

# HIT – funkčný test stanovenia heparínom indukovanej trombocytopenie

Ing. Ingrid Škorňová, PhD.<sup>1</sup>, Ing. Andrea Vážanová, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Viliam Lauko<sup>2</sup>, prof. MUDr. Ján Staško, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Pavol Hollý, PhD.<sup>1</sup>, doc. MUDr. Matej Samoš, PhD.<sup>3</sup>, MUDr. Tomáš Bolek<sup>3</sup>, MUDr. Martin Schnierer, PhD.<sup>4</sup>, prof. MUDr. Peter Kubisz, DrSc.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK a UNM, Martin

<sup>2</sup>Národný ústav srdcových a cievnych chorôb, a. s., Bratislava

<sup>3</sup>1. interná klinika JLF UK a UNM, Martin

<sup>4</sup>Interná klinika – Gastroenterologická JLF UK a UNM, Martin

**Úvod:** Heparínom indukovaná trombocytopenia (HIT) je život ohrozujúca komplikácia liečby heparínom (nefrakcionovaným heparínom i heparínom s nízkou molekulovou hmotnosťou-LMWH) (1). Diagnóza HIT je založená na kombinácii klinických nálezov, stanovením 4Ts skóre a laboratórnymi testami (2).

**Metódy:** V našej štúdií sme sledovali súbor 47 pacientov s podozrením HIT. Vzorky všetkých pacientov boli v prvom kroku analyzované niektorým z imunologických testov (ID-PaGIA Heparin/PF4, HemosIL-Acustar HIT IgG, ZYMUTEST HIA Monostrip IgG) na dôkaz prítomnosti protilátok proti komplexu heparín-PF4 (doštičkový faktor 4). Pri pozitívite imunologického testu bola vzorka následne analyzovaná na HIT funkčným testom HIT Alert. Definitívne je možné stanoviť diagnózu HIT až pri pozitívnom výsledku funkčného testu.

**Výsledky:** Súbor tvorilo 47 vzoriek pacientov s podozrením HIT, ktorým bolo imunologickým testom vyhodnotených 34 pozitívnych výsledkov. Ďalším testovaním týchto vzoriek funkčným testom prietokovou cytometriou – kitom HITAlert malo 16 vzoriek pozitívny a 18 vzoriek negatívny výsledok.

**Záver:** Klinický nález, stanovenie 4Ts skóre, výsledky imunologického testu a funkčného testu môžu významne zlepšiť prognózu ochorenia.

**Kľúčové slová:** heparínom indukovaná trombocytopenia (HIT), komplex heparín/PF4 (doštičkový faktor 4), imunologické a funkčné testy

## HIT – functional assay for the determination of heparin-induced thrombocytopenia

**Background:** Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a life-threatening complication of heparin therapy (both unfractionated heparin and low molecular weight heparin) (1).

**The diagnosis of HIT is based on a combination of clinical findings, 4Ts scores and laboratory tests (2).**

**Methods:** In our study, we examined a group of 47 patients with suspected HIT. Samples of all patients were analyzed in a first step by some immunoassay (ID-PaGIA Heparin/PF4, HemosIL-Acustar HIT IgG, ZYMUTEST HIA Monostrip IgG) to detect the presence of antibodies against heparin-PF4 complex (platelet factor 4). When the immunoassay was positive, the sample was subsequently analyzed for HIT by the HIT Alert function assay. Definitely, the diagnosis of HIT can be made only after a positive functional test result.

**Results:** The sample consisted of 47 samples of patients with suspected HIT, who were evaluated by 34 immunoassays. Further testing of these samples with a functional flow cytometry assay - HIT Alert kit 16 samples were positive and 18 samples were negative.

**Conclusion:** Clinical findings, 4Ts scores, the results of the immunoassay and functional test can significantly improve the prognosis of the disease.

**Key words:** heparin-induced thrombocytopenia (HIT), heparin / PF4 complex (platelet factor 4), immunological and functional assays

Vask. med., 2020;12(1):42-44

## Úvod

Heparínom indukovaná trombocytopenia (HIT) je stav vyvolaný protilátkami proti komplexu heparín/PF4 (doštičkový faktor 4) pri liečbe heparínom.

Rozlišujeme dva typy HIT.

HIT typu 1 je neimunitná porucha, ktorá je výsledkom priameho účinku heparínu na aktiváciu krvných doštičiek (3, 4). Vyskytuje sa počas prvých dvoch dní po expozícii heparínu, pričom sa počet krvných doštičiek normalizuje pri pokračujúcej liečbe heparínom.

