CAT
Critically Appraised Topic

Titel: Heparine-geïnduceerde trombocytopenie

Author: Marina Mukovnikova
Supervisor: Els Bailleul
Search/methodology verified by:
Date: 10/05/2011

CLINICAL BOTTOM LINE

Heparine-geïnduceerde trombocytopenie is een potentieel levensbedreigende complicatie van heparinetherapie die een snelle diagnose vereist. Om de diagnose van HIT te stellen moet er een gegronde klinische verdenking zijn, gebaseerd op het Warkentin pretest scoring systeem. Labotesten hebben de ondersteunende rol in de diagnose van HIT. Immunologische antigeentesten (ELISA) zijn zeer sensitief en een negatieve test sluit de diagnose uit bij lage of intermediaire score. Daar de specificiteit van immunoassays relatief laag is, moet een positieve test bevestigd worden met een functionele test. Functionele testen hebben een hoge specificiteit en worden als confirmatie testen beschouwd, maar ze zijn technisch ingewikkeld en niet geschikt voor gebruik in een routine-labo. Om deze reden willen wij een snelle en gemakkelijk uit te voeren functionele test op Multiplate® aggregometer implementeren.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Heparine-geïnduceerde trombopenie type II (HIT II) is een immuun gemedieerde stoornis die door de vorming van de antistoffen tegen het complex heparine- plaatjesfactor 4 (PF4) ontstaat.

HIT II is gekenmerkt door een daling van bloedplaatjes ≥ 50% op de dag 5-14 na het starten van heparine en door een verhoogd risico op trombose.
Een vroege onset (binnen 24 uur) is mogelijk indien de patiënt in voorafgaande 3 maanden is behandeld met heparine. Tevens zijn zeldzame gevallen van HIT beschreven zonder trombocytopenie of met een laat begin (na het stoppen van heparine). HIT II is een potentieele levensbedreigende toestand met een breed spectrum van klinische presentatie: diepe veneuze trombose, trombose van cerebrale sinussen, pulmonaire embolie, CVA en myocard infarct. Huidnecrose

kan voorkomen op de injectieplaats en acute reacties zoals koorts, rillingen, flushing en transiënte amnesie zijn beschreven.

In tegenstelling tot HIT II, heeft HIT type I geen klinische gevolgen en is gekenmerkt door een lichte daling van bloedplaatjes binnen de eerste 2 dagen na het starten van heparine met snelle normalisatie van het bloedplaatjes aantal. Niet-functionele HIT antistoffen zijn frequent aangetroffen bij patiënten na cardio-vasculaire heelkunde (tot 50%) en hebben geen klinisch belang.

Zowel ongefractioneerde heparine als LMWH kunnen HIT veroorzaken met een incidentie van 0,1 – 5,0% bij de patiënten behandeld met heparine gedurende meer dan 5 dagen. Naast de behandelingsduur zijn er drie belangrijke factoren: gebruik van ongefractioneerde heparine, chirurgische patiënten en het vrouwelijke geslacht. De dosis van heparine is weinig van belang. In de literatuur zijn er enkele gevallen beschreven van een HIT na een bolus van 250 U heparine of bij het gebruik van heparine-geïmpregneerde catheters.

Een immunologisch mechanisme ligt aan de basis van pathogenese van HIT II. Heparine kan een lichte activatie van bloedplaatjes in de circulatie geven, waardoor enige secretie van plaatjesfactor 4 (PF4) optreedt. Het PF4 bindt aan het heparine in de circulatie. Door de binding van PF4 aan heparine ontstaan de PF4 neo-antigenen waartegen een antistof respons kan optreden. De antistof bindt aan het heparine-PF4-complex en het aldus gevormde complex van heparine, PF4 en antistof bindt via het Fc-deel van de antistof aan cellen die een Fc-receptor op hun oppervlak hebben, waaronder bloedplaatjes. De bloedplaatjes worden door de binding van het complex sterk geactiveerd. Er vindt destructie van bloedplaatjes plaats, leidend tot de trombocytopenie die HIT kenmerkt.
PF4 komt vrij met verdere vorming van heparine-PF4-complexen en dus het ingaan van een vicieuze cirkel. Er worden door de geactiveerde bloedplaatjes micropartikels afgesnoerd die sterk stollingsbevorderend kunnen zijn. Ook de endotheelcel wordt via de binding van de antistof aan het PF4 heparansulfaat complex geactiveerd, hetgeen leidt tot de expressie van weefselfactor op het oppervlak van de endotheelcel. De weefselfactor expressie, waarschijnlijk tezamen met de gevormde micropartikels, verzorgen een excessieve stollingsactivatie waardoor de ernstige trombo- embolische complicaties, zowel veneus als arterieel, bij HIT- patiënten kunnen worden verklaard. Bij HIT-patiënten komen, zoals boven geschetst, antistoffen voor tegen complexen van heparine en PF4, maar veel zeldzamer ook tegen IL-8 en NAP-2.

De immunologie van HIT is verwarrend en niet typisch voor primaire of secundaire immuunrespons. Anti-PF4/H antistoffen zijn voornamelijk IgG’s die al dan niet vergezeld zijn van IgM en IgA’s. Simultane stijging van immunoglobulines van verschillende klassen (zonder typische seroconversie) enkele dagen na blootstelling aan heparine pleit voor secundaire respons. Terwijl een snelle daling van IgG titer binnen 50-80 dagen na het stoppen of soms bij de voortgezette heparinetherapie ertegen pleit.

De klinische diagnose van HIT is vaak moeilijk door de comorbiditeit en aanwezigheid van meerdere potentieele oorzaken van trombopenie, zoals infectie,

sepsis, TTP, DIC, beenmergonderdrukking… Bovendien kunnen verschillende medicaties er oorzaak van zijn.

Snelle diagnose van HIT type II is essentieel om trombo -embolische complicaties te voorkomen. Omdat het risico op trombose hoog is, moet heparine (UFH of LMWH) zo snel mogelijk gestopt worden. Daarna wordt overgeschakeld naar directe trombine inhibitoren, zoals Lepirudine of Argatroban of naar Danaparoid (indirecte Xa inhibitor). Overdiagnose van HIT is ook te vermijden want deze preparaten zijn duurder en hebben een behoorlijk bloedingsrisico.

