

Současné možnosti laboratorní diagnostiky heparinem indukované trombocytopenie

Slavík L., Svobodová G., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Procházková J.
Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Souhrn

Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) představuje závažnou komplikaci použití heparinu. IgG protilátky vážící destičkový faktor 4 (PF4) a heparin spouští klinickou manifestaci HIT. Pouze část protilátek však disponuje schopností aktivovat destičky a tyto mohou být identifikovány vyšetřením agregace destiček (funkční vyšetření). Současné metodické postupy - heparinem-indukovaná agregace destiček (HIPA) a 14C-serotonin uvolňovací reakce (SRA) představují zdoluhavá a náročná vyšetření při klinickém podezření na HIT proto se v poslední době rozvinula řada nových metod. Pro stanovení HIT byla námi použita impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate® (Verum Diagnostika, Mnichov, Německo) (MEA) jako heparinem indukované agregační techniky a Technozym HIT Ig ELISA test (Technoclone GmbH, Vídeň, Rakousko). MEA metoda využívá senzibilizace dárcovských destiček plazmou pacienta v přítomnosti heparinu v koncentraci 0,5 IU/ml. MEA stanovení bylo prováděno v 300 µl citrátové plné krve s dárcovskými trombocyty, 150 µl heparinu (konečná koncentrace 0,5 resp. 100 IU/ml) a 150 µl plazmy chudé na destičky (PPP) vyšetřovaného pacienta. Změny v agregaci byly monitorovány po dobu 20 min. Výsledky ELISA vyšetření byly vyhodnoceny jako negativní při OD < 0,500 a pozitivní OD > 0,500 dle doporučení výrobce diagnostického stanovení. Vyšetřili jsme 65 pacientů, kteří měli klinicky střední a vyšší riziko vzniku HIT dle 4T skóre. Veškeré vzorky byly vyšetřeny ELISA testem a MEA metodikou, kde pozitivní vzorky byly dále potvrzovány vysokou koncentrací heparinu. Ve vyšetřovaném souboru se nám podařilo prokázat, že MEA disponuje dostatečnou citlivostí a vyšší specificitou. V souboru pacientů byla nalezena 7,8% pozitivita MEA oproti 10,9% pozitivitě ELISA. Stanovení MEA je, na rozdíl od stejně kvalitních ELISA metodik, použitelnější pro praxi při detekci destičky aktivujících HIT protilátek.

Klíčová slova: heparinem indukovaná trombocytopenie, funkční test na HIT, ELISA stanovení HIT

Summary

Slavík L., Svobodová G., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Procházková J.: Current possibilities of laboratory diagnosis heparin-induced thrombocytopenia

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) represents a serious complication of heparin use. IgG antibodies binding platelet factor 4 (PF4) and heparin trigger the clinical manifestations of HIT. However, only a portion of the antibodies have the ability to activate platelets, and these can be identified by a platelet aggregation test (functional testing). Current methods – heparin-induced platelet aggregation (HIPA) and 14C-serotonin release assay (SRA) – are time-consuming and difficult if HIT is clinically suspected; therefore, numerous new methods have been developed recently. To determine HIT, impedance aggregometry using the Multiplate® analyzer (Verum Diagnostika, Munich, Germany) (MEA) as heparin-induced aggregation techniques and the Technozym HIT Ig ELISA test (Technoclone GmbH, Vienna, Austria) were used. The MEA method uses sensitization of donor platelets with patient plasma in the presence of heparin at a concentration of 0.5 IU/mL. MEA was performed in 300 µL of citrated whole blood with donor platelets, 150 µL of heparin (final concentration of 0.5; 100 IU/mL) and 150 µL of platelet-poor plasma (PPP) from the patient. Changes in aggregation were monitored for 20 minutes. The ELISA test results were evaluated as negative for OD < 0.500 and positive for OD > 0.500 according to the manufacturer's diagnostic setup. We examined 65 patients at a clinically intermediate and higher risk of HIT according to the 4T score. All samples were examined by the ELISA test and MEA, with positive samples being further confirmed by high-concentration heparin. In the studied group, we demonstrated that MEA has sufficient sensitivity and higher specificity. In the group of patients, there were 7.8% of positive results found by MEA as compared with 10.9% determined by ELISA. Unlike the ELISA methods of the same quality, MEA is more suitable for detecting platelet-activating HIT antibodies in practice.

