspecifickou variantou prokazující všechny imunoglobulinové třídy [33]) a nebyla stanovena hodnota OD pro negativní a pozitivní výsledek (výsledek OD je porovnáván s OD standardu, který je součástí setu). Pro praxi bude užitečné jednak přímé srovnání s testem Zymutest HIA MonoStriplgG, HyphenBioMed ale především stanovení míry OD predikující riziko HIT podle pravděpodobnosti silně pozitivní SRA (viz výše nastíněná metodika) a navíc zařazení konfirmačního kroku s nadbytkem heparinu, který u tohoto testu doposud nebyl výrobcem popsán.

PF4 Enhanced[®] Solid Phase ELISA GTiDiagnostics: Jde o v literatuře často citovaný monospecifickýIgG ELISA test pro detekci protilátek proti komplexu PF4/heparin [34-36], který není v ČR dostupný. Přímé srovnání s ostatními zařazenými testy by bylo velmi užitečné.

Heparinem indukovaná agregace destiček – optická agregometrie z plazmy bohaté na destičky: Jde o funkční v ČR nejlépe dostupný funkční testy s dobrou specificitou ale nízkou senzitivitou (75-80%).[37] Podle našich informací doposud nebylo testováno resp. publikováno, zda-li využití destiček od čtyř náhodně vybraných dárců neumožní zrušit limit metody daný „necitlivostí“ destiček jediného dárce jak je to zvykem v případě heparinem indukované aktivace destiček.[38] Paralelně bude testováno sérum pacienta s destičkami 4 různých náhodně vybraných dárců destiček jednotlivě resp. se směsí. Cílem bude zhodnotit, zda-li jedno stanovení se směsí destiček bude mít srovnatelnou senzitivitu jako pracnější a nákladnější variantu se 4 separátními stanoveními.

Heparinem indukovaná agregace destiček – impendanční agregometrie z plné krve: Rychlý funkční test pro detekci aktivace destiček HIT-protilátkami. Ze srovnání s optickou agregometrií a se SRA vyplývá vyšší senzitivita metody a potřeba validace metody v dalších studiích.[40] Naše studie umožní posoudit přínos využití destiček od čtyř náhodně vybraných dárců (jednotlivě a ve směsi) a optimální kombinaci s ostatními testy v rámci diagnostických algoritmů použitelných v ČR.

Serotonin release assay (SRA): Funkční metoda považovaná za zlatý standard. Testování bude probíhat v sériích koordinovaně se stanovením funkčních testů v laboratořích Oddělení klinické hematologie ÚLD FNO s využitím destiček čtyřech stejných dárců (jednotlivě a ve směsi) s cílem snížit pravděpodobnost falešně negativního výsledku funkčního testování s „necitlivými“ destičkami jediného náhodně vybraného dárce.

Zajištění a vyšetření dárcovských destiček: Cílem je použít krevní destičky od dobře vyšetřených zdravých dárců pro výše uvedené funkční testy – heparinem indukovanou agregací destiček měřenou z PRP optickou agregometrií, z plné krve měřenou impendančně a serotonin release assay. Odběr a zpracování vzorků krve od dárce bude proveden po podpisu informovaného souhlasu dárce (Informovaný souhlas dárce destiček pro provedení funkčních testů na heparinem indukovanou trombocytopenii). Vzorky krve dárců destiček budou vyšetřovány následovně: krevní obraz se stanovením diferenciálního rozpočtu a frakce nezralých destiček, základní koagulační testy v rozsahu PT, APTT, fibrinogen, d-dimery,

PFA-100 epinefrin/kolagen a ADP/kolagen, spontánní agregace destiček, testy na stickplatelet syndrom (adenozindifosát, epinefrin), ultrasenzitivní CRP, flowcytometrie (markery aktivace destiček) a kromě toho bude izolovaná DNA dárců destiček pro budoucí výzkumné projekty.