Om een diagnose te stellen moet er eerst een gegronde klinische verdenking zijn op de aanwezigheid van HIT. Klinische probabiliteit van HIT kan geëvalueerd worden met behulp van het Warkentin pretest scoring systeem, gekend als 4Ts. Op basis van dit systeem kunnen alle patiënten onderverdeeld worden in drie groepen: hoog risico (score 6-8), intermediair risico (score 4-5) en laag risico (score 0-3).

	Points (0, 1, or 2 for each of 4 categories; maximal possible score=8)		
Findings	**2**	**1**	**0**
Thrombocytopenia	>50% fall or platelet nadir 20–100 x 10^9/L	30%–50% fall or platelet nadir 10–19 x 10^9/L	Fall <30% or platelet nadir < 10 x 10^9/L
Timing of platelet count fall or other sequelae	Clear onset between day 5–14; or less than 1 day (if heparin exposure within past 30 days).	Consistent with immunization but not clear, or onset of thrombocytopenia after day 10, or within 1 day and prior heparin exposure within past 31–100 days.	Platelet count falls too early, without recent heparin exposure.
Thrombosis of other sequelae (eg, skin lesions)	New thrombosis; skin necrosis post heparin bolus acute systemic reaction.	Progressive or recurrent thrombosis; erythematous skin lesions; clinically suspected thrombosis not yet proven.	None.
Other cause for thrombocytopenia not evident	No other cause for platelet count fall is evident.	Possible other cause is evident.	Definite other cause is present.

Criteria for estimating pre-test probability of HIT using the 4 T score (from Warkentin and Bryant et al)
The pre-test probability score would be high for a score of 6–8, intermediate for a score of 4–5, and low for a score of 0–3.

Het tweede aspect, de laboratoriumdiagnostiek van HIT is gebaseerd op de vereenvoudigde pathogenese. Er bestaat geen eenvoudige test om de diagnose van HIT met zekerheid te stellen. Daarom moet de diagnose gebaseerd worden op sterke klinische verdenking van HIT. Laboratorium testen hebben een ondersteunende rol en moeten altijd geïnterpreteerd worden in het licht van klinische contekst.

QUESTION(S)

1) Welke diagnostische mogelijkheden en guidelines bestaan er om diagnose van HIT te stellen en wat is hun plaats, voor- en nadelen?

2) Kunnen we functionele aggregatietesten op Multiplate® aggregometer, implementeren om de diagnose van HIT te ondersteunen of uit te sluiten?

SEARCH TERMS

1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: thrombocytopenia, HIT, diagnosis*
2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)*
3) *Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (http://sumsearch.uthscsa.edu/), National Guideline Clearinghouse (http://www.ngc.org/), Institute for Clinical Systems Improvement (http://www.icsi.org), The National Institute for Clinical Excellence (http://www.nice.org.uk/), Cochrane (http://www.update-software.com/cochrane, Health Technology Assessment Database (http://www.york.ac.uk/inst/crd/htahp.htm)*
4) *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; http://www.nccls.org/), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; http://www.ifcc.org/ifcc.asp), American Diabetes Association (ADA; http://www.diabetes.org/home.jsp), National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC; http://diabetes.niddk.nih.gov/), Westgard QC (http://www.westgard.com), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; http://www.cms.hhs.gov/clia/)*
5) *UpToDate Online version 12.2 (2004)*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)

1. Treatment and prevention of heparin–induced thrombocytopenia: American College of Chest Physicians Evidence- Based Guideline on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy (8 edition)

T.E. Warkentin, A. Greinacher Chest 2008; 133: 340S-380S

2. Clinical Practice Guideline on the evaluation and management of heparin–induced thrombocytopenia (HIT) American Society of Hemalogogy, adapted in part from the: American College of Chest Physicians Evidence- Based Guideline on Antithrombotic and thrombolytic Therapy (8 edition)

Original Articles

3. Whole blood impedance aggregometry detects heparin–induced thrombocytopenia antibodies

M-C Morel-Kopp, M. Aboud Trombosis Reseach 2010; 125: 234-239

4. Heparin–induced thrombocytopenia: evaluation of IgG and IgM ELISA assays

M-C Morel-Kopp, M. Aboud et al. Int Jnl Lab. Hem 2010

5. Heparin–induced multiple electrode aggregometry: a potential tool for improvement of heparin–induced thrombocytopenia diagnosis

I. Elalamy, V. Calea et al. J Thromb Haemost 2009 ; 7:1932-34

6. A clinical-laboratory approach contributing to a rapid and reliable diagnosis of heparin–induced thrombocytopenia

B. Denys, V. Stove et al. Trombosis Reseach 2008 ; 123 : 137-145

7. Timely diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia in a frequent request, low incidence single centre using clinical 4T's score an particle gel immunoassay

A. Bryant,1. Joyce Low,1. Steven British Journal of Hematology 2008; 143: 721–726

8. Validation of the high-dose heparin confirmatory step for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia.

Whitilatch NL, Kong DF Blood. 2010 Sep 9; 116(10):1632-3.

9. What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia?

Lo GK, Sigouin CS, Warkentin TE Am J Hematol. 2007; 82(12):1037-43

10. Usefulness of pretest clinical score (4Ts) combined with immunoassay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia.

Gruel Y, Regina S, Pouplard C. Curr Opin Pulm Med. 2008; 14(5):397-402

11. False- positive tests for heparin- induced thrombocytopenia in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: a rebuttal.

Alpert DR, Salmon JE J Thromb Haemost 2010 Jun; 8(6): 1439-41

12. The 4Ts scoring system for heparin- induced thrombocytopenia in medical- surgical intensive care units patients.

Crowther MA, Cook DJ J Crit Care. 2010 Jun; 25(2):287-93

13. The particle gel immunoassay as a rapid test to rule out heparin- induced thrombocytopenia?

Schallmoser K, Drexler C J Thorac Cardiovasc Surg. 2009; 137(3):781-3

14. Prospective evaluation of the '4Ts' score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia

Pouplard C, Gueret P, J Thromb Haemost 2007 Jul; 5(7): 1373-9

15. Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays.