Key words: heparin-induced thrombocytopenia, functional test for HIT, ELISA determination of HIT

Transfuzie Hematol. dnes, 18, 2012, No. 2, p. 76–80.

Úvod

Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je klinicko-patologický syndrom, který je diagnostikován u pacientů imunizovaných podáním jak nefrakcionovaných

(UFH), tak nízkomolekulárních (LMWH) heparinů a je pro něj typický vývoj protilátek proti komplexům destičkového faktoru 4/heparinu a IgG protilátek aktivujících destičky.

HIT je imunitně indukované onemocnění, jehož příčinou je tvorba protilátek proti komplexu PF4/heparin. PF4

je homotetramer, který se skládá ze 4 jednotek o molekulové hmotnosti 7,8 kDa.

V klinické praxi jsou popsány 2 typy HIT. HIT I se manifestuje poklesem trombocytů po přímém proagregačním účinku heparinu a dochází k němu časně po nasazení heparinu. HIT II je způsoben protilátkami proti komplexu heparin/PF4 a vzniká s odstupem po podání heparinu (1).

Onemocnění se vyskytuje u 0,5–5 % pacientů. Nižší výskyt je udáván u LMWH v důsledku nižší tvorby protilátek ve srovnání s UFH (2).

Patofyziologie

K rozvoji HIT dochází v důsledku uvolňování protilátek proti neoepitopům na základě elektrostatické interakce PF4 vyloučeného z granúl destiček a heparinu. Vazba Fc fragmentů protilátky třídy IgG vede k aktivaci signální dráhy a agregaci krevních destiček, které přispívá dále k rychlé destrukci krevních destiček a uvolnění mikročástic, endoteliálnímu poškození, a nakonec trombóze. Nejčastější třídou imunoglobulinů je IgG, která jediná disponuje schopností vazby na FcR destiček, ale přítomná může být i třída IgM. Destičky při aktivaci ztrácejí svůj diskoidní tvar a tvoří četná pseudopodia. Při tomto procesu se odštěpují membránové částice s výraznou prokoagulační aktivitou. Generuje se trombin a uvolňuje se PF4, který je klíčový pro vývoj klinické manifestace HIT (3).

Nevyvázaný PF4 se váže na veškeré molekuly podobné heparinu za tvorby komplexu s IgG protilátkami. Tento komplex se váže na Fc receptor destičky, kterou tím aktivuje. Aktivované destičky vzájemně agregují, agregáty jsou odstraňovány z krevního oběhu jako nežádoucí částice a tímto konzumpčním mechanismem je vyvolána trombocytopenie (1). Jedním z pravděpodobných potencujících faktorů rozvoje HIT II může být genetická odchylka destičkového receptoru. Literárně je popsána záměna aminokyseliny v molekule receptoru, kde v pozici 131 je aminokyselina Arg nahrazena aminokyselinou His (2).

Vyšetření HIT

Obecně existují dva druhy laboratorních testů pro stanovení HIT. Antigenní stanovení detekující přítomnost imunoglobulinů, které vážou antigenní neoepitopy v H:PF4 komplexech. Funkční testy detekující přítomnost protilátek HIT tvořících imunitní komplexy, které způ-

sobí aktivaci krevních destiček. Každý typ testu poskytuje jedinečné a vzájemně se doplňující informace. Žádný z laboratorních testů by neměl být použit samostatně pro potvrzení nebo vyvrácení diagnózy HIT.

Sérologické testy krevních destiček

Mezi sérologické testy řadíme ELISA testy, které jsou založené na interakci protilátky s cílovým antigenem, jež tvoří komplex PF4/heparin. V současné době se rozvíjí gelové testy. Princip jejich stanovení spočívá v reakci polystyrénových částic potažených komplexem rekombinantního PF4/heparin nebo polyvinylsulfonátu s HIT protilátkami (7).

Sérologické testy se obecně vyznačují nejvyšší senzitivitou a nejnižší specificitou.

Funkční testy krevních destiček

Funkční testy jsou metody využívající dárcovské destičky, jež jsou aktivovány reakcí se sérem nebo plazmou pacienta. Přídavek definované koncentrace heparinu k PF4 z dárcovských destiček, vede k tvorbě komplexů H:PF4, které formují a prezentují antigen HIT. H: PF4 imunitní komplexy tvoří cíl pro HIT protilátky a způsobují aktivaci destiček (4).