K celkové prezentaci výsledků bude použito běžné deskriptivní statistiky. Pro detekci násobných změn (foldchange) mezi skupinami parametrů se sníženou a zvýšenou hladinou bude použito parametrických testů (t-test). Pro zhodnocení klinického významu nalezených změn bude použit log-rank test, chi-kvadrát; pro porovnání hladin standardních biochemických a hematologických parametrů neparametrické testy – Mann-Whitney, Kruskal-Wallis.

Očekávané výsledky

1. Průkaz protilátek proti komplexu PF4/H schopných aktivovat destičky u 3-6 (v krajním případě až 15) pacientů, tj. 1–2(5)% osob ze souboru 300 vyšetřených pacientů s podezřením na HIT (s respektem k zastoupení z pohledu HIT různě rizikových skupin (riziko 1 až 5% u kardiochirurgických a ortopedických pacientů *versus* nízké riziko 0,1-1% u interních pacientů a gravidních žen)[19-25].
2. Stanovení prediktivní hodnoty, senzitivity a specifity klinického hodnocení pravděpodobnosti HIT podle 4T's systému v podmínkách různých typů pracovišť České republiky. Vzhledem k omezenému využívání skórovacích systémů lékaři klinické praxe České republiky lze očekávat odlišnosti od publikovaných výsledků [6].
3. Stanovení prediktivní hodnoty, senzitivity a specifity klinického hodnocení pravděpodobnosti jednotlivých laboratorních testů dostupných v České republice.
4. Stanovení prediktivní hodnoty, senzitivity a specifity klinického hodnocení pravděpodobnosti logických kombinací klinického skórovacího systému s různými laboratorními testy. Výsledky studie bude možné považovat za validaci jednoduchých a tudíž dobře dostupných, resp. složitějších ale specifitějších diagnostických algoritmů.
5. Vytvoření banky vzorků bez průkazu protilátek proti komplexu PF4/heparin, s průkazem těchto protilátek neschopných aktivovat destičky a s průkazem protilátek s potenciálem aktivace destiček využitelných pro výzkumné účely.
6. Projekt má i komerční aspekt – banka vzorků pacientů s HIT umožní testování nových diagnostických setů na zakázku farmaceutických/labodiagnostických firem.

Literatura

1. Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1-7
2. Rauova L, Hirsch JD, Greene TK et al. Monocyte-bound PF4 in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2010; 116(23): 5021-31
3. Greinacher A, Warkentin TE. Treatment of heparin-induced thrombocytopenia: an overview. In: *Heparin-induced Thrombocytopenia*, 3rd edn. New York: Marcel Dekker, Inc., 2007; 283-318
4. Smythe MA, Warkentin TE, Woodhouse AL, Zakalik D. Venous limb gangrene and fatal hemorrhage: adverse consequences of HIT "overdiagnosis" in a patient with antiphospholipid syndrome. *Am J Hematol* 2011; 86: 188-91
5. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Br J Haematol* 2003; 121: 535-55
6. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE et al. Evaluation of pretest clinical score (4T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 759-65
7. Francis JL. A critical evaluation of assays for detecting antibodies to the heparin-PF4 complex. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30(3): 359-68
8. Linkins LA, Dans AL, Moores LK et al. Treatment and Prevention of Heparin-Induced Thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012; 141: e495S-e530S