Warkentin TE, Sheppard JI, J Thromb Haemost. 2008 Aug; 6(8):1304-12.

16. Heparin- induced thrombocytopenia: when a low platelet count is a mandate for anticoagulation Ortel TL Hematology 2009: 225-232

17. Heparin- induced thrombocytopenia

Ronald Gounden, Marc Blockman Cardiovasc J Afr 2008; 19: 325-327

18. Heparin- induced thrombocytopenia: current status and diagnostic challenges.

Otis SA, Zehnder JL Am J Hematol 2010 Sep; 85(9); 700-6

19. Evaluation of a new automated panel of assays for the detection of anti-PF4/heparin antibodies in patients suspected of having heparin-induced thrombocytopenia

Legnani C, Cini M Thromb Haemost. 2010 Aug 2; 104(2); 402-9

20. Contribution of platelet microparticles generation assay to the diagnosis of type II heparin-induced thrombocytopenia.

Mullier F, Bailly N Thromb Haemost 2010 Jun; 103(6); 1277-81

21. Heparin- induced thrombocytopenia (HIT II) – a drug- associated autoimmune disease.

Nowak G Thromb Haemost 2009 Nov; 102(5): 887-91

22. Studies of the immune response in heparin- induced thrombocytopenia.
Warkentin TE, Sheppard J-A Blood 2009; 113: 4963-4969

23. Heparin- dependent antibodies and thrombosis without heparin- induced thrombocytopenia.

Bream- Rouwenhorst HR, Hobbs RA Pharmacotherapy 2008 Nov; 28(11): 1401-7

24. An algorithm for resolving " indeterminate" test results in platelet serotonin release

assay for invertigation of heparin-induced thrombocytopenia.

Moore JC, Arnold DM J Thomb Haemost. 2008 Sep; 6(9): 1595-7

25. Anti-heparin/platelet factor4 antibody optical density values and the confirmatory

procedure in the diagnosis of heparin- induced thrombocytopenia

Whitlatch NL, Perry SL Thromb Haemost 2008 Oct; 100(4): 678-84

26. Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia

T. Bakchoul, A. Giptner J Thomb Haemost. 2009; 7: 1260-5

27. PF4- dependent immunoassays and inferential detection of HIT antibodys.

T. Warkentin J Thomb Haemost 2007; 5: 232-234

28. Heparin- induced thrombocytopenia

A. Greinacher J Thomb Haemost 2009: 7 (suppl.): 9-12

Reference Works, Handbooks and Databases

27. UpToDate

S. Coutre Heparin –induced thrombocytopenia

28. Algorithmic Approach to thrombophilic disorders

Jerry B. Lefkowitz Heparin- induced thrombocytopenia, chapter 21: 287-94

Posters, "grey literature", presentations

29. Whole blood impedance aggregometry: a new tool to diagnosis and study the physiopathology of type- II HIT

F. Mullier, N. Bailly et al. Multiplate User Meeting Congress, hotel Ter Elst, Edegem, oct 6, 2010

1) Welke diagnostische testen bestaan er en wat zijn voordelen en nadelen?

Laboratorium testen kunnen in twee categorieën worden ingedeeld:
I. Meting van de antistoffen in het serum van de HIT- patiënt (immunologische antigeentesten)
II. Meting van het vermogen van het serum van de patiënt om bloedplaatjes van gezonde mensen te activeren (functionele testen).
Beide types metingen hebben hun voor- en nadelen.

I. Immunologische antigeentesten

Commerciële ELISA's zijn de meest gebruikte immunoassays voor de meting van antistoffen in de sera van patiënten die verdacht worden van HIT. Daarbij is de microtiterplaat gecoat met heparine-PF4-complex en wordt de hoeveelheid gebonden antistof gemeten met een mengsel van gelabelde antistoffen tegen humaan IgG, IgA en IgM. Die ELISA's meten dus zowel de IgG als IgA en IgM klassen van antistoffen tegen het heparine-PF4-complex, maar niet de antistoffen tegen IL-8 of NAP-2.

ELISA's zijn zeer sensitieve assays (sensitiviteit van 91% tot > 97%) met NPV > 95% (tot boven 99%), dus een negatieve test is sterk suggestief voor de afwezigheid van HIT.

Een groot nadeel is relatief lage specificiteit (74-86% afhankelijk van de gebruikte test) met matige PPV (50-93%) die kan verklaard worden door het meten van zowel pathogene IgG als niet-pathogene IgA en IgM. Bovendien kunnen ELISA testen vals positief zijn bij aanwezigheid van antifosfolipiden antistoffen, SLE en pseudotrombopenie[11].
De specificiteit kan verbeterd worden door:

1) IgG specifieke ELISA te gebruiken [4,16]:
   Morel-Kopp et al. hebben in hun studie IgG specifieke ELISA met twee niet specifieke vergeleken (Asserechrom IgGAM en Zymutest IgGAM) en hebben getoond dat de specificiteit van IgG specifieke ELISA hoger is (85-93%). Dit resultaat stemt overeen met andere studies, bvb volgens *Warkentin et al.* kan specificiteit verhoogd worden tot 89% en zelfs tot 99% (afhankelijk van gebruikte test) door gebruik van IgG specifieke ELISA met toch concomitante lichte verlaging van de sensitiviteit

2) Hoge dosis heparine confirmatietest: inhibitie van positieve test ≥ 50% in de aanwezigheid van heparine exces (100 U/ml)[6,25]. Persisterende positieve test wijst op de aanwezigheid van antistoffen tegen PF4, maar niet tegen de PF4/heparine complex. Toch, vertonen enkele patiënten geen inhibitie door hoge dosis heparine test ondanks de aanwezigheid van HIT antistoffen [3]

3) Een bijkomende bevestiging kan bekomen worden door gebruik van monoklonale antistoffen die het FcyRIIA receptor van bloedplaatjes blokkeren zodat HIT antistoffen onwerkzaam worden [18].