Zlatý standard funkčních testů tvoří serotonin uvolňovací test (SRA), jež v současné době slouží jako základ pro vývoj řady nových metodik. SRA je prováděn s krevními destičkami, které jsou inkubovány s ¹⁴C značeným serotoninem. Krevní destičky nesoucí Fc χ receptor jsou aktivovány IgG imunitními komplexy. Aktivace destiček vede k uvolnění radioaktivně značeného serotoninu. Aktivace destiček je obvykle definována jako 20% nebo vyšší uvolňování serotoninu. Silnější aktivita pravděpodobně naznačuje vysokou afinitu nebo vysoké titry protilátek. Bylo prokázáno, že test je více specifický pro pacienty s HIT způsobenou trombocytopenií a / nebo trombózou. Pro samotný postup je důležitá aktivace pomocí dvou hladin heparinu, nízké (0,1 U / ml) a vysoké (100 U / ml) (5). Za pozitivní výsledek HIT je hodnocena aktivace krevních destiček pouze v přítomnosti heparinu o nízké koncentraci, ale ne v přítomnosti vysoké hladiny heparinu. Za nespécifický nálezn je považováno, když vzorek způsobuje aktivaci krevních destiček při nízkých i vysokých koncentracích heparinu, což znamená, že protilátky jsou pravděpodobně zaměřeny i proti jiným antigenům než H:PF4.

Tab. 1.

| Typ vyšetření | Specifita | Senzitivita | Použitelnost |
|---------------------------|-----------|-------------|---------------------------------------|
| Serotonin uvolňovací test | Vysoká | Vysoká | Finančně, časově a personálně náročné |
| Funkční testy | | | |
| MEA | Vysoká | Vysoká | Snadno proveditelné |
| LTA | Vysoká | Nízká | Snadno proveditelné |
| HIPA | Vysoká | Velmi nízká | Dostupné, časově náročné |
| Lumiagregometrie | Vysoká | Vysoká | Finančně i časově náročné |
| Flowcytometrie | Vysoká | Vysoká | Finančně i časově náročné |
| Antigenní testy | | | |
| ELISA | Nízká | Vysoká | Dostupné, časově náročné |

Tyto vzorky mohou obsahovat modifikované imunitní komplexy nebo protilátky, jako je anti-HLA nebo protilátky proti destičkovým receptorům. Použití dvoukoncentračního testu pro diagnózu HIT zvyšuje specifitu in vitro stanovení a minimalizaci "falešně pozitivních výsledků". Podobný postup aktivace destiček je podstatou heparinem indukované agregace destiček (HIPA), která využívá vizuální kontrolu shlukování krevních destiček v průběhu času. HIT protilátky mohou být zjištěny také pomocí analýzy uvolňování ADP, jež se měří lumi-agregometrie nebo měřením uvolňování mikročásteček z krevních destiček detekovaných pomocí průtokové cytometrie (6, 8–10).

Další skupinu funkčních testů tvoří agregační testy. Pro tyto testy je charakteristické snadné provedení bez nutnosti práce s radioaktivitou, rychlá dostupnost, ale bohužel zatím nižší senzitivita. Mezi tyto testy řadíme optickou agregometrii (LTA) a vícenásobnou elektrodovou agregometrii (MEA), která má dle literárních poznatků potenciál senzitivitu zvýšit (11, 12).

LTA je založena na změně optické propustnosti vzorku v závislosti na vzniku agregátů krevních destiček po jejich senzibilizaci plazmou s protilátkami proti PF4 za přítomnosti heparinu o koncentraci 0,1 IU/ml. K měření se používá dárcovská plazma bohatá na destičky, která se získává centrifugací při 1000 x g.

MEA test je založen na stejném principu jako optická agregometrie, pouze s tím rozdílem, že indukovaná destičková agregace je měřena s koncentrací heparinu (0,5 IU/ml) a pro stanovení je využíváno plné krve.

Nejlepší volbou diagnostiky HIT je kombinace všech skupin testů (13, 14). Tedy ELISA, agregace a SRA. Tento postup zvyšuje senzitivitu až na 83 %.