9. Gumulec J. Možnosti diagnostiky heparinem indukované trombocytopenie v České republice. *Vnitř Lék* 2012; 58(7&8): 564-70
10. Amiral J, Wolf M, Fischer A et al. Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996; 92: 654-59
11. Greinacher A, Juhl D, Strobel U et al. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM and IgA classes. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1666-73
12. Greinacher A, Ittermann T, Bagemühl J et al. Heparin-induced thrombocytopenia: towards standardization of platelet factor 4/heparin antigen tests. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2025-31
13. Whitlatch NL, Perry SL, Ortel TL. Anti-heparin/platelet factor 4 antibody optical density values and the confirmatory procedure in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2008; 10: 678-84
14. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; 7(Suppl 1):9-12
15. Althaus K, Strobel U, Warkentin TE, Greinacher A. Combined use of the high heparin step and optical density to optimize diagnostic sensitivity and specificity of an anti-PF4/heparin enzyme-immunoassay. *Thromb Res* 2011; 128(3): 256-60
16. Pouplard C, Amiral J, Borg JY et al. Decision analysis for use of platelet aggregation test, carbon 14-serotonin release assay, and heparin-platelet factor 4 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 700-706
17. Warkentin TE. Platelet count monitoring and laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1415-1423
18. Lillo-LeLouët A, Boutouyrie P, Alhenc-Gelas M, et al. Diagnostic score for heparin-induced thrombocytopenia after cardiopulmonary bypass. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(11):1882-1888
19. Oliveira GB, Crespo EM, Becker RC et al. Incidence and prognostic significance of thrombocytopenia in patients treated with prolonged heparin therapy. *Arch Intern Med* 2008; 168:94-102
20. Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood*. 2005; 106(8):2710-2715
21. Warkentin TE, Sheppard JA, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2000;96(5):1703-1708
22. Sanson BJ, Lensing AW, Prins MH, et al. Safety of low-molecular-weight heparin in pregnancy: a systematic review. *Thromb Haemost*. 1999;81(5):668-672.
23. Lepercq J, Conard J, Borel-Derlon A, et al. Venous thromboembolism during pregnancy: a retrospective study of enoxaparin safety in 624 pregnancies. *BJOG*. 2001;108(11): 1134-1140.
24. Fausett MB, Vogtlander M, Lee RM, et al. Heparin-induced thrombocytopenia is rare in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;185(1):148-152.
25. Girolami B, Prandoni P, Stefani PM, et al. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized medical patients treated with subcutaneous unfractionated heparin: a prospective cohort study. *Blood*. 2003;101(8): 2955-2959.
26. Poplard C, Gueret P, Fouassier M et al. Prospective evaluation of the 4T's score and particle gel immunoassays specific to heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1373-9.
27. Sachs UJ et al. Evaluation of a new nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb Haemost* 2011; 106:1197-1202.
28. Legnani C, Cini M, Pili C et al. Evaluation of a new automated panel of assays for the detection of anti-PF4/heparin antibodies in patients suspected of having heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 2010;104(2):402-9.
29. Althaus K, Hron G, Strobel U et al. Evaluation of automated immunoassays in the diagnosis of heparin induced thrombocytopenia. *Thromb Res*. 2013;131(3): 85-90.

30. Bakchoul T, Giptner A, Bein G et al. Performance characteristics of two commercially available IgG-specific immunoassays in the assessment of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb Res.* 2011 Apr;127(4):345-8.
31. Pouplard C, Leroux D, Regina S et al. Effectiveness of a new immunoassay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia and improved specificity when detecting IgG antibodies. *Thromb Haemost.* 2010 Jan;103(1):145-50.
32. Van Hoecke F, Devreese K. Evaluation of two new automated chemiluminescent assays (HemosIL® AcuStar HIT-IgG and HemosIL® AcuStar HIT-Ab) for the detection of heparin-induced antibodies in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Int J Lab Hematol.* 2012 Aug;34(4):410-6.
33. Martinuzzo ME, Cerrato GS, Iglesias Varela ML et al. Levels of antiplatelet factor 4-heparin antibodies and 4T score for heparin induced thrombocytopenia. *Medicina (B Aires).* 2012;72(1):19-22.
34. Shaheed G, Malkovska V, Mendoza J et al. PF4 ENHANCED assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in complex medical and surgical patients. *Crit Care Med.* 2007 Jul;35(7):1691-5.
35. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; 7(Suppl 1):9-12
36. Selleng S, Schreier N, Wollert HG, Greinacher A. The diagnostic value of the anti-PF4/heparin immunoassay high-dose heparin confirmatory test in cardiac surgery patients. *Anesth Analg.* 2011 Apr;112(4):774-6.
37. Greinacher A, Amiral J, Dummel V et al. Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion* 1994; 34:381-5
38. Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1991; 66:734-6
39. Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC et al. Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1304-12
40. Morel-Kopp MC, Tan CW, Brighton TA et al. Validation of whole blood impedance aggregometry as a new diagnostic tool for HIT: results of a large Australian study. *Thromb Haemost.* 2012 Mar;107(3):575-83