Ondanks de hoge sensitiviteit kan een klein deel van de patiënten gemist worden. De verklaring is dat bij HIT-patiënten antistoffen kunnen voorkomen die tegen IL-8 of NAP-2 zijn gericht (op PF4 sterk gelijkende eiwitten).
Recent zijn er ELISA's ontwikkeld (bvb **Zymutest® HIA**, BioMed) die ook antistoffen tegen IL-8 en NAP-2 detecteren.
Ook wordt bij de momenteel beschikbare ELISA-kits geen standaard curve geleverd. Het gevolg is dat boven een arbitraire uitslag van bijvoorbeeld 0,5 optische dichtheid (OD) eenheden een patiëntenmonster als positief wordt beoordeeld en onder de 0,5 OD-eenheden als negatief.

Verschillende studies hebben getoond dat de OD goed correleert met de klinische probabiliteit van HIT en het risico op trombose. Volgens de studie van *T. Bakchoul et al*. was de gemiddelde OD van HIT patiënten 2,9 (range 0,6-3,8) en 91% van HIT patiënten hadden een OD >1,0. De gemiddelde OD van ELISA bij de patiënten met niet functionele antistoffen was 0,924 (range 0,42-3,14) en enkel 47% van sera hadden een OD =1,0 bereikt [26]. *T. Warkentin et al.* hebben in hun prospectieve studie de OD vergeleken met serotonine release assay, een gouden standaard in de diagnose van HIT. De auteurs hebben gevonden dat bij zwak positieve ELISA (OD = 0,4-1,0) de probabiliteit van HIT < 5% was, bij een OD =1,5 was de probabiliteit ≥ 50% en bij sterk positieve ELISA (OD > 2,0) - tot boven 90%[15].
ELISA testen zijn relatief arbeidsintensief, de TAT van ELISA's is 2-3 uur en de testen worden in batch uitgevoerd. Daarom zijn ze niet kosteneffectief voor individuele patiënt.

Sinds enkele jaren is er partikel gel immunoassay beschikbaar (**ID-H/PF4 PaGIA**, DiaMed). Dat is een snelle (15 min) en gemakkelijk uit te voeren test die gebaseerd is op de agglutinatietechniek. Het plasma van de patiënt komt in contact met polymerenpartikels gecoat met PF4/ heparine complexen. De partikels bevinden zich in een kolom gevuld met de gel waarin ook anti- humaan antiglobuline werd toegevoegd. Na de incubatie en centrifugatie wordt de test afgelezen. Agglutinatie van de partikels wijst op een positief resultaat en de aanwezigheid van HIT antistoffen.
De sensitiviteit en NPV van PaGIA zijn vergelijkbaar met ELISA of volgens enkele vergelijkende studies liggen iets lager. Zoals ELISA heeft partikel gel immunoassay een relatief lage specificiteit met een PPV 37,5-56,8% [13,14].
Wanneer de PaGIA test wordt gebruikt samen met 4Ts systeem is de posttest probabiliteit van HIT bij de positieve test 58,2% en 98% bij intermediaire en hoge score respectievelijk, terwijl een negatieve test HIT uitsluit bij lage score (NPV=100%)[14].
Partikel gel immunoassay (PaGIA), zou als voordeel ten opzichte van ELISA-metingen kunnen hebben dat er geen standaard curve hoeft te worden ingezet voor patiëntenmonsters die veelal solitair moeten worden bepaald.

Recent is er een studie gepubliceerd waarin *Legnani et al.* twee nieuwe snelle immunoassays hebben geëvalueerd: **HemosIL AcuStar HIT-IgG** (IgG specifiek) en **HemosIL AcuStar HIT- Ab** die alle klassen van immunoglobulines detecteert. Deze testen zijn volledig geautomatiseerde, snelle (30 min), semi-kwantitatieve immunoassays die vergelijkbare sensitiviteit hebben als commerciële ELISA's[19].

Samengevat, moeten antigeentesten altijd geïnterpreteerd worden in het licht van klinische kontekst [9,10].Volgens de studie van *Lo G.K et al.* kan er een overdiagnose zijn tot 100% indien alle positieve ELISA's als bevestiging van HIT worden beschouwd onafhankelijk van pretest probabiliteit score. Immunologische testen zijn niet geschikt als screeningstesten bij de patiënten na cardio-vasculaire heelkunde zonder klinische symptomen en voor evaluatie van patiënten met lage score[16].

II. Functionele testen

Functionele testen zijn gebaseerd op de activatie van bloedplaatjes door incubatie van plasma of serum van een patiënt met bloedplaatjes van gezonde donoren. Dat kunnen aggregatie- of secretietesten betreffen.

De " serotonine release assay" (SRA) is een secretietest waarbij de inductie van de secretiereactie door aanwezige HIT antistoffen wordt gemeten. Bij deze test worden donorbloedplaatjes eerst opgeladen met serotonine gelabeld met radioactieve koolstof-14. Radioactieve serotonine wordt in de dense granula gedeponeerd en wordt na incubatie met het plasma van de patiënt gesecreteerd zodat de radioactiviteit kan gemeten worden. SRA heeft een sensitiviteit 88-100% en is de meest specifieke functionele test met specificiteit tot 100%. Tegenwoordig wordt SRA beschouwd als een gouden standaard in de confirmatie van HIT. Maar deze test is tijdrovend, technisch ingewikkeld en vergt gebruik van radioactiviteit en goed opgeleid personeel. Daarom wordt deze test uitgevoerd alleen in een referentielabo (niet in België).