Soubor pacientů

Tato studie byla provedena na souboru vzorků krve od pacientů s podezřením na HIT odeslaných do naší laboratoře od ledna do října 2010. Vzorky citrátové plazmy byly analyzovány ihned pomocí MEA metody nebo uloženy při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro ELISA stanovení. Z dokumentace pacientů byla stanovena pravděpodobnost HIT pomocí 4T bodovacího systému (15).

Odběr krve

Odběr krve byl realizován do jednorázové vakuové zkumavky s použitím jehly VACUETTE® (Greiner Bio-One, Rakousko) – obsahující pufrovaný roztok citrátu sodného o koncentraci 0,109 mol/l (3,2 %). Systém zajišťuje promíchání antikoagulantu s krví v požadovaném poměru 1:10. Následně je krev ve zkumavce opatrně promíchána tím, že je zkumavka několikrát opatrně převrácena dnem vzhůru a transportována do laboratoře, kde je krev nejpozději do 2 hodin zpracována pro MEA stanovení. Vzorek je pak centrifugován 3 minuty při 4440 x g, z horní vrstvy je odpipetováno 0,5 ml plazmy chudé na destičky (PPP) a ta je zamrazena a uchována při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

do provedení ELISA analýzy. Pro vlastní analýzu je vzorek rozmrazován v termostatu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 min.

Dárcovské trombocyty

Dárcovské trombocyty byly získány přímo ze směsi dvou vzorků plné krve odebrané do VACUETTE® (Greiner Bio-One, Vídeň, Rakousko) obsahující pufrovaný roztok citrátu sodného o koncentraci 0,109 mol/l (3,2 %).

Impedanční agregometrie

Ke stanovení aktivace destiček pomocí impedanční agregometrie bylo použito analyzátoru Multiplate (Dynabyte Informationssysteme GmbH, Mnichov, Německo). Vlastní stanovení bylo provedeno následně: k 300 μl citrátové krve s dárcovskými trombocyty bylo přidáno 150 μl roztoku heparinu o koncentraci 2 IU/ml, po inkubaci 2 minuty při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla reakce zahájena přidáním 150 μl PPP. Měření impedance probíhalo 20 minut za kontinuálního míchání vzorku uvnitř kvety. Konečný výsledek je průměr maximální impedance naměřené po 20 minutách na obou párech elektrod. Konfirmace byla následně provedena stejným postupem, pouze koncentrace heparinu byla použita 100 IU/ml.

ELISA TECHNOZYM HIT IgG

ELISA stanovení bylo provedeno pomocí vyšetřovací soupravy TECHNOZYM HIT IgG (Technoclone GmbH, Vídeň, Rakousko). Stanovení zachycuje pozitivitu protilátek ve třídách IgG. Výsledky ELISA vyšetření byly vyhodnoceny jako negativní při $\text{OD} < 0,500$ a pozitivní $\text{OD} > 0,500$ dle doporučení výrobce stanovení.

Statistické hodnocení

Pro statistické hodnocení byl použit Fischerův test nezávislosti a McNemarův test shody četností. McNemarův test se zaměřuje pouze na pozorování, u kterých jsme při opakovaném měření zaznamenali rozdílné výsledky dle níže uvedeného vztahu.

$$X^2 = \sum_{i < j} (N_{ij} - N_{ji})^2 / (N_{ij} + N_{ji})$$

N_{ij} počet objektů, u nichž je první měření B_1 a druhé měření B_j stejné nebo naopak rozdílné.

Výsledky a diskuse

Soubor pacientů

Vyšetření přítomnosti HIT bylo provedeno na skupině 65 pacientů léčených v předchozích 14 dnech hepariny (90 % LMWH, 3 UFH a 7 % kombinace UFH s LMWH). Vyšetření bylo provedeno u skupiny pacientů splňujících klinická kritéria možného výskytu HIT protilátek (označovaná jako 4T kritéria) – trombocytopenie, čas, kdy dojde k poklesu krevních destiček, trombóza nebo její následky a vyloučení jiné příčiny trombocytopenie (tab. 2).

V souboru bylo 34 žen (52 %) a 29 mužů (48 %). Průměrný věk u žen byl 56,5 roku s mediánem 64,5. U mužů byl průměrný věk 64,2 s mediánem 68.