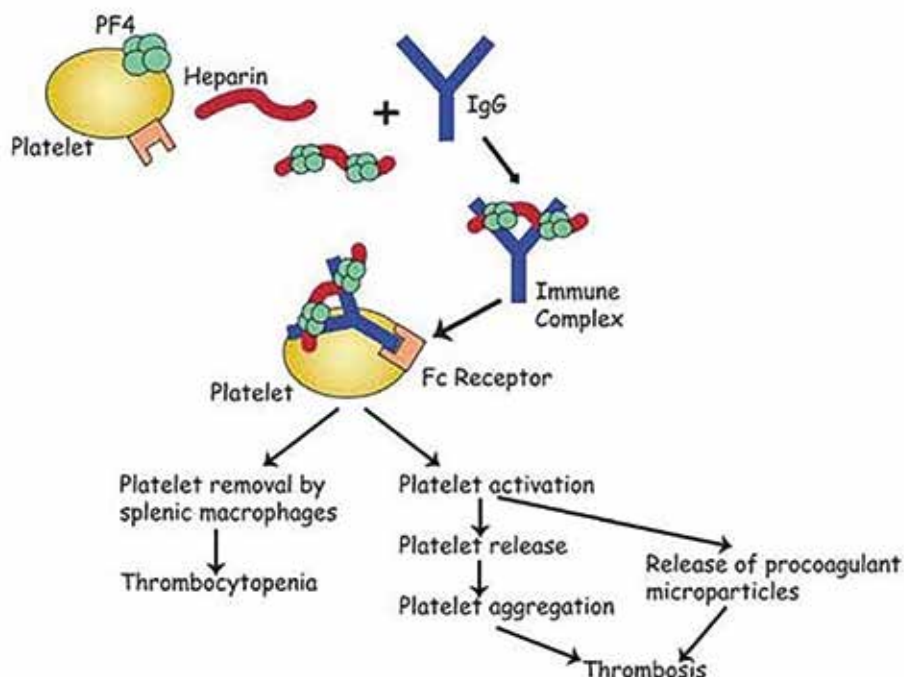
HIT typu 2 je imunitne sprostredkovaná porucha, ktorá sa zvyčajne vyskytuje 4 až 10 dní po expozícii heparínu. Prevalencia je približne 0,5 – 5 % heparinizovaných pacientov (5).

HIT spôsobuje trombocytopeniu, a niekedy aj artériovú alebo žilovú trombózu (3). Heparín sa patofyziologicky viaže na trombocyty, pričom sa z  $\alpha$  granúl trombocytu uvoľňuje PF4. Na povrchu trombocytu sa tvorí komplex heparín/PF4, ktorý vyvoláva u niektorých jedincov tvorbu špecifických protilátok

(najčastejšie IgG) s následnou aktiváciou trombocytov, ktoré uvoľňujú zložky s prokoagulačnou aktivitou (obrázok 1).

Laboratórna diagnostika HIT zvyčajne prebieha v dvoch krokoch. Prvým krokom je dôkaz prítomnosti protilátok proti komplexu heparín-PF4, niektorým z imunologických testov a následne pri pozitívite testu (t. j. dôkaze prítomnosti protilátok) nasleduje potvrdenie alebo vylúčenie HIT funkčným testom, ktorého úlohou je dôkaz schopnosti prítomných protilátok aktivovať trombocyty.

**Obrázok 1.** Heparínom indukovaná trombocytopenia (HIT) spôsobená autoprotilátkami proti doštičkovému faktoru 4 (PF4) naviazanému na negatívne nabitý heparín. Komplex heparín-PF4-protilátka sa viaže na doštičky cez FcγRII, spôsobuje ich aktiváciu a agregáciu, uvoľňujú sa mikroparticuly (4)



Definitívne je možné stanoviť diagnózu HIT až pri pozitívnom výsledku funkčného testu, pričom existuje značná skupina pacientov (najmä po kardiochirurgickom výkone), ktorí majú prítomné protilátky (pozitivita v imunologických testoch), ale funkčný test majú negatívny, a teda HIT nemajú.