" Heparin-induced platelet activation test" (HIPA) is een andere frequenter gebruikte functionele test. Bij deze test wordt plaatjesrijk plasma van een donor geïncubeerd met het serum van de patiënt samen met therapeutische concentratie (0,1-1,0 U/ml) en daarna supratherapeutische concentratie (100U/ml) van heparine. Indien bloedplaatjes aggregeren bij lage concentratie van heparine en niet bij 100U/ml wordt de test als positief beschouwd. De blanco test met fysiologisch zout moet negatief zijn.
In de literatuur zijn er verschillende modificaties van HIPA beschreven: in een aggregometer, in microtiterplaten, in combinatie met secretietest (ATP release)… Dat kan met plaatjesrijk plasma of gewassen bloedplaatjes zijn. Recent is er een aggregatietest beschreven op de Multiplate® met gebruik van volbloed.
Functionele testen zijn meer specifiek dan antigeentesten en worden beschouwd als definitieve diagnostische (of confirmatie) testen.
De voornaamste nadelen zijn gebrek aan standaardisatie en technische complexiteit. Bovendien bestaat er grote variabiliteit in de mate van respons tussen verschillende donoren, hetgeen waarschijnlijk het gevolg is van de heterogeniteit van de FcyRIIA receptor.

Vals negatieve resultaten zijn ook mogelijk indien patiënt IIb/IIIa antagonisten krijgt of bij “niet-functionele plaatjes” van een donor.
Verschillende studies suggereren dat de sensitiviteit van HIPA kan verhoogd worden door gebruik van een pool bloedplaatjes van meerdere donoren (minstens drie) en door donoren te screenen met een aggregatie agonist (ADP en andere) en met plasma van een patiënt gekend met HIT antistoffen.
Aspecifieke aggregatie is ook mogelijk door de kruisreactiviteit alloantistoffen van de patiënt met de bloedplaatjes van de donor.

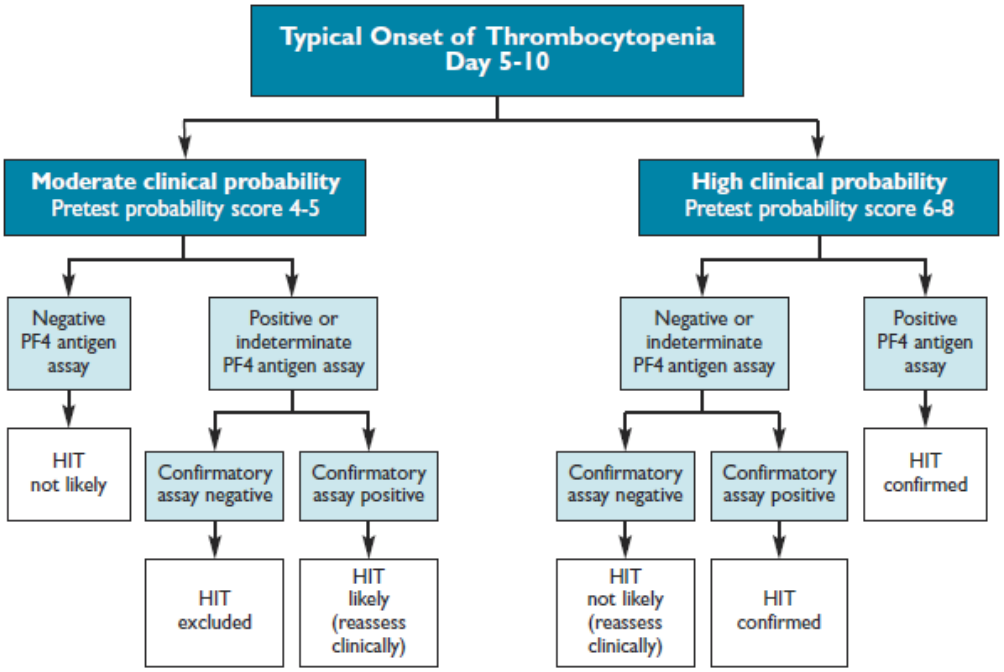
Flowcytometrie blijkt een veelbelovende alternatief te zijn voor snelle screening van HIT. Dat is ook de enige test waarbij de aanwezigheid van HIT antistoffen en de functionele activiteit van bloedplaatjes tesamen kunnen bepaald worden. Grote prospectieve studies zijn nodig om het nut van flowcytometrie te bevestigen in de diagnose van HIT.

Er zijn nog andere immuun- en functionele assays, zoals: fluid-phase EIA’s, “ATP-release chemiluminiscence assay”, flowcytometrische detectie van bloedplaatjes micropartikels die enkel in de “reseach setting” bestudeerd worden en nog niet gevalideerd zijn voor klinisch gebruik.

2) Wat is de diagnostische aanpak van HIT?

Volgens American College of Chest Physicians (ACCP) guidelines (2008) moet HIT uitgesloten worden bij trombocytopenie met $\geq$ 50% daling van bloedplaatjes en/of trombose op de dag 5-14 dagen na het starten van heparine zelfs als heparine is gestopt op het moment van de trombopenie / trombose[1].

Klinische pretest probabiliteit (lage, intermediaire of hoge) kan geschat worden op de basis van de Warkentin 4Ts score.
De volgende stap is het uitvoeren van een ELISA test (liefst IgG specifiek) of PaGIA bij hoge of intermediaire score. Over het testen bij lage klinische probabiliteit zijn de verschillende auteurs het niet eens. Bij de grote meerderheid van gepubliceerde artikels is het niet aanbevolen en moet heparine verder gezet worden. Meerdere studies hebben getoond dat het Warkentin 4Ts scoring systeem zeer accuraat is met NPV 100% bij lage probabiliteit [7,14]. Enkele auteurs raden toch aan een ELISA test uit te voeren bij lage pretest score en zeker bij de stijging van de score in de daaropvolgende dagen.
Volgens een studie van *M-C Morel-Kopp et al.* hadden 4% van de patiënten met een lage score een positieve aggregatietest [3]. Een andere reden is een inaccuraat gebruik van het scoring systeem en subjectiviteit met als gevolg de onderschatting van de klinische score.
Een positieve ELISA moet geconfirmeerd worden door een functionele test, tenzij bij een hoge score waarbij verdere investigatie is niet meer nodig. Een functionele test moet ook uitgevoerd worden bij alle discordante resultaten (bvb negatieve ELISA bij een hoge score of positieve ELISA bij een lage score) en bij een twijfelachtig resultaat. In afwachting van het ELISA resultaat is de overschakeling naar een alternatieve behandeling strikt aanbevolen bij hoge en intermediaire score.
Bij discordantie tussen ELISA en functionele test is de laatste doorslaggend in de diagnose van HIT



Diagnostische algorithm van HIT met immunoassay (PF4 antigeen assays) en functionele (confirmatie) assay J.B. Lefkowitz Heparin-induced thrombocytopenia, chapter 21

Wat is de huidige situatie in O.L.V ziekenhuis Aalst?