Tab. 2.

| 4 T skóre | |
|--------------------|----|
| Nízké (1–3 body) | 3 |
| Střední (4–5 bodů) | 57 |
| Vysoké (6–8 bodů) | 0 |

MEA

Celý soubor pacientů byl vyšetřen metodou MEA na přítomnost protilátek aktivujících destičky. Pro vyšetření bylo použito modifikované metodiky s dárcovskými destičkami.

Positivita vzorků (cut-off 20 AU) aktivovaných pomocí nízké koncentrace heparinu byla potvrzována inhibicí prostřednictvím vysoké koncentrace heparinu (tab. 3).

Tab. 3.

| | Negativní | Pozitivní |
|---|-----------|-----------|
| MEA indukce heparinem o konc. 0,5 IU/ml | 56 | 4 |
| MEA indukce heparinem o konc. 100 IU/ml | 1 | 3 |

ELISA

Celý soubor pacientů byl současně vyšetřen imunologickým testem. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 4.

Výsledky vyšetření HIT v souboru pacientů léčených oběma typy heparinů ukázaly, že použité metodiky poskytují značně rozdílné výsledky. Tento závěr plně koresponduje s teoretickými modely, na jejichž základě byla vyšetření heparinem indukované trombocytopenie navržena (15).

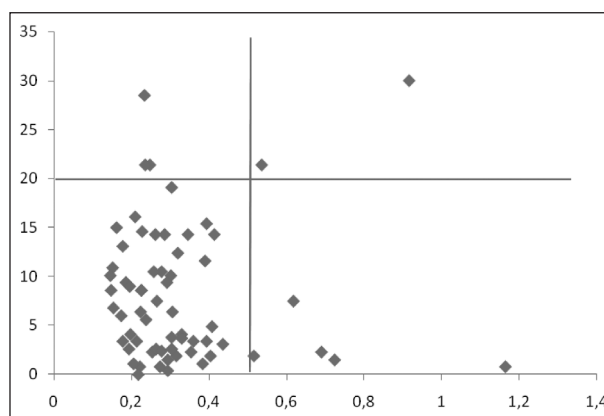
Z naměřených dat plyne, že pouze u dvou pacientů (3,1 %) z 5 pozitivních metodou MEA resp. 7 ELISA metodou byl pozitivní nálezn potvrzen oběma metodami. Oba pacienti měli 4T skóre 6 s poklesem trombocytů o více než 50 % mezi 5. a 10. dnem po podání heparinu a s vyloučenou jinou příčinou trombocytopenie. U dalších pacientů byl pozitivní pouze jeden z testů. Positivita ELISA testu na přítomnost protilátek HIT byla 10,9 %, pozitivita MEA na přítomnost aktivovaných trombocytů inhibo-

Tab. 4.

| | Negativní | Pozitivní |
|-------------------------------------|-----------|-----------|
| ELISA vazba na komplex heparin PF/4 | 53 | 7 |

Tab. 5.

| | | ELISA IgG | | |
|-----|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| | | Negativní (počet, %) | Pozitivní (počet, %) | Celkový (počet, %) |
| MEA | Negativní (počet, %) | 54 84,4 % | 5 7,8 % | 59 92,2 % |
| | Pozitivní (počet, %) | 3 4,7 % | 2 3,1 % | 5 7,8 % |
| | Celkový (počet, %) | 57 89,1 % | 7 10,9 % | 64 100 % |



Graf 1. Porovnání MEA a ELISA testu. Graf zaznamenává korelaci výsledků obou metod. U MEA je pozitivita nad hodnotu 20,0 AU/min a u ELISA nad 0,500 Abs.

vanou vysoce koncentrovaným UFH byla 7,8 %. Positivita alespoň v jednom z testů byla 15,6 %. Pomocí statistického hodnocení dle McNemara je patrné, že se jedná o dvě nezávislá stanovení.

Závěr

Diagnostika HIT stále zůstává velmi komplikovanou klinicko-laboratorní problematikou. Nicméně nové diagnostické možnosti poskytují značný potenciál pro řešení tohoto problému (16).