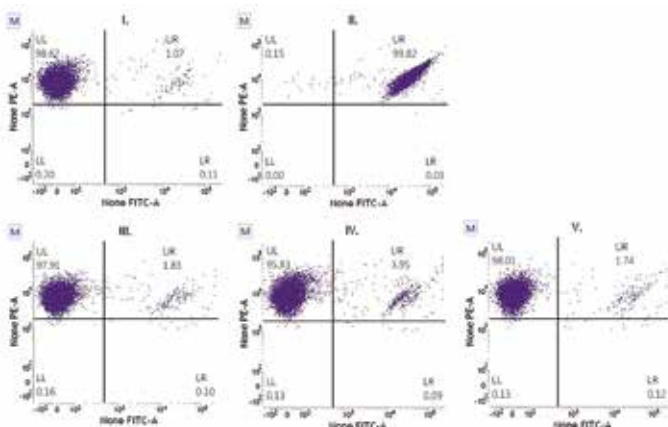
Cieľom práce bolo poukázať na výhody, úskalia a možnosti aplikácie funkčného testu HIT Alert pomocou prietokovej cytometrie.

#### Súbor pacientov a metódy:

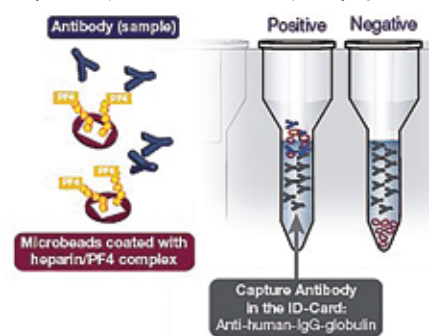
Kontrolné vzorky zdravých darcov boli odoberaté do citrónanu sodného s koncentráciou 0,109 mol/l. Vzorky pacien-

tov boli odoberaté do skúmavky bez protizrážavého činidla. Súbor v období od apríla 2017 do júla 2019 tvorilo 47 pacientov s podozrením HIT. Všetkým pacientom bol vykonaný niektorý z imunologických testov (ID-PaGIA Heparin/PF4 (obrázok 2), HemosIL-Acustar HIT IgG, ZYMUTEST HIA Monostrip IgG). V prípade vzoriek s pozitívnym výsledkom imunologického testu bolo sérum pacienta analyzované pomocou prietokovej cytometrie funkčným testom – HITAlert. Výrobcom bola stanovená senzitivita testu HIT Alert 78 % a špecificita 98 %. Cut-off hodnota bola určená 8 %.

**Obrázok 3.** Cytogram vzorky pacienta s negatívnym výsledkom; analýza s HITAlert. Skúmavka I. nestimulovaná vzorka. Skúmavka II. stimulovaná vzorka Ca-ionoformom. Skúmavka III. vzorka pacienta bez heparínu. Skúmavka IV. vzorka pacienta s heparínom. Skúmavka V. vzorka pacienta s prebytkom heparínu



**Obrázok 2.** Imunologický test ID-PaGIA Heparin/PF4 (particle gel immunoassay); reakcia mikroparticúl s komplexom heparín/PF4 a príslušnej protilátky v sére pacienta metódou stĺpcovej aglutinácie



**Výsledky:** Analýzou 47 vzoriek pacientov s podozrením HIT bolo imunologickým testom vyhodnotených 34 pozitívnych výsledkov. Ďalším testovaním týchto vzoriek prietokovou cytometriou – kitom HIT Alert malo 16 vzoriek pozitívny a 18 vzoriek negatívny výsledok (obrázok 3, 4).

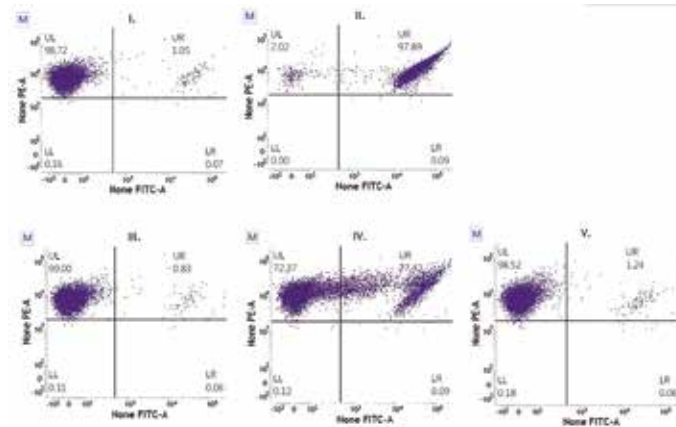
Skúmavka I.; Vzorka nestimulovaných krvných doštičiek by mala mať maximálne 1 % aktivačných markerov. Keby toto percento bolo vyššie ako 5 %, test by sa mal zopakovať, najlepšie s doštičkami od iného darcu.