Bij de aanvraag van HIT wordt de pretest probabiliteit geschat op de basis van Warkentin 4Ts score na samenspraak met behandelde arts. Vervolgens voeren wij partikel gel immunoassay uit (**ID-H/PF4 PaGIA**, DiaMed) bij intermediaire of hoge score. Over het algemeen wordt de test niet uitgevoerd bij lage klinische probabiliteit tenzij bij nadrukkelijke vraag van de arts. Indien PaGIA een positief of twijfelachtig resultaat of een resultaat discordant met de score oplevert wordt het staal gestuurd naar UZ Leuven voor “confirmatie” door ELISA.
ELISA wordt wekelijks uitgevoerd in batch met als gevolg een niet te vermijden vertraging in de diagnose tot maximum 7 dagen.
Daar de huidige internationale consensus de combinatie van ELISA en een functionele (confirmatie) test is stellen wij de vraag naar de mogelijkheid om een functionele test in onze laboratorium te implementeren. Een ideale confirmatietest moet binnen de 24 uur uitgevoerd worden wat een snelle therapeutische aanpak toelaat.
Recent zijn er in de literatuur enkele artikels verschenen over een snelle aggregatietest op de Multiplate® aggregometer met gebruik van volbloed. In ons laboratorium gebruiken wij Multiplate® al enkele jaren voor de evaluatie van de functie van bloedplaatjes en voor de opvolging van behandeling met anti-aggregantia.

Het principe van de werking van de Multiplate® is gebaseerd op multipel electrode aggregometrie. Het toestel heeft 5 testkanalen en 5 testkamers met 2 paar electroden (impedance sensors) in elke testkamer. De bepaling gebeurt op volbloed waarbij 300 µL bloed nodig is voor elke kamer.

Bij bloedplaatjesaggregatie worden de veranderingen in de impedantie door twee electroden afzonderijk gemeten en een gemiddelde berekend. De sterkte van de aggregatie is uitgedrukt in AUC units (area under the curve).
Aggregatietest op volbloed is een snelle (30 min) en simpele methode die geen speciale voorbereidingen van donorbloed vereist en kan gemakkelijk uitgevoerd worden in een routine laboratorium.

I. Elalamy et al. hebben in een recente studie multipel electrode aggregometrie (MEA) geëvalueerd op volbloed voor de diagnose van HIT[5].

Protocol: 340µL van donorvolbloed (met citraat of hirudine) werd gemengd met 200 µL van patiënt citraatplasma en na incubatie gedurende 1 min werd heparine toegevoegd in een finale concentratie 1U/ml. Na 15 min werd het resultaat afgelezen, uitgedrukt in AUC. Zelfde procedure werd herhaald met 100 U/ml van heparine en nog een keer met fysiologisch zout in plaats van heparine.

Interpretatie: de baseline AUC werd bepaald door het uitvoeren van deze test op het plasma van 10 patiënten behandeld met heparine die niet verdacht waren voor HIT. De test was beschouwd als positief bij de stijging van AUC $\geq$ 25% t.o.v baseline en afwezigheid van aggregatie bij toevoeging 100 U/ml heparine en in fysiologisch zout.

Methode: in deze studie hebben de auteurs 45 patiënten geëvalueerd verdacht voor de HIT. Het plasma van de patiënten werd getest met serotonine release assay (SRA) en plaatjesaggregatie test (PAT) op lichttransmissie aggregometer. De patiënten werden vervolgens verdeeld in 3 groepen afhankelijk van de resultaten: groep A (n=15) met SRA+ en PAT+, groep B (n=15) met SRA+ en PAT- en groep C (n=15) met SRA- en PAT-. Op het plasma van alle patiënten werd ook MEA op Multiplate® aggregometer uitgevoerd en de resultaten werden vergeleken met die van de twee andere testen. Het plasma werd altijd in duplo getest met volbloed van 2 donoren (zelfde donoren voor de PAT). Evaluatie van twee anticoagulantia (citraat en hirudine) toonde geen verschil tussen beide wat betreft de invloed op de resultaten en alle MEA's werden op citraatplasma uitgevoerd.
Resultaten: zie tabel 1 hieronder

Table 1 Performance of heparin-induced multiple electrode aggregometry (HIMEA) as compared with the serotonin release assay (SRA) and the platelet aggregation test assessed with light transmission aggregometry (PAT) in patients with clinical suspicion of heparin-induced thrombocytopenia

4T's score*	Negative control group (n = 10)	Group A (n = 15)	Group B (n = 15)	Group C (n = 15)
Saline	0	0–48*	0*	0*
UFH: 1 IU mL^{-1}	0	522–1585*	0*	0*
UFH: 100 IU mL^{-1}	0	0–309*	0*	0*
Range of 4T's score*	0	4–6	4–6	2–5
Positive ELISA	0	15	15	7
Positive SRA result	0	15	15	0
Positive PAT result	0	15	0	0
Positive HIMEA result	0	15	0	0

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; UFH, unfractionated sodium heparin. *Values show the minimum and maximum ranges of area under the aggregation curve × min.
*4T's score for pre-test HIT probability: low (0–3), intermediate (4–5), high (6–8) (4).

Deze studie toonde dat de aggregatietest op volbloed en de conventionele PAT op plaatjesrijk plasma een vergelijkbare sensitiviteit hadden en de concordance tussen beide testen was volledig. MEA was ook concordant met SRA bij de patiënten met hoge score en positeve ELISA. Bij de discordantie tussen SRA en PAT waren de resultaten van MEA vergelijkbaar met die van conventionele plaatjesaggregatie test.