ELISA metodika vyšetření protilátek nám poskytuje informaci o přítomnosti všech typů protilátek (převážně IgG) proti komplexu destičkovému faktoru 4 s heparinem, čímž je splněn požadavek na vysokou senzitivitu, nicméně neposkytuje žádnou informaci o samotné aktivaci krevních destiček, která je nezbytná ke klinické manifestaci HIT ve formě trombocytopenie.

MEA metodika nám naopak poskytuje informaci pouze o aktivovaných krevních destičkách v přítomnosti heparinu, což plně koresponduje s modelem aktivace krevních destiček při klinické manifestaci HIT. Nicméně jsme ochuzeni o informaci, zda jsou přítomny protilátky, které zatím neaktivují krevní destičky, ale které mohou tuto reakci vyvolat v delším časovém intervalu.

Posun ve vývoji funkčních testů umožňuje rozšíření této diagnostiky do širokého spektra laboratoří, což bylo dosud hlavní nevýhodou SRA (17) a limitovalo to využití laboratorní detekce protilátek v klinické praxi. Kombinace funkčních testů s imunologickými vyšetřeními po-

skytuje komplexní obraz o protilátkové odpovědi při imunizaci organismu po podání heparinů (18).

Poděkování

Podpořeno grantem IGA MZD ČR NS 10319-3/2009 86-14 a grantovým projektem LF-2012-007.

Literatura

- Králová S, Klodová D, Gumulec J, et al. Heparinem indukovaná trombocytopenie. *Vnitř Lék* 2006; 52: 98–106.
- Malý J, Pecka M, Dulíček P, et al. Jsou všechny nízkomolekulární hepariny stejné? *Trombóza a hemostáza* 1999; Malý J. & Pecka M., 24–25.
- Novotný J, Konvičková L. Heparinem indukovaná trombocytopenie, *Vnitř Lék* 1998; 44: 282–287.
- Albeiro L, Kimmerle S, Baumann A, et al. Rapid determination of anti-heparin/platelet factor 4 antibody titers in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, *Am J Med* 2003; 114: 528–536.
- Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Söderström G. Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma. *Thromb Res* 1979; 15: 531–41.
- Stewart MW, Etches WS, Boshkov K, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: an improved method of detection based on lumi-aggregometry. *Brit J Haematol* 1995; 91: 173–177.
- Meyer O, Salama A, Pittet N et al. Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *Lancet* 1999; 354: 1525–1526.
- Pauzner R, Greinacher A, Selleng K, Althaus K, Shenkman B, Seligsohn U. False-positive tests for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1070–1074.
- Polack B, Schved JF, Boneu B. Preanalytical recommendations of the 'Groupe d'Etude sur l'Hemostase et la Thrombose' (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. *Haemostasis* 2001; 31: 61–68.
- Tomer A, Masalunga C, Abshire TC. Determination of heparin-induced thrombocytopenia: A rapid flow cytometric assay for direct demonstration of antibody - mediated platelet activation. *Am J Hematol* 1999; 61: 53–61.
- Elalamy I, Galea V, Hatmi M, Gerotziapas GT. Heparin-induced multiple electrode aggregometry: a potential tool for improvement of heparin-induced thrombocytopenia diagnosis, *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1932 – 1934.
- Morel-Kopp MC, Aboud M, Tan CW, Kulathilake C, Ward C. Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies, *Thromb Res* 2010; 125: 234–239.
- Walenga JM, Jeske WP, Wood JJ, et al. Laboratory tests for heparin-induced thrombocytopenia: a multicenter study. *Semin Hematol* 1999; 36: 22–28.
- Greinacher A, Levy JH. HIT happens: diagnosing and evaluating the patient with heparin-induced thrombocytopenia. *Anesth Analg* 2008; 107: 356–358.
- Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Br J Haematol* 2003; 121: 535–55.
- Kelton JG, Warkentin TE. Diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, still a journey, not yet a destination. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 611–613.
- Levy-Toledano S, Gallet, C, Nadal F, et al. Phosphorylation and dephosphorylation mechanism in platelet function a tightly regulated balance. *Thromb Haemost* 1997; 78: 226–227.
- Selleng S, Malowsky B, Itterman T, et al. Incidence and clinical relevance of anti-platelet factor 4/heparin antibodies before cardiac surgery, *Am Heart J* 2010; 160: 362–369.

*Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Hemato-onkologická klinika
LF UP a FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
77520 Olomouc
e-mail:ludek.slavik@fnol.cz*