Skúmavka II.; Vzorka stimulovaná Ca-ionoformom by zvyčajne mala mať viac ako 80 % aktivovaných doštičiek. Percento nižšie ako 80 % môže byť spôsobené neúplným rozpustením Ca-ionoformu.

Skúmavky III., IV. a V.; Výsledky pozitivity a negativity HIT sú uvedené v tabuľke.

Podľa tabuľky prvý pacient, u ktorého je veľmi pravdepodobné, že bude HIT pozitívny, by mal mať v skúmavke IV. ak-

**Obrázok 4.** Cytogram vzorky pacienta s pozitívnym výsledkom; analýza s HITAlert. Skúmavka I. nestimulovaná vzorka. Skúmavka II. stimulovaná vzorka Ca-ionoformom. Skúmavka III. vzorka pacienta bez heparínu. Skúmavka IV. vzorka pacienta s heparínom. Skúmavka V. vzorka pacienta s prebytkom heparínu



**Tabuľka.** Tabuľka interpretácie výsledkov pacienta HIT negatívneho a pacienta HIT pozitívneho

	negat.	pozit.
Skúmavka I.	< 5 %	< 5 %
Skúmavka II.	80 – 100 %	80 – 100 %
Skúmavka III.	< 5 %	aktivácia menej ako polovica v skúmavke IV.
Skúmavka IV.	< 5 %	≥ 8 %
Skúmavka V.	< 5 %	aktivácia menej ako polovica v skúmavke IV.

tiváciu ≥ 8 % (zahŕňajúca PRP darcu + heparín + sérum pacienta). Zatiaľ čo pacient HIT negatívny by mal mať v skúmavke IV. aktiváciu < 5 %. Ak má pacient v skúmavke IV. prechodnú aktiváciu (5 – 8 %), je potrebné opakovať analýzu s inou vzorkou darcu (tabuľka 1) (6).

**Diskusia:** K zavedeniu funkčného testu HIT Alert do praxe nás viedla snaha poskytnúť rýchlu a kompletnú diagnostiku na stanovenie diagnózy HIT. Určenie prítomnosti protilátok spôsobujúcich HIT je nevyhnutné, ale nie do-

statočné na diagnostiku HIT. Výsledky funkčného testu HIT v analyzovanom súbore podávajú kvalitatívny a spoľahlivý údaj na určenie prítomnosti protilátok špecifických pre komplex heparín/PF4. Výsledky imunologického testu, funkčného testu spolu s klinickým nálezom a stanovením 4Ts skóre môžu významne zlepšiť prognózu ochorenia.

**Záver:** Na základe našich doterajších skúseností s aplikáciou funkčného testu stanovenia HIT pomocou prietokovej cytometrie môžeme povedať, že metóda má svoje výhody. Test je certifikovaný, čas analýzy trvá relatívne krátky čas, test je nerádioaktívny a má vysokú senzitivitu a hlavne špecifickosť. Test nie je možné aplikovať na všetky pracoviská, vyžaduje špecializované pracoviská s odbornou znalosťou a prístrojovým vybavením prietokovej cytometrie.

**Podakovanie:** Táto práca bola podporená projektami APVV – 16-0020, Vega 1/0168/16, Vega 1/0187/17 a Centra

excelentnosti pre perinatologický výskum (CEPV II, ITMS 26220120036) a Centra excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET).

#### Literatúra

1. Salter BS, Weiner MM, Trinh MA, et al. Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Comprehensive Clinical Review. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(21):2519-2532.
2. 2013 Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Adults with Suspected Heparin-Induced Thrombocytopenia (HIT).
3. [Guideline] Warkentin TE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004;126(3 suppl):311S-337S.
4. Greinacher A. CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 2015;373(3):252-261.
5. Warkentin TE, Roberts RS, Hirsh J, et al. An improved definition of immune heparin-induced thrombocytopenia in postoperative orthopedic patients. *Arch Intern Med.* 2003;163(20):2518-2524.
6. Tomer, A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 1997;98(3):648-656.

#### Ing. Ingrid Škorňová, PhD.

Národné centrum hemostázy a trombózy  
Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK  
a UNM, Martin  
Kollárova 2, 03601 Martin  
ingrid.skornova@uniba.sk