In een andere studie van *M-C Morel-Kopp et al.* hebben de auteurs 20 stalen van 15 patiënten geëvalueerd verdacht voor de HIT met positieve IgG specifieke ELISA (Zymutest® HIA, BioMed)[3]. Het citraatplasma van deze patiënten werd getest op Multiplate® aggregometer (MEA) en met lichttransmissie aggregometrie (LTA) met volbloed/ gewassen bloedplaatjes van de zelfde " high responder" donor gekend homozygoot te zijn voor FcyRIIA receptor. Het bloed werd zonder tourniquet afgenomen om aspecifieke aggregatie te vermijden.
Het protocol van MEA verschilt een beetje van die van bovenbeschreven studie: de finale concentratie van heparine was lager (0,5 U/ml i.p.v 1U/ml) en de observatietijd was 20 min ipv 15 min. Zoals in de andere studie werd ook een hoge dosis heparine (100 U/ml) toegepast, maar het is bij een patiënt mislukt om de aggregatie te onderdrukken. Na 1/3 verdunning van het plasma is de test negatief geworden. Een positieve controle met het plasma van gekende HIT patiënten werd uitgevoerd bij alle functionele assays.

De resultaten van MEA en LTA werden vergeleken met elkaar en met de resultaten van serotonine release assay (SRA) uitgevoerd in een extern referentie labo. Zie tabelen 1 en 2 hieronder.

Table 1
Patient stratification by pretest probability (4Ts) score. The percentage and total number of patients (in brackets) for each test category are shown below. The likelihood of a positive ELISA and functional assay is greatest in patients with a high score. The number of positive samples for each test result is reported in the text.

	Low score (0-3) N = 75	Intermediate score (4-5) N = 15	High score (6-8) N = 7	N
Zymutest IgG negative	92% (69)	73% (11)	38% (3) #	85% (83)#
Zymutest IgG positive	8% (6)	27% (4)	62% (5)	15% (15)
LTA positive	4% (3)	13% (2)	62% (5)	10% (10)
WBI positive	4% (3)	20% (3)	62% (5)	11% (11)
SRA positive	2% (2)	13% (2)	62% (5)	9% (9)

One patient had a first negative result before being tested positive by ELISA. The median ODs and range for the Zymutest positive samples were as follow: low score: 1.127 [0.345-2.567] intermediate score: 1.434 [1.040-3.073] and high score: 2.493 [1.853-4.887].

Table 2
Twenty samples (15 patients) positive by Zymutest IgG were tested functionally, using LTA, WBI and the "gold standard" SRA. Table 2A compares LTA and WBI, while 2B compares SRA and WBI. The numbers within brackets represent the number of corresponding patients.

A		LTA	
		Negative	Positive
WBI	Negative	5 (4)	0
	Positive	2 (2)#	13 (10)#
B		**SRA**	
		Negative	Positive
WBI	Negative	5 (4)	0
	Positive	4 (2)	11* (9)

One patient had a first sample negative by LTA and positive by WBI whereas the next sample was positive by both techniques. * Two samples were still SRA positive in the presence of 100 IU heparin.

Deze studie toonde dat alle positieve SRA en LTA ook op Multiplate® aggregometer (MEA) positief waren. Volgens deze studie is de sensitiviteit van MEA vergelijkbaar of iets hoger dan LTA, want twee negatieve LTA stalen van HIT patiënten waren positief op MEA. Een ander opmerking van de auteurs is de snellere aggregatie met MEA dan met LTA. Zwakke aggregatie met MEA werd geobserveerd bij twee negatieve SRA's, wat als mogelijke verklaring zou kunnen hebben een lage titer van antistoffen en gebruik van een andere donor voor SRA. De auteurs hebben benadrukt het belang van donorselectie voor de sensitiviteit van functionele assays. Ze hebben alle positieve stalen ook getest met een " low responder donor" waarbij een staal negatief geworden is met LTA en zwak positief met MEA.

Preliminaire data van deze studie suggereren een betere sensitiviteit van MEA uitgevoerd op hirudine donorbloed in vergelijking met citraatbloed. Een aggregatietest uitgevoerd op hirudine donorbloed had een grotere AUC en een vroeger begin van aggregatie.

In vergelijking met andere conventionele functionele testen heeft MEA enkele voordelen: geen staalvoorbereiding (centrifugatie, wassen), snelle aggregatie, geen gebruik van isotopen of speciaal opgeleid personeel.

De auteurs hebben geconcludeerd dat de aggregatietest op Multiplate® een alternatief voor andere functionele testen zou zijn voor een snelle confirmatie van HIT.

In ons labo hebben wij sinds 14 januari tot 11 april 2011 zeventien patiënten getest verdacht voor HIT. De pretest probabiliteit werd geëvalueerd op basis van het Warkentin scoring systeem waarbij 6 (35%) patiënten een lage, 7 (41%) patiënten een intermediaire, 2 (11,7%) patiënten een hoge en 2 (11,7%) externe patiënten een onbepaalde score hadden wegens onvoldoende klinische informatie.

Methode:

Op het *serum* van alle patiënten werd een snelle antigeentest (PaGIA, Diamed) en vervolgens de aggregatietest op Multiplate® aggregometer uitgevoerd. Sera

van 14 patiënten werden naar UZ Leuven gestuurd om een IgG specifiek ELISA (**GTI Diagnostics**) uit te voeren.
In het begin hebben we *F. Mullier* en zijn collega's uit Mont- Godinne gecontacteerd die al een paar maanden bezig waren met de evaluatie van de functionele test op Multiplate® aggregometer. We hebben het protocol van hun nog lopende niet-gepubliceerde studie overgenomen[29]. (zie bijlage 1)
Aggregatietest werd uitgevoerd op hirudine volbloed van een gezonde donor met bloedgroep O (meestal klinisch bioloog, assistent of een laborant). Het bloed werd zonder tourniquet afgenomen of met zeer kortdurende (< 1 min) spanning. Volgens het protocol hebben we telkens 2 lage concentraties van heparine gebruikt (1U/ml en 10 U/ml) en 385 U/ml van heparine voor de inhibitietest. Als negatieve controle hebben we het serum van de donor gebruikt of een pool serum van 3 mensen. De observatietijd was initieel 20 minuten, maar na 13 testen werd de observatietijd verlengd tot 30 minuten (zoals ook in Mont-Godinne werd gedaan) en 5 bevroren stalen (3 negatieve en 2 positieve) werden hertest. Volgens de aanbevelingen van andere studies hebben we ook een blanco test *zonder heparine* toegepast. De aggregatie was uitgedrukt in AUC.
Resultaten:

De sera van 9 patiënten (53%) waren positef met PaGIA en slechts 6 sera (35%) met ELISA. Bij alle immunologisch negatieve en 3 discordante (PaGIA pos en ELISA neg) stalen (n=11) werden de aggregatietesten als negatief beschouwd: bij 9 stalen zagen we zwakke aggregatie (AUC 0-36) en/of spontane aggregatie van bloedplaatjes bij de negatieve controle of bij de blanco test (tot AUC =91!) en bij 2 stalen zagen we falen van inhibitie door heparine exces.

Van de 6 patiënten met positieve immunologische testen hadden 3 patiënten zwakke aggregatie en werden de aggregatietesten als negatief beschouwd. Klinisch beeld van een patiënt met lage score was niet consistent met HIT: zeer lage (0-1000) bloedplaatjes en geen verbetering na het stoppen van heparine. De patiënt had vermoedelijk een ITP met trage recuperatie na behandeling met corticoïden. Twee andere patiënten met onbepaalde en intermediaire score hadden ook een negatieve aggregatietest. Te noteren dat de ELISA's bij 2 patiënten zwak positief (OD 0,48 en 0,5) en bij een patiënt matig positief (OD 1,7) waren. Drie andere patiënten (1 met hoge en 2 met intermediaire score) hadden een (sterk) positieve PaGIA, positieve ELISA met OD range 0,71-2,93 (cut-off 0,4) en een sterkere aggregatie op Multiplate® met AUC's 114-153 (met 1 U/ml heparine) en 86-187 (met 10 U/ml heparine). Hoge dosis heparine inhibitietest was positief bij alle drie patiënten.

De AUC's van aggregatietesten met 10 U/ml heparine lagen in het algemeen hoger. Een andere opmerking is een relatief frequente (11/17) aspecifieke aggregatie van donorbloedplaatjes bij de negatieve controle en/of bij de test zonder heparine. Voorlopig hebben we geen verklaring voor dit fenomeen.

Een beperking van onze studie is de afwezigheid van een positieve controle. Bovendien konden wij niet de aggregatietest op Multiplate® vergelijken met SRA (goud standaard) of een conventionele aggregatietest op lichttransmissie aggregometer.

Conclusie:
Een functionele HIT test op Multiplate® is een gemakkelijk en snel uit te voeren test in een routine-labo, maar dient nog verder gestandaardiseerd te worden voor gebruik in de diagnostiek van HIT. Daarvoor zijn verdere klinische studies nodig en aanpassing van het testprotocol.
Nadeel aan de test is de noodzaak van verse donorplaatjes van een gezonde donor. Ook de oorzaak van het frequent optreden van spontane aggregatie van de donorplaatjes dient verder onderzocht te worden. Hiervoor dienen verder criteria opgesteld te worden voor een accurate donorselectie.

TO DO/ACTIONS

1) Bespreking van resultaten met andere gebruikers (o.a. F. Mullier – Mont-Godinne)

2) Uittesten van aangepaste testprotocols o.a. minder verdunning van de donorplaatjes en andere testtijden

3) Baseline AUC bepalen op minstens 20 negatieve stalen van de patiënten verdacht voor HIT.

4) De firma Nodia gaat de resultaten bundelen van verschillende gebruikers, zodat richtwaarden kunnen worden opgesteld.

5) Vragen aan labo van UZL de OD waarden van ELISA te rapporteren

6) Overwegen om probabiliteit score bij resultaten van ELISA te rapporteren aan de clinicus.

BIJLAGEN

Bijlage 1: protocol van aggregatie test op Multiplate® aggregometer

Kanaal 1 **Heparine 1 U/ml**	**Kanaal 2** **Heparine 10 U/ml**	**Kanaal 3** **Heparine 385 U/ml**	**Kanaal 4 Negatieve controle (Heparine1U/ml)**	**Kanaal 5 Blanco test (zonder heparine)**
300 µL 0,9% NaCl	300 µL 0,9% NaCl	300 µL 0,9% NaCl	300 µL 0,9% NaCl	300 µL 0,9% NaCl
150 µL donorbloed	150 µL donorbloed	150 µL donorbloed	150 µL donorbloed	150 µL donorbloed
150 µL serum patiënt	150 µL serum patiënt	150 µL serum patiënt	150 µL serum donor (of pool serum)	150 µL serum patiënt
Incubatietijd 180 sec				
50 µL heparine 1U/ml (finale concentratie)	50 µL heparine 10 U/ml (finale concentratie)	50 µL heparine 385 U/ml (finale concentratie)	50 µL heparine 1U/ml (finale concentratie)	50 µL 0,9% NaCl
Incubatietijd 30 min*				

***Eerste 13 stalen zijn getest op 20 min, 5 bevroren stalen zijn hertest op 30 min**

Bijlage 2: resultaten van 4T score, PaGIA, ELISA en functionele test op Multiplate®

	Aantal Positieve testen	Lage score n=6 (35%)	Intermediaire score n=7 (41%)	Hoge score n=2 (11,7%)	Onbepaald n=2 (11,7%)
PaGIA (DiaMed)	9	2	3	2	2
ELISA (GTI Diagnostics)	6	1 OD 0,5	3 OD 0,71-2,93	1 OD 2,67	1 OD 0,48
MEA op Multiplate®	3 positieve?	Aggregatietest negatief	2 aggregatie testen positief? AUC 121-142 AUC 114-187	Aggregatietest positief? AUC 153-86	Aggregatietest negatief

Opm.: AUC met 1 U/ml heparine en 10 U/ml heparine, observatietijd 30 min